

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

Victor Hugo de Oliveira Munhoz

Estudos Conformacionais por RMN e
Cálculos Teóricos das Cadeias Peptídicas da
Distinctina, Peptídeo Antimicrobiano Isolado
de *Phyllomedusa distincta*

Belo Horizonte

2008

UFMG/ICEx/DQ - 706^a
D. 426^a

Victor Hugo de Oliveira Munhoz

Estudos Conformacionais por RMN e Cálculos Teóricos das
Cadeias Peptídicas da Distinctina, Peptídeo Antimicrobiano
Isolado de *Phyllomedusa distincta*

Dissertação apresentada ao Departamento
de Química do Instituto de Ciências Exatas
da Universidade Federal de Minas Gerais
como requisito parcial para a obtenção do
grau de Mestre em Ciências – Química
Orgânica.

Belo Horizonte
2008

Munhoz, Victor Hugo de Oliveira
M966e Estudos conformacionais por RMN e cálculos teóricos
2013 das cadeias peptídicas da distinctina, peptídeo
D antimicrobiano isolado de Phyllomedusa distincta /
Victor Hugo de Oliveira Munhoz. 2013.
 xi, 123 f. : il.

Orientadora: Dorila Piló Veloso.

Coorientador: Antônio Flávio de Carvalho Alcântara.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Minas Gerais. Departamento de Química.

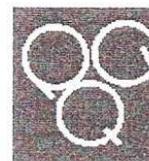
Bibliografia: f. 99-104.

1. Química orgânica - Teses 2. Proteínas - Teses 3.
Ressonância magnética nuclear - Teses 4. Estrutura
molecular - Teses 5. Produtos de ação antimicrobiana -
Teses 6. Agentes antibacterianos - Teses I. Veloso,
Dorila Piló, Orientadora II. Alcântara, Antônio Flávio
de Carvalho, Coorientador III. Título.

CDU 043



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEx
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG
TEL.: 031 - 3499-5732
FAX: 031 - 3499-5700
E-MAIL: pgquimic@zeus.qui.ufmg.br



"Estudos Conformacionais por RMN e Cálculos Teóricos das Cadeias Peptídicas da *Distinctina*, Peptídeo Antimicrobiano Isolado de *Phyllomedusa distincta*"

Victor Hugo de Oliveira Munhoz

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Dr. Dorila Piló Veloso - Orientadora
UFMG

Prof. Dr. Antônio Flávio de C. Alcântara - Co-Orientador
UFMG

Prof. Dr. Amary César Ferreira
UFMG

Prof. Dr. José Dias de Souza Filho
UFMG

Belo Horizonte, 29 de fevereiro de 2008.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, professora Dorila Piló Veloso e professor Antônio Flávio de Carvalho Alcântara, pela orientação, apoio e, sobretudo, paciência apresentados ao longo deste trabalho.

Ao professor Marcelo Porto Bemquerer, na época professor do Departamento de Bioquímica e Imunologia, atual pesquisador da EMBRAPA, pelo constante auxílio na parte de síntese dos monômeros e na caracterização por EM.

Aos professores Fábio C. Almeida e Ana Paula Valente, do Centro Nacional de RMN da UFRJ, pelo grande auxílio na obtenção dos dados de RMN.

À técnica de CLAE Marilda Conceição da Silva por seu grande auxílio nas análises e purificações por CLAE e também pelas inúmeras caronas.

Ao grande companheiro de trabalho Rodrigo Moreira Verly pelas enormes contribuições em meu aprendizado e pela paciência e boa vontade em transmitir conhecimentos.

Aos alunos de iniciação científica André e Gustavo pela grande ajuda e pelo excelente trabalho realizado até então.

A Cléria Mendonça de Moraes, pelos ensinamentos de síntese e demais técnicas laboratoriais.

Ao Jarbas Magalhães Resende, pelo auxílio na parte da determinação estrutural e experimentos de RMN.

A meus colegas, Giovanni, Matheus, Rangel, Marcelo e Lucas, pelos momentos bons e ruins enquanto fazíamos as disciplinas.

Aos meus colegas de laboratório, Alison, Roberta, Ana, Monique, Felipe (você ainda está me devendo o fundo musical de violão), Flávio, Diego.

A meus pais, Fábio e Lúcia e a meu irmão Pedro Ivo, pelo grande apoio, sem o qual não seria possível terminar este trabalho.

A meus avós, João, Letícia, Olympio e Marta por terem se tornado uma parte importante da minha vida e da minha formação.

A meu amor, Thais, pelo constante apoio nos momentos bons e ruins, pela compreensão e, principalmente, por ser, além de uma namorada, uma grande amiga e uma pessoa maravilhosa.

A Jairo Nelson, Ivone, Isabela e Livia, e toda a família, pela amizade e hospitalidade incondicional.

Aos meus grandes amigos Caio e Daniel (futuro pai de família) pela amizade e pelos ótimos momentos, apesar de ultimamente terem sido muito poucos, pela minha falta de tempo.

Ao Marcos e à Nazareth (escrevi o nome certo dessa vez!) pela hospitalidade e pelo apoio por todo esse tempo.

Aos grandes companheiros Luiz Max Steel, Silvinha, Bruno Peruca e toda a turma do Santa Inês.

Ao pessoal da banda Noturna pela amizade por tanto tempo e por todos os bons e maus momentos ao longo desses seis anos.

Aos meus grandes amigos do Hargos pela amizade e apoio desenvolvidos em tão pouco tempo e pelos muitos anos de amizade que virão.

Aos meus amigos de longa data Francisco, Mário, Eberth, Filipe, Sâmara, Carol, Rodrigo, Pedro, David e Douglas.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para minha formação e meu crescimento pessoal.

A todos que não acreditaram em mim ou que me prejudicaram em alguma etapa deste trabalho, pois alguém só se torna uma pessoa melhor ao vencer esses obstáculos indesejáveis.

Agradeço a qualquer pessoa que eu tenha porventura esquecido, pois já é tarde da noite e não estou mais com a totalidade de minhas faculdades mentais. Vocês sabem que vocês são.

SUMÁRIO

<i>Resumo</i>	<i>i</i>
<i>Abstract</i>	<i>ii</i>
<i>Lista de Abreviaturas e Acrônimos</i>	<i>iii</i>
<i>Lista de Figuras</i>	<i>iv</i>
<i>Lista de Tabelas</i>	<i>viii</i>
<i>Lista de Esquemas</i>	<i>ix</i>
<i>Apresentação e Objetivos</i>	<i>x</i>

Capítulo 1 – Introdução

<i>1.1 Aspectos Estruturais dos Peptídeos</i>	<i>2</i>
<i>1.1.1 Aminoácidos</i>	<i>2</i>
<i>1.1.2 Peptídeos</i>	<i>3</i>
<i>1.2 Peptídeos Antimicrobianos de Pele de Anuros</i>	<i>6</i>
<i>1.2.1 Relação Estrutura-Atividade de Peptídeos Antimicrobianos</i>	<i>7</i>
<i>1.3 Utilização de Dados de RMN para o Cálculo Estrutural de Peptídeos e Proteínas</i>	<i>8</i>
<i>1.3.1 Análise dos Dados de RMN na Determinação Estrutural</i>	<i>10</i>
<i>1.3.1.1 O Efeito Nuclear Overhauser e as Restrições de Distâncias Interatômicas</i>	<i>10</i>
<i>1.3.1.2. Constantes de Acoplamento Escalar e as Restrições de Ângulos Diedros</i>	<i>12</i>
<i>1.3.1.3. Correlações obtidas pela técnica ¹⁵N ¹H HSQC e as Restrições de Ligação de Hidrogênio</i>	<i>14</i>
<i>1.3.1.4. Acoplamento Dipolar Residual e as Restrições Orientacionais</i>	<i>15</i>
<i>1.3.1.5. Deslocamentos Químicos e as Informações Estruturais</i>	<i>18</i>
<i>1.3.2. Metodologias Teóricas de Conversão e Interpretação dos Dados de RMN</i>	<i>19</i>
<i>1.3.2.1. O Uso da Dinâmica Molecular nas Otimizações de Geometria</i>	<i>19</i>
<i>1.3.2.2. Atribuições Estereoespecíficas</i>	<i>21</i>
<i>1.3.2.3. Metodologia de geometria de distância</i>	<i>23</i>
<i>1.3.2.4. Metodologia de Função Alvo Variável</i>	<i>26</i>
<i>1.3.2.5. Dinâmica Molecular de Ângulos de Torção</i>	<i>27</i>
<i>1.3.3 Análise e Validação de Estruturas</i>	<i>28</i>

1.3.3.1. Violação de restrições.....	28
1.3.3.2. Distribuição de Ângulos Diedros.....	30
1.3.3.3. Outras Propriedades Geométricas.....	31
1.3.3.4. Interações entre Átomos Não Ligados.....	33
1.3.3.5. Desvio Quadrático Médio (RMS – Root Mean Square).....	33
1.3.3.6. Fatores R de RMN e Validação Cruzada.....	34
1.3.3.7. Validação Independente e Fatores Q.....	35
1.4 Síntese em Fase Sólida de Peptídeos, pela Estratégia Fmoc.....	36
1.5 Dicroísmo Circular.....	38

Capítulo 2 – Parte Experimental

2.1 Material e Métodos.....	41
2.1.1 Materiais.....	41
2.1.2 Métodos.....	43
2.1.2.1 Procedimento Geral.....	43
2.1.2.1.1 Preparação da Resina.....	44
2.1.2.1.2 Desproteção da Resina.....	44
2.1.2.1.3 Síntese dos Peptídeos.....	45
2.1.2.1.4 Clivagem dos Peptídeos.....	46
2.1.3 Síntese da Cadeia 1 da Distinctina.....	47
2.1.4 Síntese da Cadeia 2 da Distinctina.....	48

Capítulo 3 – Resultados e Discussão

3.1 Síntese das Cadeias da Distinctina.....	50
3.1.1 Análise Cromatográfica de Amostras da Cadeia 1.....	50
3.1.2 Síntese da Cadeia 1.....	55
3.1.3 Síntese da Cadeia 2.....	57
3.1.4 Purificação e Caracterização dos Peptídeos.....	59
3.1.4.1 Purificação e Caracterização da Cadeia 1.....	59
3.1.4.2 Purificação e Caracterização da Cadeia 2.....	60
3.2 Dicroísmo Circular (CD).....	63

<i>3.3 Análise Conformacional por Ressonância Magnética Nuclear.....</i>	<i>65</i>
<i>3.3.1 Análise por RMN da Cadeia 1 da Distinctina.....</i>	<i>66</i>
<i>3.3.2 Análise por RMN da Cadeia 2 da Distinctina.....</i>	<i>72</i>
<i>3.4 Cálculo Estrutural a partir dos Dados de RMN.....</i>	<i>82</i>
<i>3.5 Análise Conformacional por Metodologias Teóricas.....</i>	<i>85</i>
<i>Conclusões.....</i>	<i>108</i>
<i>Referências Bibliográficas.....</i>	<i>110</i>

RESUMO

Neste trabalho, os monômeros Cadeia 1 e Cadeia 2 da distinctina, peptídeo antimicrobiano heterodimérico isolado das glândulas epiteliais de anuros da espécie *Phyllomedusa distincta*, foram sintetizados manualmente pela técnica de síntese de peptídeos em fase sólida, utilizando-se a estratégia química Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonila).

Para se obterem informações acerca das conformações preferenciais desses peptídeos em meios análogos a membranas bacterianas, foram realizados diversos estudos, empregando técnicas experimentais, como Dicroísmo Circular (CD) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN), e também teóricas, como previsões de estrutura secundária, utilizando bancos de dados de proteínas, otimizações de geometria por mecânica molecular e método semi-empírico, além de metodologias de conversão de dados de RMN em modelos estruturais tridimensionais.

As análises de CD indicaram, para ambas as cadeias, um alto conteúdo de formas α -helicoidais em soluções aquosas contendo diversas concentrações de TFE.

Os estudos por RMN 2D, empregando as técnicas TOCSY, NOESY, ^1H ^{13}C HSQC e ^1H ^{15}N HSQC em solução de 50% TFE em meio aquoso, constituíram uma etapa de atribuição de sinais de deslocamentos químicos desses mapas de contornos, com base nas informações obtidas por CD, e uma etapa subsequente de cálculo estrutural a partir dos dados obtidos na etapa anterior. A partir desses estudos, foi possível obter estruturas para ambos os monômeros com um considerável nível de detalhamento.

ABSTRACT

This work concerns the solid phase synthesis of Chain 1 and Chain 2 of distinctin, an heterodimeric antimicrobial peptide, isolated from the glands of *Phyllomedusa distincta* anurans. The synthesis hereby used took place, by the means of Fmoc (9-fluorenylmethoxycarbonyl) strategy.

In order to obtain information regarding preferential conformations of these peptides in mediums that mimetize bacterial membranes, some experimental techniques, such as Circular Dichroism (CD) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) were used, as well as some theoretical methodologies like secondary structure prediction through protein data bases, molecular mechanics and semi-empirical minimizations, besides a wide array of computational techniques for conversion of NMR data into three-dimensional structural models.

The CD analysis indicated, for both chains, a high content of α -helical forms in aqueous solutions containing various TFE concentrations.

The 2D NMR studies, by the usage of techniques such as TOCSY, NOESY, ^1H ^{13}C HSQC and ^1H ^{15}N HSQC in a 50% TFE aqueous solution, constituted in a part in which all the chemical shift signals were assigned in these contour maps, based on the results yielded by CD analysis, and also in a part in which the data obtained from the previous step were used to calculate bundles of possible structure models for both chains. This study yielded highly detailed structures for both monomers.

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

1D	uni-dimensional
2D	bi-dimensional
3D	tri-dimensional
ACN	acetonitrila
CD	Dicroísmo Circular
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
δ	Deslocamento químico
DQF	Double Quantum Filter
DCM	Diclorometano
DIC	N,N'-diisopropilcarbodiimida
DM	Dinâmica Molecular
DMF	Dimetilformamida
DSS	2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato
EM	Espectrometria de Massas
Fmoc	9-fluorenilmetoxycarbonila
FT	Transformada de Fourier
HOBT	1-hidroxibenzotriazola
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Coherence
Hz	Hertz
IPA	Álcool isopropílico
J	Constante de acoplamento escalar
λ	Comprimento de onda
MHz	Mega Hertz
min	minutos
MM	Mecânica Molecular
m/z	Razão entre massa e carga
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
PM3	Parametric Model 3
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
ppm	Partes por milhão
TFA	Ácido trifluoroacético

TFE	2,2,2-trifluoroetanol
TIS	Tris-hidroxiaminometilmetano
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
VTF	<i>Variable Target Function</i>

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1.** Fórmula representando a estrutura geral de um aminoácido, com os grupos amino, carboxila e cadeia lateral explicitados.....2
- Figura 1.2.** Os vinte aminoácidos mais comuns. As fórmulas estruturais mostram o estado de ionização predominante em pH 7,0. As áreas sombreadas em vermelho indicam as cadeias laterais de cada aminoácido.....2
- Figura 1.3.** Representação esquemática da formação de um polipeptídeo.....3
- Figura 1.4.** Representação dos ângulos de torção dos resíduos de aminoácido.....4
- Figura 1.5.** Quatro modelos de α -hélice, mostrando diferentes aspectos de sua estrutura. (a) formação de α -hélice em torno de um eixo. (b) modelo bola e vareta, explicitando as ligações de hidrogênio intracadeias. (c) α -hélice vista de uma de suas terminações, olhando-se para baixo através do eixo longitudinal. (d) visão lateral da α -hélice pelo modelo *space filling*.....4
- Figura 1.6.** Conformações β de cadeias polipeptídicas, mostrando em (a) a conformação β antiparalela, em que os átomos de carbono, oxigênio e nitrogênio do esqueleto peptídico não encontram-se alinhados (como pode ser visto pela perspectiva lateral) e em (b) a conformação β paralela.....5
- Figura 1.7.** (a) estrutura geral de uma dobra β , indicando os quatro resíduos de aminoácidos (representados envoltos nos círculos azuis) que a constituem. (b) formas em que os resíduos de prolina podem se encontrar (*cis* e *trans*).....6
- Figura 1.8.** Sequência peptídica da distinctina, com a representação da ligação dissulfeto entre os resíduos de cisteína.....7
- Figura 1.9.** Estruturas obtidas por RMN em água do heterodímero distinctina. Em (a) é representado o conjunto de estruturas sobrepostas, visualizando-se somente a cadeia principal das estruturas, com a formação do tetrâmero envolvendo duas moléculas da distinctina. As Cadeias 1 estão representadas em azul-escuro e verde escuro e as Cadeias 2, em ciano e verde-claro. Em (b) é mostrada a estrutura tetramérica mais representativa, com as Cadeias 1 em roxo e as Cadeias 2 em vermelho.....7
- Fig. 1.10.** Curva representando as Relações de Karplus para 3J em relação ao ângulo de torção θ13
- Figura 1.11.** Relação dos ângulos diedros do peptídeo, mostrando os ângulos χ , relativos às cadeias laterais.....13
- Figura 1.12.** Limites de valores de distância para as restrições de ligação de hidrogênio.....14
- Figura 1.13.** Mapas de contornos HSQC: (a) desacoplado em ambas as dimensões, com desdobramentos ^{15}N - ^1H não observados; (b) sem desacoplamento na dimensão ^{15}N , em solução isotrópica, com desdobramentos ^{15}N - ^1H iguais ao acoplamento escalar ^{15}N - ^1H (~92 Hz); (c) sem desacoplamento na dimensão ^{15}N , meio parcialmente orientador, desdobramentos ^{15}N - ^1H somados aos RDCs.....16
- Figura 1.14.** Representação das possíveis interações entre hidrogênios intraresiduais e suas correspondentes notações.....18
- Figura 1.15.** Diagrama de valores de CSI para cada resíduo da sequência do peptídeo ARC Repressor, com representação das estruturas secundárias.....19

Figura 1.16. Representação das mudanças sofridas pela molécula durante o processo de cálculo por recozimento simulado: (a) na conformação e (b) na energia.....	20
Figura 1.17. Representação de um conjunto de três átomos, <i>A</i> , <i>B</i> e <i>C</i> , mostrando a distância entre eles.....	24
Figura 1.18. Conjunto de três átomos, <i>A</i> , <i>B</i> e <i>C</i> , com os vetores de distância entre o ponto central do plano cartesiano e cada átomo, localizados no espaço por suas respectivas coordenadas cartesianas.....	24
Figura 1.19. Restrições utilizadas em vários níveis de minimização <i>L</i> do algoritmo função alvo variável. Em um dado nível <i>L</i> , todas as restrições de distância entre os resíduos <i>i</i> e <i>j</i> , com $ j - i \leq L$ são considerados.....	27
Figura 1.20. Diagrama de Ramachandran de um conjunto de vinte confôrmeros da proteína Ciclofilina A (Ottiger <i>et al.</i> , 1997). Cada círculo corresponde aos valores ϕ/ψ de resíduos que não sejam glicina em um dos vinte confôrmeros. As regiões favoráveis, adicionalmente permitidas, generosamente permitidas e proibidas, estão representadas, respectivamente, por cinza-escuro, cinza-médio, cinza-claro e branco.....	30
Figura 1.21. Representação esquemática do princípio da síntese de peptídeos em fase sólida.....	37
Figura 1.22. Grupo protetor 9-fluorenilmetoxicarbonila (Fmoc) de terminação α -amino.....	37
Figura 1.23. Reagentes ativadores da carbonila mais utilizados na síntese em fase sólida de peptídeos, na estratégia Fmoc.....	38
Figura 1.24. Espectros padrão de dicroísmo circular, em que α se refere a α -hélice; r, a estruturas randômicas e β , a estruturas β -folha.....	39
Figura 3.1. Perfil de CLAE da amostra CH1-C, nas condições análise CH1-C-1 (coluna analítica Microsorb C18; fluxo de 1 mL/min; solventes A: H ₂ O:TFA (10:1) e B: ACN:TFA (100:8); gradiente linear de 0 a 100% em 60 min.....	50
Figura 3.2. Perfil de CLAE da amostra CH1-C sob a condição CH1-C-2 (coluna Microsorb C18; solventes H ₂ O:TFA 10:1 e ACN:TFA 100:8).....	51
Figura 3.3 Perfil de CLAE da amostra CH1-A sob a condição CH1-C-2 (coluna Microsorb C18; solventes H ₂ O:TFA 10:1 e ACN:TFA 100:8).....	52
Figura 3.4. Perfil de CLAE da amostra CH1-B sob a condição CH1-C-2 (coluna Microsorb C18; solventes H ₂ O:TFA 10:1 e ACN:TFA 100:8).....	52
Figura 3.5. Perfil CLAE da purificação da amostra CH1-C sob a condição CH1-C-2, com um fluxo de 4,5 mL/min, destacando FCH1C-1 (<i>tr</i> = 11,6 min), FCH1C-2 (<i>tr</i> = 13,5 min) e FCH1C-3 (<i>tr</i> = 14,1 min); coluna Dynamax C18 e solventes H ₂ O:TFA 0,1% e ACN:TFA 0,08%.....	53
Figura 3.6. Ionogramas: (a) da amostra CH1-A-1 e (b) da fração FCH1-C-1.....	54
Figura 3.7. Ionograma da fração FCH1-A-2 da amostra CH1-A.....	54
Figura 3.8. (a) Ionograma da fração FCH1-C-2;(b) ampliação da região próxima ao pico do íon molecular.....	54
Figura 3.9. Ionogramas (a) da amostra CH1-A-3 e (b) da fração FCH1-C-3.....	55
Figura 3.10. Perfil CLAE da amostra bruta da Cadeia 1 sintetizada manualmente (método CH1-C-2 descrito na Tabela 3.2 - p. 51; coluna Microsorb C-18; solventes, H ₂ O:TFA 0,1% e ACN:TFA 0,08%.....	59
Figura 3.11. Perfil CLAE da amostra purificada da Cadeia 1 sintetizada manualmente (método descrito na Tabela 3.8 – p. 60; fluxo de 3,0 mL/min; coluna Dynamax C18; solventes H ₂ O:TFA 0,1% e ACN:TFA 0,08%).....	59

Figura 3.12. Perfil de CLAE da Cadeia 2 sintetizada manualmente (condições dadas na Tabela 3.9; coluna Microsorb C18; solventes H ₂ O:TFA 0,1% e ACN:TFA 0,08%).....	60
Figura 3.13. Cromatograma do produto de síntese da cadeia 2, utilizando-se o gradiente descrito na Tabela 3.10 (coluna Microsorb C18, solventes H ₂ O:TFA 0,1% e ACN:TFA 0,08%).....	61
Figura 3.14. Cromatograma do produto purificado da síntese da cadeia 2, nas condições descritas na Tabela 3.10.....	62
Figura 3.15. (a) Ionograma da fração FCH2-2; (b) ampliação da região do ionograma próxima ao pico do íon molecular.....	62
Figura 3.16. Espectros de dicroísmo circular (CD) do monômero Cadeia 1 da distinctina, em 10% de TFE (vermelho), em 20% de TFE (magenta), em 40% de TFE (azul), em 60% de TFE (preto) e em 80% de TFE (marrom).....	63
Figura 3.17. Espectros de dicroísmo circular (CD) do monômero Cadeia 2, da distinctina em 10% de TFE (azul), em 20% de TFE (preto), em 40% de TFE (vermelho), em 60% de TFE (magenta) e em 80% de TFE (marrom).....	64
Figura 3.18. Mapa de contornos TOCSY da cadeia 1 (600 MHz; TFE-d ₂ :H ₂ O 1:1) mostrando conectividades intra-residuais dos tipos: (a) H ^N /H ^α e (b) H ^N /H ^β	66
Figura 3.19. Mapas de contornos NOESY da Cadeia 1 (600 MHz; TFE-d ₂ :H ₂ O 1:1) mostrando conectividades inter-residuais dos tipos: (a) d _{αN} (i, i+1), d _{αN} (i, i+2), d _{αN} (i, i+3) e d _{αN} (i, i+4); (b) d _{NN} (i, i+1) e d _{NN} (i, i+2); (c) d _{βN} (i, i+1) e (d) d _{αβ} (i, i+3).....	67
Figura 3.20. Mapa de contornos ¹³ C- ¹ H HSQC da Cadeia 1 (600 MHz; TFE-d ₂ :H ₂ O 1:1) mostrando conectividades intra-residuais C ^α – H ^α (em destaque correlações do resíduo Gly8).....	68
Figura 3.21. Mapa de contornos ¹⁵ N- ¹ H HSQC da Cadeia 1 (600 MHz; TFE-d ₂ :H ₂ O 1:1) mostrando conectividades intra-residuais entre H ^ε e N ^ε dos resíduos Arg3 e Arg17.....	69
Figura 3.22. Resumo dos tipos de nOe's característicos de forma α-helicoidal presentes no mapa de contornos NOESY do monômero Cadeia 1 em TFE-d ₂ :H ₂ O (1:1).....	71
Figura 3.23. Mapas de contornos TOCSY da Cadeia 2 (600 MHz; TFE-d ₂ :H ₂ O 1:1) mostrando as conectividades intra-residuais dos tipos: (a) H ^N /H ^α e (b) H ^N /H ^β	73
Figura 3.24. Mapas de contornos NOESY da Cadeia 2 (600 MHz; TFE-d ₂ :H ₂ O 1:1) mostrando conectividades inter-residuais dos tipos: (a) d _{αN} (i, i+1), d _{αN} (i, i+2), d _{αN} (i, i+3) e d _{αN} (i, i+4); (b) d _{NN} (i, i+1) e d _{NN} (i, i+2); (c) d _{βN} (i, i+1) e (d) d _{αβ} (i, i+3).....	74
Figura 3.25. Mapa de contornos ¹³ C- ¹ H HSQC da Cadeia 2 (600 MHz; TFE-d ₂ :H ₂ O 1:1) mostrando conectividades intra-residuais C ^α /H ^α	74
Figura 3.26. Mapa de contornos TOCSY da Cadeia 2 (600 MHz; TFE-d ₂ :H ₂ O 1:1) mostrando conectividades intra-residuais de H ^ε com os demais hidrogênios da cadeia lateral de Arg10 e Arg18.....	76
Figura 3.27. Mapas de contornos (a) TOCSY, mostrando conectividades intra-residuais entre os hidrogênios aromáticos da cadeia lateral de Tyr12 e His17 e entre os hidrogênios H _N de Asn22, e (b) ¹³ C- ¹ H HSQC, mostrando conectividades intra-residuais entre hidrogênios e carbonos aromáticos das cadeias laterais de Tyr12 e His17, da Cadeia 2 (600 MHz; TFE-d ₂ :H ₂ O 1:1).....	77
Figura 3.28. Região “Glx” do mapa de contornos TOCSY da Cadeia 2 (600 MHz; TFE-d ₂ :H ₂ O 1:1) mostrando conectividades intra-residuais das cadeias laterais de Glu8, Glu14 e Gln15.....	78
Figura 3.29. Mapa de contornos ¹⁵ N- ¹ H HSQC da Cadeia 2 (600 MHz; TFE-d ₂ :H ₂ O 1:1) mostrando conectividades intra-residuais N/H _N	78

Figura 3.30. Resumo dos tipos de nOe's característicos de formas α -helicoidais obtidas a partir do no mapa de contornos NOESY da Cadeia 2 da distinctina em TFE-d ₂ :H ₂ O 1:1).....	80
Figura 3.31. Conjunto das vinte estruturas mais estáveis resultantes do cálculo de dinâmica molecular da Cadeia 1, com o alinhamento das estruturas na região Gly8-Ile22.....	83
Figura 3.32. Conjunto das vinte estruturas mais estáveis resultantes do cálculo de dinâmica molecular para a Cadeia 2, com o alinhamento das estruturas na região Ser4-Val25.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Sequência do monômero Cadeia 1 da distinctina.....	47
Tabela 2.2. Sequência do monômero Cadeia 2 da distinctina.....	48
Tabela 3.1. Variação da composição da fase móvel com o tempo da análise CH1-C-1, sob um fluxo de 1,0 mL/min.....	50
Tabela 3.2. Variação da composição da fase móvel com o tempo da análise CH1-C-2, sob um fluxo de 1,0 mL/min.....	51
Tabela 3.3. Frações coletadas nas análises cromatográficas das amostras A (Fig. 3.3, p. 52), B (Fig. 3.4, p. 52) e C (Fig. 3.2, p. 51), apresentadas de acordo com seus respectivos tempos de retenção.....	53
Tabela 3.4. Sequência peptídica da cadeia 1 da distinctina, com a ordem de acoplamento dos aminoácidos.....	55
Tabela 3.5. Acompanhamento da síntese da Cadeia 1 – ENREV PPGFT ALIKT LRKCK II-NH ₂	56
Tabela 3.6. Sequência peptídica da Cadeia 2 da distinctina, com a ordem de acoplamento dos aminoácidos.....	57
Tabela 3.7. Acompanhamento da síntese da Cadeia 2 – NLVSG LIEAR KYLEQ LHRKL KNCKV-NH ₂	58
Tabela 3.8. Gradiente utilizado para a purificação da cadeia 1, empregando fluxo de 3,0 mL/min.....	60
Tabela 3.9. Primeiro gradiente utilizado para análise da cadeia 2, empregando fluxo de 3,0 mL/min.....	60
Tabela 3.10. Segundo gradiente utilizado para a análise do produto obtido da síntese da cadeia 2. O fluxo para este gradiente foi de 3,0 mL/min.....	61
Tabela 3.11. Deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ¹ H e de ¹³ C da Cadeia 1 (600 MHz; TFE-d ₂ :H ₂ O 1:1; pH 8,0; 22 °C).....	72
Tabela 3.12. Deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ¹ H e de ¹³ C da Cadeia 2 (600 MHz; TFE-d ₂ :H ₂ O 1:1; pH 8,0; 22 °C).....	81

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 2.1. Preparação da resina amidada, com grupo protetor Fmoc, para a síntese de peptídeos.....	45
Esquema 2.2. Organograma do protocolo utilizado nas sínteses das cadeias 1 e 2 da distinctina.....	46
Esquema 2.3 Representação do protocolo da reação de clivagem dos peptídeos.....	47

APRESENTAÇÃO E OBJETIVOS

Com o objetivo da obtenção de informações sobre os processos de permeabilização de membranas por peptídeos biologicamente ativos e formadores de poros, nosso grupo de pesquisa vem realizando a síntese e a análise conformacional de peptídeos pertencentes às famílias das dermaseptinas e filoseptinas, isolados de anuros brasileiros.

O mecanismo de ação destes peptídeos pode estar vinculado a interações com membranas, sendo ainda pouco conhecido. Diferentes metodologias têm sido empregadas para a análise conformacional de peptídeos, a qual tem sido uma estratégia muito importante na busca de informações sobre suas atividades biológicas, uma vez que muitas destas estão relacionadas a processos de permeabilização de membranas.

Para todas essas análises, quase sempre, são necessárias quantidades relativamente grandes de peptídeos, o que pode restringir o trabalho, pois estes ocorrem na natureza em micro-quantidades.

Este trabalho teve como objetivo:

1- sintetizar pelo método da fase sólida os monômeros da distinctina, um peptídeo heterodimérico e antimicrobiano, isolado de *Phyllomedusa distincta*, originário da Mata Atlântica Brasileira;

2- estudar e determinar a estrutura tridimensional dos monômeros Cadeia 1 e Cadeia 2 da distinctina por dicróismo circular (CD) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN), esta em solução em meio que mimetiza membranas;

3- realizar a análise conformacional das Cadeias 1 e 2 da distinctina, em estado gasoso por três métodos: a partir de informações de homólogos em bancos de dados, por metodologias estatísticas também em bancos de dados e metodologias teóricas em nível de mecânica molecular (MMFF94) e semi-empírico (PM3). O procedimento foi baseado inicialmente na análise estrutural das cadeias tratadas isoladamente (Cadeia 1 e Cadeia 2) para, depois, realizar a análise da distinctina.

A Dissertação consta de três Capítulos:

No Capítulo 1, à guisa de Introdução, é apresentada uma revisão geral sobre aspectos estruturais de peptídeos; peptídeos antimicrobianos; utilização de RMN para cálculo estruturais de biomoléculas; síntese em fase sólida, pela estratégia Fmoc; determinação de estruturas secundárias por CD.

O Capítulo 2 trata da parte experimental e no Capítulo 3 são apresentados os resultados e discussão. Seguem-se as Conclusões e Perspectivas, e, finalmente, as Referências Bibliográficas.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1. ASPECTOS ESTRUTURAIS DOS PEPTÍDEOS

1.1.1. AMINOÁCIDOS

Aminoácidos são biomoléculas abundantes nos organismos vivos, que têm como característica principal as presenças de um grupo amino e um grupo carboxila ligados a um mesmo carbono. A fórmula geral de um aminoácido pode ser representada como na **Figura 1.1**, em que *R* é um grupo denominado cadeia lateral, ligado ao carbono α à carbonila.

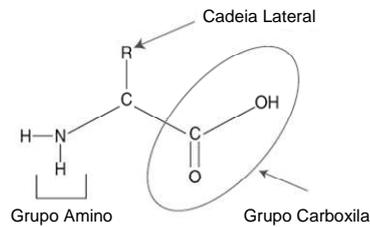


Figura 1.1. Fórmula representando a estrutura geral de um aminoácido, com os grupos amino, carboxila e cadeia lateral explicitados.

Existem vinte aminoácidos que podem ser encontrados em organismos vivos, cujas estruturas são mostradas na **Figura 1.2**. Os aminoácidos diferem entre si somente pelas cadeias laterais, que podem ser polares, incluindo-se tanto grupos neutros quanto positivamente ou negativamente carregados, ou apolares, podendo ser aromáticos ou não. Cada aminoácido pode ser representado por um conjunto de três letras ou apenas por uma letra.

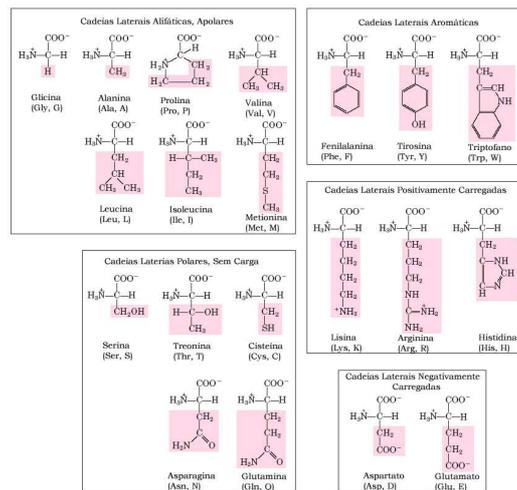


Figura 1.2. Os vinte aminoácidos mais comuns. As fórmulas estruturais mostram o estado de ionização predominante em pH 7,0. As áreas sombreadas em vermelho indicam as cadeias laterais de cada aminoácido. (Nelson e Cox, 2002, p. 92)

1.1.2. PEPTÍDEOS

Embora alguns aminoácidos possuam atividade biológica por si só, a principal função deles é ser monômero de moléculas maiores, como peptídeos e proteínas. Essa polimerização se dá por meio de reações de desidratação envolvendo o grupo amino de um aminoácido com o grupo carboxila de outro, formando-se uma ligação amídica, geralmente denominada ligação peptídica. Quando os aminoácidos encontram-se como parte da estrutura de proteínas, eles passam a ser denominados ‘resíduos de aminoácidos’, como meio de refletir a perda de moléculas de água quando um aminoácido é unido a outro.

Peptídeos são biomacromoléculas que contêm de dois a cerca de cinquenta resíduos de aminoácidos ligados covalentemente entre si por meio de ligações peptídicas. A molécula formada, entretanto, possui um sentido determinado, pois a formação da ligação peptídica gera uma molécula com um grupo amino livre em uma extremidade e um grupo carboxílico na outra extremidade. Por convenção, considera-se que o início da cadeia é a extremidade amino terminal (ou extremidade *N*-terminal) e o fim da cadeia é a extremidade carboxi-terminal (ou extremidade *C*-terminal). A **Figura 1.3** mostra uma representação da formação de um peptídeo.

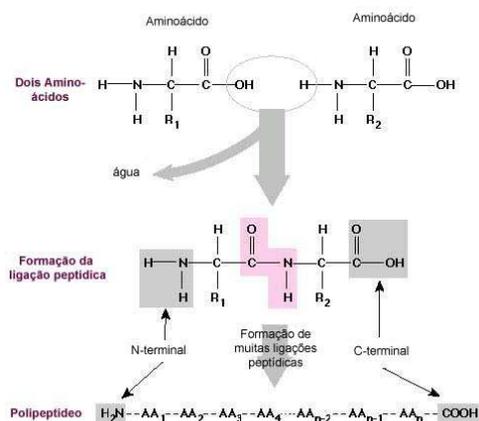


Figura 1.3. Representação esquemática da formação de um polipeptídeo. Modificado de <http://www.science.siu.edu/microbiology/micr302/>.

1.1.2.1. Aspectos estruturais dos peptídeos

Os peptídeos são classificados de acordo com quatro níveis estruturais: estruturas primárias, secundárias, terciárias e quaternárias. Denomina-se estrutura primária apenas a seqüência de resíduos de aminoácidos do peptídeo, em geral representada do grupo *N*-terminal para o *C*-terminal.

A estrutura secundária indica conformação local de alguma porção de um polipeptídeo. Geralmente, estudam-se as estruturas secundárias tendo como base formas, ou padrões, mais recorrentes, sendo que os

mais importantes são a α -hélice e a folha- β . A adoção dessas diferentes formas ocorre devido à variação dos ângulos diedros φ e ψ (**Figura 1.4**) que, por sua vez, é bastante influenciada tanto pelo meio em que se encontra a proteína quanto pela sua estrutura primária.

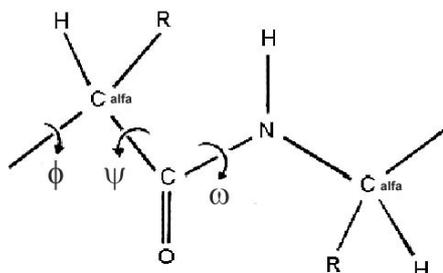


Figura 1.4. Representação dos ângulos de torção dos resíduos de aminoácido.

A forma α -hélice (**Figura 1.5**) é formada de ligações de hidrogênio, através da interação intramolecular entre o oxigênio da carbonila e o hidrogênio do grupo amino das ligações peptídicas. A ligação de hidrogênio proporciona uma hélice em torno de um eixo imaginário, tendo entre cada volta da hélice, uma distância de cerca de 5,4 Å, ou, aproximadamente, 3,6 resíduos de aminoácidos.

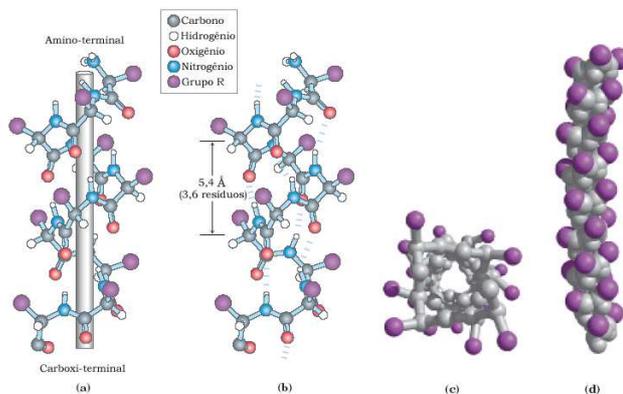


Figura 1.5. Quatro modelos de α -hélice, mostrando diferentes aspectos de sua estrutura. (a) formação de α -hélice em torno de um eixo. (b) modelo bola e vareta, explicitando as ligações de hidrogênio intracadeias. (c) α -hélice vista de uma de suas terminações, olhando-se para baixo através do eixo longitudinal. (d) visão lateral da α -hélice pelo modelo *space filling*. (Nelson e Cox, 2002, p. 127)

A existência de forma helicoidal em proteínas depende das cadeias laterais, desempenhando um papel importante na estabilização ou desestabilização da α -hélice. Resíduos de aminoácidos com cadeias laterais com a mesma carga (positiva ou negativa) que estejam muito próximos entre si podem desestabilizar a forma devido a interações repulsivas. Resíduos de prolina e glicina apresentam normalmente impedimento

para a ocorrência de formas helicoidais. No caso da prolina, o átomo de nitrogênio faz parte de um anel rígido, impedindo a rotação em torno da ligação N—C_α, e, conseqüentemente, a ocorrência de forma helicoidal. Além disso, a ausência de hidrogênio ligado ao nitrogênio do resíduo de prolina não proporciona estabilização de formas helicoidais por ligações de hidrogênio. No caso da glicina, a flexibilidade conformacional desfavorece a forma helicoidal, proporcionando freqüentemente a ocorrência de formas globulares em seqüências polipeptídicas que a contenham. As formas globulares tornam-se mais acentuadas com o aumento do número de resíduos de glicina na seqüência polipeptídica.

A ocorrência de forma helicoidal pode ser influenciada também pelos dipolos elétricos oriundos das extremidades C-terminal, carregado negativamente, e N-terminal, carregado positivamente. Assim, dipolos elétricos presentes nas ligações peptídicas e nas cadeias laterais podem sofrer interações eletrostáticas com as extremidades da cadeia polipeptídicas, desestruturando formas helicoidais.

Na estrutura secundária do tipo folha- β , as cadeias polipeptídicas apresentam uma disposição ziguezague. Essas cadeias podem ser dispostas lado a lado, formando estruturas que se assemelham a folhas. Nesse caso, as ligações hidrogênio são formadas entre resíduos adjacentes das cadeias polipeptídicas. Em muitos casos, as ligações hidrogênio podem ocorrer entre resíduos na cadeia distantes entre si, podendo ocorrer também entre cadeias diferentes. O emparelhamento de resíduos resultante desse tipo de interações pode resultar em dois padrões diferentes de disposição das cadeias laterais: a forma antiparalela e a forma paralela, ambas mostradas na **Figura 1.6**. Na forma antiparalela, as cadeias laterais encontram-se em direções alternadas, enquanto que, na paralela, essas cadeias laterais encontram-se dispostas de forma alinhada.

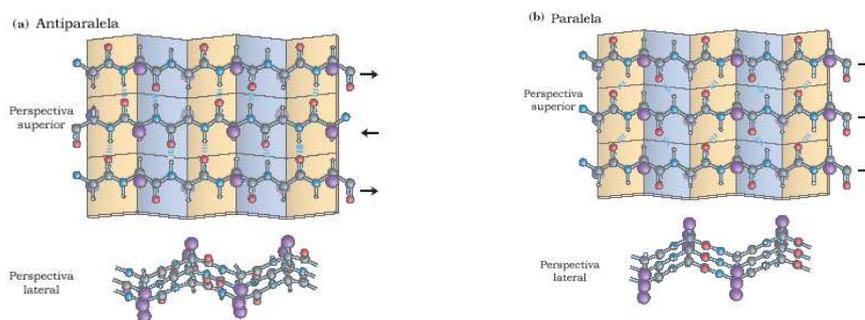


Figura 1.6. Conformações β de cadeias polipeptídicas, mostrando em (a) a conformação β -antiparalela, em que os átomos de carbono, oxigênio e nitrogênio do esqueleto peptídico não se encontram alinhados (como pode ser visto pela perspectiva lateral) e em (b) a conformação β paralela. (Nelson e Cox, 2002, p. 129)

Um outro padrão de estrutura secundária é denominado de dobra β (**Figura 1.7**, p. 6), sendo um elemento de conexão entre fragmentos de resíduos apresentando conformações β -antiparalelas. A estrutura apresenta um dobramento de 180°, envolvendo geralmente quatro resíduos de aminoácido. O oxigênio da



carbonila entre o primeiro e segundo resíduos forma uma ligação de hidrogênio com o hidrogênio do grupo amino entre o terceiro e quarto resíduos. Os demais grupos presentes na seqüência não participam da formação dessa estrutura secundária (**Figura 1.7a**). Um outro tipo de dobra pode também ser formado pela adoção da conformação *cis* de resíduos de prolina, conforme mostrado na **Figura 1.7b**.

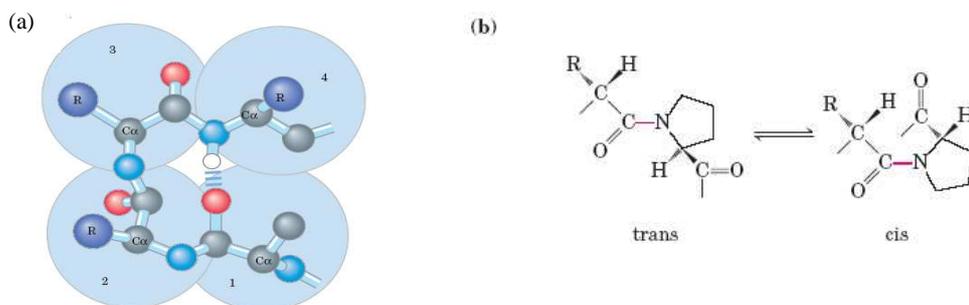


Figura 1.7. (a) estrutura geral de uma dobra β , indicando os quatro resíduos de aminoácidos (representados envoltos nos círculos azuis) que a constituem. (b) formas em que os resíduos de prolina podem se encontrar (*cis e trans*). (Nelson e Cox, 2002, p. 130)

Os resíduos de glicina e prolina aparecem frequentemente nas formas folha- β . No caso da glicina, esse resíduo é pequeno e flexível, enquanto o resíduo prolina adota conformação *cis*. Ambos os casos favorecem o dobramento de cadeias polipeptídicas.

Denomina-se estrutura terciária o arranjo tridimensional de todos os átomos em uma proteína. A estrutura terciária indica o arranjo espacial dos resíduos de aminoácidos adjacentes da estrutura primária, semelhante à estrutura secundária. Porém, indica também interações entre átomos de resíduos que se encontram distantes entre si na estrutura primária. Dessa forma, estruturas terciárias são diferenciadas por interações características envolvendo resíduos de aminoácidos localizados em regiões distantes em uma cadeia polipeptídica.

Polipeptídeos contendo mais de uma cadeia polipeptídica ligadas entre si adotam arranjos com subunidades em complexos tridimensionais. Esse nível mais elevado de organização é denominado estrutura quaternária.

1.2. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE PELE DE ANUROS

Os anfíbios apresentam uma enorme diversidade de peptídeos. Na pele de anuros encontram-se muitos peptídeos biologicamente ativos, sendo os peptídeos antimicrobianos considerados os mais avançados participantes do sistema imunológico desses animais (Boman, H. G., 1995; Zasloff, M., 2002).

Em meados dos anos 2000, foi descrito o isolamento de diversos peptídeos antimicrobianos isolados da pele de anuros da espécie *Phyllomedusa distincta* (Batista, C. V. *et al.*, 1999), dentre eles a distinctina (Batista, C. V. *et al.*, 2001), peptídeo heterodimérico, cuja estrutura primária encontra-se representada na **Figura 1.8**.



Figura 1.8. Sequência peptídica da distinctina, com a representação da ligação dissulfeto entre os resíduos de cisteína.

Considerando os resultados de testes de atividade biológica, verificou-se que a distinctina possui grande atividade antimicrobiana contra diversos tipos de bactéria, *Gram*-positivas ou *Gram*-negativas (Batista, C. V. *et al.*, 2001). Além disso, vários outros estudos foram feitos, como dicroísmo circular (CD) e espectroscopia na região do infravermelho (IV), que indicaram grande presença de estruturas secundárias do tipo folha- β , além da ocorrência em menor escala da estrutura secundária α -hélice (Batista, C. V. *et al.*, 2001). O estudo por ressonância magnética nuclear (RMN) em meio aquoso forneceu estruturas tridimensionais do peptídeo, indicando um forte caráter de α -hélice nas cadeias, porém com uma forte interação entre as moléculas da distinctina, duas a duas, sugerindo a presença do peptídeo na forma tetramérica (Raimondo, D. *et al.*, 2005), conforme mostrado na **Figura 1.9**.

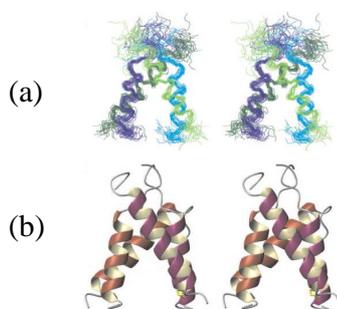


Figura 1.9. Estruturas obtidas por RMN em água do heterodímero distinctina. Em (a) é representado o conjunto de estruturas sobrepostas, visualizando-se somente a cadeia principal das estruturas, com a formação do tetrâmero envolvendo duas moléculas da distinctina. As Cadeias 1 estão representadas em azul-escuro e verde-escuro e as Cadeias 2, em ciano e verde-claro. Em (b) é mostrada a estrutura tetramérica mais representativa, com as Cadeias 1 em roxo e as Cadeias 2 em vermelho (Raimondo, D. *et al.*, 2005).

1.2.1. RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS.

O motivo de se estudarem as preferências conformacionais dessas moléculas reside no fato de a estrutura dos peptídeos antimicrobianos estar intrinsecamente relacionada ao seu mecanismo de ação. Vários

estudos dessa nova classe de substância biologicamente ativa mostraram que muitos desses peptídeos exercem sua atividade por meio de permeabilização de membranas bacterianas (Vogt, T. B *et al.*, 1999; Bechinger, B., 1999). Grande parte desses peptídeos adotam preferencialmente formas α -helicoidais em meios que mimetizam membranas (Wright, P. E., 1989; Wüthrich, K., 1989; Clore, G. M. e Gronenborn, A. M., 1991). Acredita-se que a permeabilização da membrana é facilitada pela adoção dessa estrutura secundária (Westerhoff, H. V. *et al.*, 1989).

O modelo de mecanismo que explica a atividade da maior parte dos peptídeos antimicrobianos é o modelo Shai-Matsuzaki-Huang (SMH) (Matsuzaki, K, 1999; Yang, L. *et al.*, 2000; Shai, Y., 1999) que propõe a interação do peptídeo com a membrana, seguida da deslocalização de lipídeos, alteração da estrutura da membrana e, em alguns casos, a entrada do peptídeo no interior da célula. Entretanto, não se sabe de forma detalhada o mecanismo, especialmente como se dá a interação entre peptídeo e membrana. Para explicar essa etapa, surgiram várias hipóteses, incluindo despolarização da membrana (Westerhoff, H. V. *et al.*, 1989), formação de poros (Yang, L. *et al.*, 2000), ativação de processos como a indução de hidrolases que degradam a parede celular (Bierbraun, G. e Shal, H.-G., 1985), desordenamento da estrutura da bicamada lipídica (Matsuzaki, K, 1999) e destruição da célula por interiorização do peptídeo (Kragol, G. *et al.*, 2001).

Tendo em vista a necessidade de se elucidarem, de forma completa, os mecanismos de ação desses peptídeos, é extremamente necessária a determinação de suas estruturas tridimensionais em condições que mimetizem meios fisiológicos.

1.3. UTILIZAÇÃO DE DADOS DE RMN PARA O CÁLCULO ESTRUTURAL DE PEPTÍDEOS E PROTEÍNAS.

Diferentemente da difração de raios-X, que se aplica somente a monocristais, a ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica que tem sido usada de forma crescente para a elucidação estrutural de biomacromoléculas como peptídeos, proteínas e ácidos nucléicos em diversos meios (Cavanagh, J. *et al.*, 2006). Apenas oito anos após a primeira descrição do efeito de RMN por Isidor Rabi em 1938, estudos de elucidação estrutural de moléculas orgânicas foram realizados com amostras sólidas e líquidas. Em 1954, Jacobson e colaboradores utilizaram pela primeira vez a RMN para estudar uma biomacromolécula, investigando o efeito do solvente nas propriedades do DNA (Jacobson *et al.*, 1954). Nesse estudo empregando RMN de ^1H , verificou-se que a alta viscosidade presente em soluções de DNA se deve à formação de camadas de hidratação com uma ordenação superior à da água pura. Em 1957 foi obtido o primeiro espectro de RMN de ^1H de uma proteína, a ribonuclease (Saunders, M. *et al.*, 1957). Até 1965

foram publicados 30 trabalhos descrevendo aplicações da RMN a biomacromoléculas. No início da década de 1970 havia 200 publicações e, em 1980, esse número se aproximava a 4.000 publicações, utilizando informações dos espectros de RMN em uma dimensão (RMN 1D) para investigar propriedades específicas dessas estruturas (Güntert, P., 1998).

Os primeiros trabalhos que utilizaram a RMN para a obtenção de estruturas tridimensionais de biomacromoléculas datam do início da década de 1980. A determinação estrutural do glucagon (Braun, W. *et al.*, 1981) e o estudo conformacional de uma insetotóxina de escorpião em solução aquosa (Arseniev, A. S. *et al.*, 1984) foram realizados aplicando-se RMN e a metodologia de restrições conformacionais. Um trabalho de maior complexidade foi realizado por Zuiderweg e colaboradores, que analisaram a influência do *lac repressor* na estrutura de três cadeias na forma α -helicoidal (Zuiderweg, E. R. P. *et al.*, 1984). Posteriormente, foram realizadas a elucidação estrutural da aI-purotionina, com resultados similares à obtida por difração de raios-X (Clare, G. M. *et al.* 1986) e a determinação do inibidor protease IIA (Williamson, M. P. *et al.*, 1985).

A partir de meados da década de 1980, verificou-se o uso crescente de RMN em duas dimensões (RMN 2D) na análise tridimensional de biomacromoléculas. Apesar da conversão de dados obtidos dos mapas de contornos de RMN em informações estruturais não ser um procedimento trivial, o uso de métodos computacionais, incluindo refinamentos baseados em simulações teóricas, tem sido uma ferramenta importante nesses estudos. Esses métodos computacionais tiveram maior aceitação após a determinação estrutural do tendamistato por RMN (Kline, A. D. *et al.*, 1986), com resultados similares aos obtidos por raios-X (Pflugrath, J. *et al.*, 1986). Nessa mesma época, Wüthrich introduziu a metodologia de atribuição sequencial, baseada na identificação de seqüências únicas de resíduos em cadeias polipeptídicas e de ácidos nucléicos (Wüthrich, K., 1986). Através dessa metodologia pôde-se sistematizar a obtenção de informações estruturais dos mapas de contornos de RMN 2D. Desde então, a espectroscopia de RMN e sua aplicação nos estudos de biomacromoléculas desenvolveram-se consideravelmente, obtendo-se espectros em aparelhos de altas resoluções e mapas de contornos multidimensionais sem sobreposição de sinais.

Atualmente, uma crescente diversificação de técnicas de RMN combinadas a métodos computacionais tem sido verificada para determinação estrutural de biomacromoléculas, justificando uma revisão dos seus usos em análises configuracional e conformacional. Assim sendo, nesta revisão são descritas as principais metodologias da RMN na determinação estrutural de peptídeos, abordando as restrições conformacionais a partir de dados de RMN, as informações estruturais contidas em mapas de contornos de RMN 2D, a análise sistemática de conformações locais, as consistências dos dados para atribuições estereoespecíficas não determinadas diretamente pelos dados de RMN, a conversão dos parâmetros obtidos experimentalmente em informações tridimensionais, cálculos teóricos de otimização de geometria das estruturas resultantes e as metodologias de análise para validar ou não o modelo final.

1.3.1. ANÁLISE DOS DADOS DE RMN NA DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL

A RMN é empregada comumente para a análise conformacional de estruturas de massas moleculares pequenas. Os dados dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C em uma ou mais dimensões (técnicas ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H NOESY, ^1H - ^{13}C HSQC e ^1H - ^{13}C HMBC) fornecem informações muito precisas sobre a estrutura das moléculas. Nesse caso, modelos estruturais são criados, satisfazendo ao máximo as informações fornecidas pela RMN.

No caso de biomacromoléculas, são empregadas também as técnicas ^1H - ^1H TOCSY e ^{15}N - ^1H HSQC. Os sinais de RMN são atribuídos para identificar os resíduos de aminoácidos ou nucleotídeos. Os sinais devidos ao efeito nuclear Overhauser (nOe), obtidos pela técnica NOESY, indicam as interações espaciais entre esses resíduos, além das restrições conformacionais da estrutura (Wüthrich, K., 1986). No entanto, deve-se considerar que essa técnica registra normalmente uma média entre as possíveis conformações em equilíbrio, pois o tempo de interconversão conformacional apresenta-se normalmente menor do que o tempo de resolução do espectrômetro de RMN, e as distribuições de probabilidade de conformações moleculares são virtualmente impossíveis de serem obtidas (Hendrickson, W. A., 1981; Case, D. A., 1981; van Gunsteren, W. F. *et al.*, 1999; Barsukov, I. L. e Lian, L.-Y., 1993). Além disso, os parâmetros obtidos por RMN são também afetados por esse aspecto dinâmico do sistema analisado, o que diminui consideravelmente a precisão dos valores desses parâmetros tais como distâncias interatômicas e ângulos diedros (Nilges, M., 2001). Neste caso, utilizam-se intervalos prováveis de valores dos parâmetros, constituindo-se em restrições conformacionais especificados pelos valores limites inferior (l) e o superior (u). No entanto, essas restrições não são suficientes para definir estruturas de biomacromoléculas (Güntert, P., 1998).

Assim sendo, informações sobre estruturas primárias, comprimentos das ligações, ângulos de ligação, quiralidade, planaridade de grupos e repulsões estéricas entre átomos não ligados tornam-se necessárias para a determinação estrutural de biomacromoléculas. Esses outros parâmetros devem ser considerados na análise, com estruturas covalentes mantidas por potenciais em campos de força apresentando ângulos de torção e repulsões estéricas entre grupos não ligados (separados por três ou quatro ligações).

1.3.1.1. O Efeito Nuclear Overhauser e as Restrições de Distâncias Interatômicas

O efeito nuclear Overhauser (nOe) fornece informações importantes sobre qual sinal de ressonância corresponde a um núcleo que está próximo espacialmente de um outro numa molécula. Os dois núcleos magneticamente ativos comportam-se como dois pólos magnéticos. Mesmo que na molécula os dois núcleos estejam distantes entre si por várias ligações covalentes, a aproximação espacial entre eles pode ser

registrada, por exemplo, pela técnica NOESY. Esta permite inferir sobre disposições espaciais de sítios em uma molécula e, conseqüentemente, propicia sua análise conformacional (Rule, G. S. e Hitchens., T. K., 2006; Kumar, A. *et al.*, 1980; Macura, S. e Ernst, R. R., 1980). O sinal de nOe registrado apresenta um volume (V) proporcional à distância (r) entre os dois núcleos que interagem entre si no espaço via momento magnético, conforme a Equação 1. A função que envolve tempos de correlação, $f(\tau_c)$, inclui efeitos globais e movimentos internos da molécula e a média de r (distância entre dipolos magnéticos) indica que as distâncias interatômicas variam devido ao aspecto dinâmico do sistema e, portanto, deve-se utilizar uma média desses valores. A obtenção do valor médio de r não é, todavia, trivial. Os nOe's medidos são uma média temporal de um grande conjunto de estruturas e os limites superiores e inferiores das restrições são distâncias instantâneas. Foram propostas diversas metodologias para se obter essa média, entre elas uma média temporal de restrições de distância (van Gunsteren, W. F. *et al.*, 1994), média do conjunto de estruturas (Kemink, J. e Scheek, R. M.; 1995) e refinamentos de dinâmica molecular com espaço conformacional restrito (Brüschweiler, R. 1992). As intensidades dos sinais são quantificadas por meio do cálculo dos volumes dos picos, obtidos por integração sobre a área do sinal. Esse procedimento é preferível à correlação da intensidade à altura do pico, uma vez que as linhas de base podem variar bastante para cada ressonância.

$$V = \langle r^{-6} \rangle f(\tau_c) \quad (1)$$

A conversão dos sinais de nOe's em distâncias não é trivial, pois a Equação 1 não leva em consideração a difusão de *spin* e as trocas químicas. Esses efeitos podem ser pouco significativos quando, durante o experimento para detecção do espectro, se utiliza um tempo de mistura (t_m) adequado. No entanto, outros efeitos podem ser determinantes, principalmente aqueles relativos ao aspecto dinâmico do sistema. Neste caso, podem-se utilizar diversas formas de restrições conformacionais. Um artifício seria classificar os nOe's de acordo com suas intensidades. Sinais intensos (nOe forte) e de médias intensidades (nOe médio) são atribuídos para tempos de mistura de aproximadamente 50 ms. No caso de nOe fraco, o sinal é visível somente em tempos de mistura mais longos. Para as três classes atribui-se o mesmo valor de limite mínimo ($l = 1,8 \text{ \AA}$), porém atribuindo valores diferentes para os limites máximos: nOe's fortes, médios e fracos têm-se $u = 2,8, 3,4$ e $5,0 \text{ \AA}$, respectivamente (Clare, G. M. *et al.*, 1986; Williamson, M. P. *et al.*, 1985; Evans, J. N. S., 1995).

Um outro artifício mais quantitativo de restrições conformacionais utiliza curvas de calibração baseadas na Equação 1, descrevendo relações entre os parâmetros V e u através de uma constante de proporcionalidade k ou k' , conforme Equações 2 a 4 (p. 12). A Equação 2 (p. 12) é muito utilizada na análise de nOe's dos núcleos da cadeia principal da molécula. Por sua vez, curvas de calibração mais conservativas

são obtidas a partir das Equações 3 e 4, sendo mais adequadas para nOe's relativos a núcleos periféricos de cadeias laterais (Güntert, P., 1998; Güntert, P. *et al.*, 1991).

$$V = \frac{k}{u^6} \quad (2)$$

$$V = \frac{k}{u^n} \quad n = 4, 5 \quad (3)$$

$$V = \frac{k}{u-l} \int_l^u \frac{dr}{r^6} = \frac{k'}{u-l} \left(\frac{1}{l^5} - \frac{1}{u^5} \right) \quad (4)$$

Em todos os casos torna-se necessário determinar o valor de k , utilizando-se um padrão de distância interno da estrutura. Por exemplo, a distância entre os hidrogênios H^e e H^d de um resíduo de tirosina (2,48 Å) pode ser um padrão de distância interno. Neste caso, um sinal de nOe relativo à interação entre H^e e H^d teria uma intensidade correspondente a uma distância igual ao valor de u (Evans, J. N. S., 1995). A partir dessa informação, e da Equação 2, obtém-se o valor de k e, em consequência, dos demais valores de u . O valor de limite mínimo pode ser considerado com $l = 0,95$ Å para hidrogênios amídicos e $l = 1,0$ Å para os demais tipos de hidrogênios, 1,35 Å para carbonos aromáticos, 1,4 Å para os demais carbonos, 1,3 Å para nitrogênio, 1,2 Å para oxigênio e 1,6 Å para átomos de enxofre e fósforo (Braun, W. e Gō, N., 1985).

Sinais de nOe de núcleos relativamente próximos podem sofrer diminuição de intensidade ou mesmo não ser registrados devido a movimentos internos da estrutura, bem como a trocas químicas. Por isso, a ausência de sinais de nOe não sugere necessariamente restrições espaciais para análise conformacional. Caso assim fosse, a ausência de sinais de nOe levaria a limites mínimos de restrição (l) pouco confiáveis e a confôrmeros mal-interpretados (Nilges, M., 2001).

1.3.1.2. Constantes de Acoplamento Escalar e as Restrições de Ângulos Diedros

Em 1963, Karplus propôs uma relação entre ângulos diedros (θ , **Figura 1.10**, p. 13) e constantes de acoplamento escalar 3J de dois núcleos (Equação 5) (Karplus, M., 1963). As constantes A , B e C podem ser determinadas pelo ajuste da Equação 5 para valores de 3J obtidos experimentalmente. Assim, proteínas com estruturas conhecidas e valores de 3J descritos na literatura (Berman, H. M. *et al.*, 2003) podem servir de ponto de partida para obter valores de θ e informações importantes sobre restrições espaciais na análise estrutural de análogas.

$$^3J(\theta) = A \cos^2 \theta + B \cos \theta + C \quad (5)$$

Semelhantemente às medidas de distâncias interatômicas estimadas por nOe's, a determinação de θ a partir dos valores de 3J pode ser afetada por diversas variáveis e deve-se considerar que as curvas de Karplus (Figura 1.10) são aproximações de dados experimentais. Desta forma, as restrições de ângulos diedros fornecidas pelos valores de 3J devem ser combinadas com as restrições de distância sugeridas pelos valores de nOe para resultar em informações importantes sobre conformações locais (Sutcliffe, M. J., 1993).

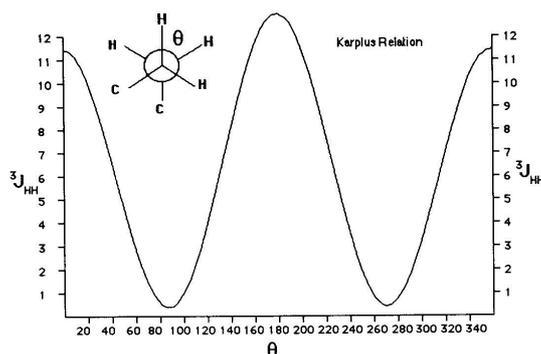


Figura 1.10. Curva representando as Relações de Karplus para 3J em relação ao ângulo de torção θ . (Evans, 1995, p. 30).

Acoplamentos *spin-spin* podem ser observados também para *spins* conectados por ligações de hidrogênio ou por interações covalentes, como, por exemplo, as constantes dos acoplamentos ${}^{2h}J(C'-HN)$ e ${}^{3h}J(C'-N)$ (Case, D. A., 2000; Barnwal, R. P. *et al.*, 2007). Partindo desses tipos de acoplamento, mais especificamente ${}^{3h}J(C'_{i-1}-H\alpha)$, ${}^{3h}J(C'_{i-1}-C\beta)$ e ${}^3J(HN-H\alpha)$, podem ser estimados os ângulos diedros φ e ψ . Por sua vez, os valores de ${}^3J(H\alpha-H\beta)$, ${}^{3h}J(N-H\beta)$ e ${}^{3h}J(C'-H\beta)$ podem estimar o valor do ângulo diedro χ^1 (Figura 1.11), bem como as restrições espaciais relativas às cadeias laterais. Apesar de fornecer informações sobre conformações locais, os valores de 3J podem ser importantes para definir de forma estereoespecífica os hidrogênios diastereotópicos, além de estimar ângulos de torção de diferentes confômeros.

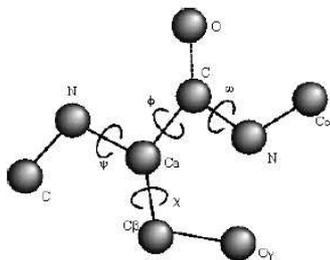


Figura 1.11. Relação dos ângulos diedros do peptídeo, mostrando os ângulos χ , relativos às cadeias laterais.

Como as constantes de acoplamento escalar manifestam-se na estrutura fina dos mapas de contornos de RMN 2D, os valores de 3J podem ser estimados a partir dos desdobramentos registrados em espectros de anti-fase, como o DQF COSY, TQF COSY e E.COSY (Mujeeb, A. *et al.*, 1999; Griesinger, C. *et al.*, 1985). Os valores de J podem ser estimados também a partir das intensidades dos sinais modulados de J nos espectros de uma série de estruturas (Neri, D. *et al.*, 1990) ou a partir de experimentos J -multiplicados como o MJ-HSQC (Heikkinen, S. *et al.*, 1999; Xia, Y. *et al.*, 2000).

1.3.1.3. Correlações obtidas pela técnica ^{15}N - ^1H HSQC e as Restrições de Ligação de Hidrogênio

As restrições conformacionais devidas a ligações de hidrogênio sofrem normalmente um efeito determinante sobre a conformação global da estrutura, podendo ser consideradas independentemente das restrições obtidas por nOe. Os sítios envolvidos em ligação de hidrogênio podem ser determinados através de fenômenos de troca química em RMN (Konrat, R. *et al.*, 1999). No estudo de biomacromoléculas em solução, os hidrogênios amídicos que não apresentam ligação de hidrogênio sofrem trocas químicas por hidrogênios do solvente. Em solventes próticos deuterados, os sinais desses hidrogênios apresentam diminuição da intensidade ou, até mesmo, não são registrados nos mapas de contornos ^{15}N - ^1H HSQC.

Núcleos envolvidos em ligação de hidrogênio apresentam menor disponibilidade para troca química e, portanto, menor taxa temporal de diminuição de sinal em relação a núcleos não envolvidos em ligação de hidrogênio (Clarke, J. e Itzhaki, L. S., 1998). Assim sendo, medidas de intensidade de sinais obtidos pela técnica ^{15}N - ^1H HSQC podem ser obtidas em intervalos de tempo, indicando os sinais de menores taxas de diminuição, que correspondem a núcleos envolvidos em ligação de hidrogênio.

Os hidrogênios amídicos de peptídeos apresentam menores taxas de diminuição de intensidade de sinais obtidos por ^{15}N - ^1H HSQC, indicando serem sítios envolvidos em ligação hidrogênio. As taxas de trocas químicas nessas biomacromoléculas são influenciadas fortemente pelo pH e pela temperatura do meio, além do tipo de estruturas secundária e terciária presentes (Cordier, F. e Grzesiek, S., 2002).

Apesar das informações obtidas por ^{15}N - ^1H HSQC serem importantes na análise estrutural, a combinação com a análise de mapas de contornos NOESY faz-se necessária para se obterem informações sobre os demais átomos que participam de ligações de hidrogênio. Assim, um par de restrições de distâncias interatômicas deve ser considerado para haver uma ligação de hidrogênio efetiva. No caso de nOe's característicos de estruturas α -helicoidais em peptídeos, o hidrogênio amídico do resíduo i apresenta ligação de hidrogênio com o oxigênio carbonílico do resíduo $i-4$. As distâncias interatômicas entre esses átomos devem ser entre 1,8 a 2,0 Å e a distância entre o nitrogênio amídico e o oxigênio carbonílico entre 2,7 e 3,0 Å (**Figura 1.12**, p. 15).

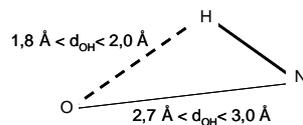


Figura 1.12. Limites de valores de distância para as restrições de ligação de hidrogênio.

As restrições de ligação de hidrogênio podem ser estimadas também por restrições de distância obtidas por NOESY. Normalmente, essas restrições tornam-se importantes em etapas iniciais da análise conformacional de peptídeos com grande número de resíduos de aminoácidos. Além disso, podem ser empregadas usualmente no estudo de fragmentos de peptídeos onde não há informações suficientes para análise conformacional, especialmente em sítios apresentando estruturas secundárias do tipo α -hélice ou 3_{10} -hélice.

As constantes de acoplamento escalar, como exemplo ${}^2hJ(\text{C}'\text{-HN})$ e ${}^3hJ(\text{C}'\text{-N})$, fornecem também informações de restrições por ligações de hidrogênio. Embora esses acoplamentos estejam relacionados a valores relativamente baixos de constantes de acoplamentos escalares, pode-se inferir sobre a existência de ligações de hidrogênio na região molecular especificada, os átomos envolvidos neste tipo de interação e, até mesmo, os comprimentos de ligação (Cornilescu, G. *et al.*, 1999).

1.3.1.4. Acoplamento Dipolar Residual e as Restrições Orientacionais

As restrições conformacionais a curta distância descritas nos itens 2.1 a 2.3 são importantes na análise conformacional de peptídeos globulosos. No caso de peptídeos com disposições espaciais relativamente menos globulosas, informações sobre restrições conformacionais a longas distâncias envolvendo principalmente suas extremidades devem ser consideradas na análise conformacional (Clare, G. M. *et al.*, 1999). O acoplamento dipolar entre núcleos pode ser usado para a obtenção de informações sobre estruturas de moléculas em líquidos, pois permite inferir sobre interações à longa distância que dependem tanto da distância entre dipolos magnéticos quanto de suas orientações em relação ao campo magnético externo \mathbf{B}_0 . Essa propriedade pode ser estimada pela constante de acoplamento dipolar entre dois núcleos, dada pela Equação 6 (p. 16). O termo D_{ij}^{res} é a contribuição dipolar do desdobramento da ressonância observada para um par de núcleos i e j cujos spins se encontram acoplados, μ_0 é a permeabilidade do vácuo γ_i e γ_j são respectivamente as razões giromagnéticas para os spins de i e j , $r_{ij,ef}$ é a distância interatômica efetiva entre i e j e $P_2(\cos\theta(t))$ é a função de Legendre do ângulo θ entre o ij -ésimo vetor interatômico e o vetor campo magnético externo \mathbf{B}_0 . O termo P_2 deve ser tratado como uma média por ser uma variável com dependência temporal. Esse termo é nulo para amostras em soluções anisotrópicas, pois quando submetidas a um campo

\mathbf{B}_0 não adquirem ordenação devido à rotação das moléculas e ao movimento browniano (Lipsitz, R. S. e Tjandra, N., 2004).

$$D_{ij}^{res} = -\left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right) \frac{\gamma_i \gamma_j \hbar}{2\pi^2 r_{ij,ef}^3} \langle P_2(\cos \theta(t)) \rangle \quad (6)$$

Biomacromoléculas sob a forma cristalina apresentam restrições de movimento e alinhamento total dos vetores internucleares em um campo \mathbf{B}_0 , resultando em acoplamentos dipolares muito grandes, a ponto de interferirem na análise de RMN. Portanto, em soluções anisotrópicas e na forma cristalina, torna-se usualmente difícil a medida do acoplamento dipolar. Entretanto, amostras podem ser ordenadas em meios líquidos fracamente orientados como cristais líquidos e bicelas, fornecendo acoplamentos dipolares pequenos e mensuráveis, que são denominados de acoplamentos dipolares residuais (RDC). Esse acoplamento está relacionado à colisão entre moléculas da amostra e do solvente, resultando em uma ordenação mínima e RDC mensurável (Tjandra, N. e Bax, A., 1997a; Hansen, M. R. *et al.*, 1998; Bendiak, B., 2002; Freudenberger, J. C. *et al.*, 2004; Freudenberger, J. C. *et al.*, 2005). Os RDCs podem ser medidos através dos mapas de contornos $^{15}\text{N} - ^1\text{H}$ HSQC ou $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ HSQC sem desacoplamento na dimensão do carbono ou nitrogênio, respectivamente (**Figura 1.13**).

Vários desdobramentos de sinais de ressonância podem ser observados em soluções isotrópicas e as distâncias entre as linhas destes sinais fornecem constantes de acoplamento escalar das ligações N-H ou C-H. Por outro lado, em meios que geram orientações parciais, as distâncias entre os desdobramentos correspondem à soma do acoplamento escalar com o acoplamento dipolar residual (Tjandra, N. e Bax, A., 1997b; Ottiger, M. *et al.*, 1998). Entretanto, no caso de obtenção dos sinais de ressonância por mapas de contornos J -modulados, conforme mencionados na seção 2.2, a aquisição de informações de RDC é dificultada, uma vez que tem-se diminuição da resolução espectral, o que aumenta a largura das linhas.

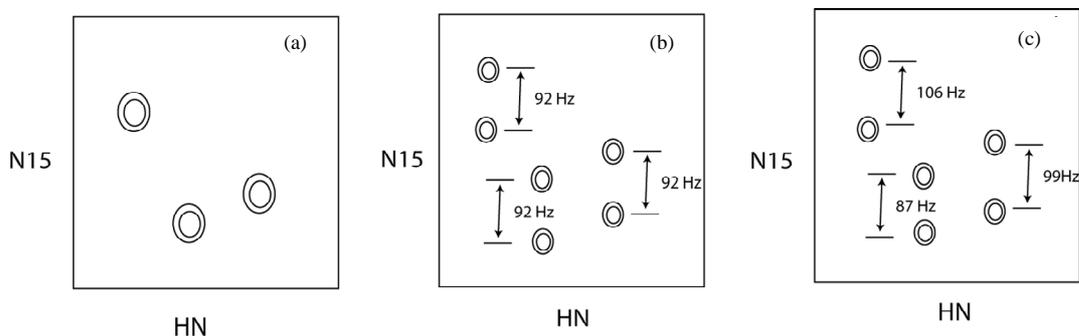


Figura 1.13. Mapas de contornos HSQC: (a) desacoplado em ambas as dimensões, com desdobramentos $^{15}\text{N}-^1\text{H}$ não observados; (b) sem desacoplamento na dimensão ^{15}N , em solução isotrópica, com desdobramentos $^{15}\text{N}-^1\text{H}$ iguais ao acoplamento escalar $^{15}\text{N}-^1\text{H}$ (~92 Hz); (c) sem desacoplamento na dimensão ^{15}N , meio parcialmente orientador, desdobramentos $^{15}\text{N}-^1\text{H}$ somados aos RDCs.

Recentemente, foi proposta a utilização de espectros J -evoluídos, em vez de J -modulados, empregando a técnica JE-N-BIRD^{dX}-HSQC, que permite maior resolução de sinais anteriormente não-resolvidos (Furrer, J. *et al.*, 2007). Além disso, uma outra técnica de medir RDC foi utilizada recentemente através dos mapas de contornos anti-fase (Prestegard, J. H. *et al.*, 2005).

O RDC pode ser quantificado pela orientação de eixos internucleares em relação a um campo magnético. Através dos valores de D_{ij}^{res} podem ser obtidos os respectivos valores de θ e utilizados para refinar o conjunto final de estruturas. Os valores relativos de RDC não dependem da distância entre pares de ligação como, por exemplo, para um par de ligações ¹⁵N – ¹H. Esses valores indicam somente a orientação relativa ao campo magnético dos vetores interatômicos, independente de esses pares serem adjacentes ou se encontrem em extremidades opostas na estrutura (Prestegard, J. H. *et al.*, 2000).

Normalmente, os valores de RDC são medidos para acoplamentos através de uma ligação. Como os valores de RDC dependem das distâncias interatômicas, torna-se apropriado definir uma ligação específica, pois a distância não sendo variável não deve interferir na medida do seu valor. O acoplamento através de duas ligações pode ser estimado também, embora não haja variações significativas nas distâncias interatômicas. Para acoplamentos referentes a três ou mais ligações, os valores de RDC tornam-se dependentes também dos ângulos diedros envolvidos, tornando o tratamento dos dados mais laborioso.

O RDC pode fornecer também informações estruturais através do cálculo por recozimento simulado (*simulated annealing*) como funções de penalidade (Equação 7), onde W é o peso de cada contribuição dipolar residual e $D_{i,calc}$ e $D_{i,obs}$ são os desdobramentos calculados e experimentais para a estrutura, respectivamente. Essa função de penalidade, chamada também de pseudo-energia, é adicionada às energias das distâncias moleculares normais. Assim sendo, as restrições de nOe e um mínimo de energia são procurados pelo protocolo de recozimento simulado.

$$E_{DD} = W \sum_i (D_{i,calc} - D_{i,obs})^2 \quad (7)$$

Outras informações estruturais podem ser obtidas através de alinhamentos de fragmentos da estrutura, baseados na sobreposição dos principais tensores de ordem determinados para esses fragmentos individuais. Neste caso, a estrutura é decomposta em um conjunto de pequenos fragmentos moleculares. Na condição de alinhamento parcial, podem ser introduzidos os valores de tensores de ordem obtidos experimentalmente em uma geometria de eixos arbitrários. Por meio de matrizes de ordem de acoplamentos dipolares, podem ser obtidas as estruturas desses fragmentos nos eixos dos tensores determinados experimentalmente (Prestegard, J. H., 2000; Quine, 2004).

1.3.1.5. Deslocamentos Químicos e as Informações Estruturais

Deslocamentos químicos (δ) são parâmetros extremamente sensíveis ao ambiente em que se encontra o núcleo. Assim sendo, as conformações locais, bem como os ângulos diedros φ e ψ , contribuem significativamente para os valores de $\delta_{C\alpha}$, $\delta_{H\alpha}$, $\delta_{C\beta}$, e δ_C (Wishart, D. S. e Nip, A. M., 1998; Sibley, A. B. *et al.*, 2003). Os valores de δ_N da cadeia principal são influenciados significativamente pela estrutura primária, principalmente pelas características dos resíduos vizinhos. O valor de δ_C do carbono carbonílico do i -ésimo resíduo é afetado significativamente pelo resíduo $i+1$ (Spitzfaden, C. *et al.*, 1994; Yao, J. *et al.*, 1997), conforme a nomenclatura usual para resíduos de aminoácidos em peptídeos, apresentada na **Figura 1.14**. Com exceção de resíduos de prolina, os valores de $\delta_{C\alpha}$ e $\delta_{C\beta}$ não são afetados marcadamente pela estrutura primária ou substituinte aromático nas cadeias laterais. As estruturas secundárias têm um forte efeito sobre o valor do deslocamento químico do hidrogênio $H\alpha$. O valor de $\delta_{H\alpha}$, por exemplo, apresenta-se 0,39 ppm menor em formas α -hélice do que em formas desestruturadas. Em formas folhas- β , o valor de $\delta_{H\alpha}$ torna-se 0,37 ppm maior em relação à forma desestruturada (Pastore, A. e Saudek, V., 1990; Wishart, D. S. *et al.* 1991; Osapay, K. e Case, D. A., 1994; Szilágyi, L., 1995).

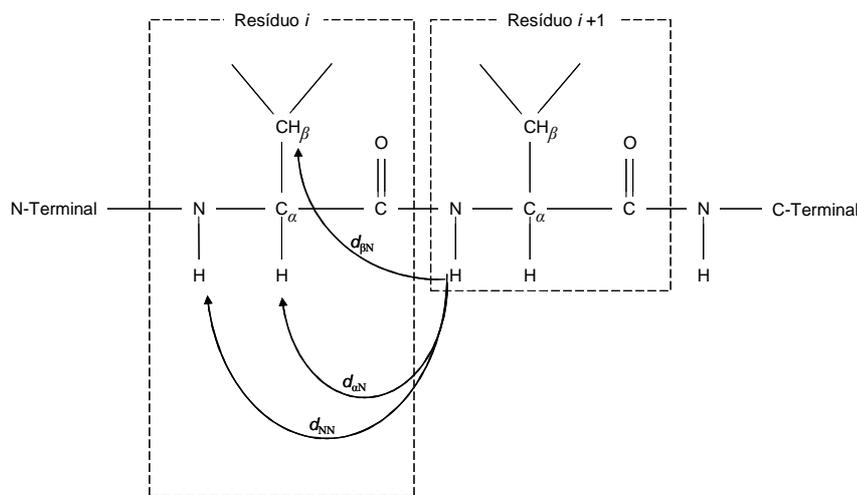


Figura 1.14. Representação das possíveis interações entre hidrogênios intraresiduais e suas correspondentes notações.

Muitas vezes os dados de deslocamentos químicos não são suficientes para a análise conformacional, pois não dependem de variáveis espaciais definidas como as observadas para nOe 's e 3J . No entanto, esses dados podem ser utilizados para refinamento estrutural, previsão de estruturas secundárias, inferência de ângulos diedros da cadeia principal e identificação de estruturas similares para validação da análise conformacional (Sprangers, R. *et al.*, 2000; Cornilescu, G. *et al.*, 1999).

Apesar dos bancos de dados de RMN, tais como BMRB e RefDB, fornecerem deslocamentos químicos de biomacromoléculas, muitos desses valores apresentam-se pouco precisos ou não foram atribuídos corretamente (Wihsart, D. S. e Case, D. A, 2001). Diversos métodos estatísticos foram desenvolvidos para avaliar e corrigir esses valores (Wang, L. *et al.*, 2007; Neal, S. *et al.*, 2003; Zhang, H. *et al.*, 2003; Ginzinger, S. W. *et al.*, 2007; Wang, Y. e Wishart, D. S., 2005). Algumas restrições de conformações locais de resíduos podem ser estabelecidas a regiões α -hélices ou folhas- β do diagrama de Ramachandran. Além disso, a utilização de potenciais pode ser incluída aos dados de deslocamento químico para a análise conformacional.

A determinação das estruturas secundárias pode ser realizada através do índice de deslocamento químico (CSI) (Wihsart, D. S. *et al.*, 1992). Esse índice consiste na comparação de deslocamentos químicos de um determinado núcleo em cada resíduo da cadeia polipeptídica com deslocamentos químicos desse núcleo em estruturas randômicas presentes em bancos de dados. Geralmente, o CSI é utilizado para o hidrogênio H_{α} . No caso da variação do valor de $\delta_{H_{\alpha}}$ em relação ao valor de referência ($\Delta\delta_{H_{\alpha}}$) for entre $\pm 0,1$ ppm, atribui-se um índice igual a zero. Quando $\Delta\delta_{H_{\alpha}} > +0,1$ ppm atribui-se um índice de +1 e $\Delta\delta_{H_{\alpha}} < -0,1$ ppm para um índice de -1. A **Figura 1.15** mostra um diagrama da posição dos resíduos na cadeia contra os valores de CSI obtido para a estrutura ARC Repressor. Os agrupamentos densos de índices -1 não interrompidos por índices “+1” são considerados como evidências de formas α -hélice. Por sua vez, os agrupamentos densos de índices “+1” não interrompidos por índices “-1” são considerados como evidências de formas folha- β .

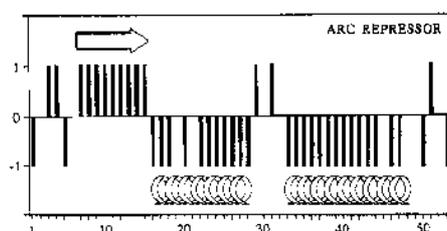


Figura 1.15. Diagrama de valores de CSI para cada resíduo da seqüência do peptídeo ARC Repressor, com representação das estruturas secundárias (Wishart, D. S. *et al.*, 1992).

1.3.2. METODOLOGIAS TEÓRICAS DE CONVERSÃO E INTERPRETAÇÃO DOS DADOS DE RMN

1.3.2.1. O Uso da Dinâmica Molecular nas Otimizações de Geometria

O emprego do método de dinâmica molecular (DM) na otimização de geometria de biomacromoléculas obtidas por RMN foi realizada pela primeira vez em meados da década de 1980

(Kaptein, R. *et al.*, 1985; Clore, G. M. *et al.*, 1986; Brünger, A. T. *et al.*, 1986). Esse método requer menor tempo computacional e converge frequentemente ao mínimo global, devido a componentes de energia cinética utilizadas no cálculo. Entretanto, a otimização de geometria por DM está relacionada à evolução das conformações em um determinado intervalo de tempo, podendo resultar em informações estruturais distintas daquelas obtidas pelos dados de RMN (Güntert, P., 1998). Para a determinação estrutural por RMN, no entanto, a dimensão temporal não é importante nessa etapa de otimização de estrutura. Foram adotados, então, métodos que possuem a mesma capacidade de aproximar-se de um mínimo global que a DM.

O método de recozimento simulado (*simulated annealing*, SA) é um procedimento de minimização de energia por DM. O método é baseado em uma técnica comum em metalurgia para preparo de estruturas metálicas mais estáveis através de um aquecimento rápido do metal e, subsequentemente, resfriamento lento e controlado. No estudo de biomacromoléculas, essa variação de temperatura é simulada teoricamente, mostrando bastante eficiente para a obtenção de estruturas estáveis (Brünger, A. T. *et al.*, 1990).

A **Figura 1.16** mostra esquematicamente as mudanças de conformação sofridas durante uma simulação de SA. Como resultado, seria esperada a obtenção de geometrias com energias próximas ao do mínimo global da estruturas estudadas (Nilges, M. *et al.*, 1988).

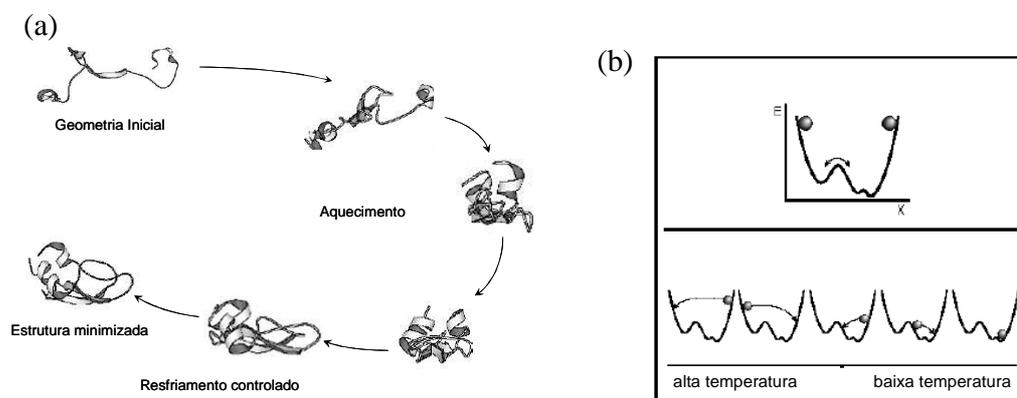


Figura 1.16. Representação das mudanças sofridas pela molécula durante o processo de cálculo por recozimento simulado: (a) na conformação e (b) na energia. (Nilges, 2001)

Técnicas híbridas têm sido empregadas também na análise conformacional de peptídeos, principalmente a combinação de geometria de distâncias de matrizes métricas com o método recozimento simulado (Nilges, M. *et al.*, 1988; Brünger, A. T. *et al.*, 1997). A primeira relaciona-se com a estrutura de partida e a segunda, com a otimização de geometria ou refinamento estrutural. No entanto, como a metodologia de geometria seleciona randomicamente valores de distâncias interatômicas dentro de limites

específicos, estruturas muito distorcidas podem ser obtidas empregando essa metodologia, necessitando de altos tempos de processamento computacional para otimização de geometria.

Além de o algoritmo utilizado desconsiderar a influência da trajetória na otimização de geometria, o método de recozimento simulado apresenta outras características. A função de energia potencial inclui parâmetros que mantêm as condições de covalência da estrutura. Esses parâmetros são uma componente harmônica relativa ao comprimento de ligação, potenciais de ângulos de ligação, potenciais de ângulos de torção, termos para reforçar quirálicas e planaridades adequadas e um potencial simples de repulsão, conforme descritos na Equação 8. Os termos k_b , k_θ , k_ϕ , k_{repul} , k_d e k_a são constantes de força; r é o comprimento de ligação calculado; r_0 é o comprimento de ligação correto; θ e θ_0 são, respectivamente, os ângulos de ligação calculado e correto; ϕ é o valor do ângulo de torção ou do ângulo impróprio; n é o número de mínimos do potencial de ângulos de torção; δ é o desvio do ângulo de torção e potenciais impróprios; s é um fator de escalamento; R_{min} é a distância em que o potencial de van der Waals tem seu valor mínimo; R é a distância calculada entre um par de átomos não ligados; Δ_a e Δ_d são os tamanhos das violações de restrições de distância e angulares, respectivamente.

$$E = \sum_{\text{ligações}} k_b (r - r_0)^2 + \sum_{\text{ângulos}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{diedros}} k_\phi [1 + \cos(n\phi + \delta)] + \sum_{\text{impróprios}} k_\phi (\phi - \delta)^2 + \sum_{\text{pares não ligados}} k_{\text{repul}} [\max(0, (sR_{\text{min}})^2 - R^2)]^2 + \sum_{\text{restrições de distância}} k_d \Delta_d^2 + \sum_{\text{restrições angulares}} k_a \Delta_a^2 \quad (8)$$

1.3.2.2. Atribuições Estereoespecíficas

A verificação da consistência e conversão dos dados de entrada para o cálculo, bem como a atribuição estereoespecífica de hidrogênios diastereotópicos podem ser feitas pelo método de busca em grades (*Grid Search*). Esse método consiste na decomposição da estrutura em diversas grades multidimensionais e cada dimensão corresponde a um ângulo diedro, utilizando-se normalmente apenas os ângulos ϕ , ψ e χ^1 de cadeias peptídicas (**Figura 1.11**, p. 13). Modelando a estrutura como se fosse uma grade, torna-se possível realizar com maior rigor buscas conformacionais de regiões definidas de biomacromoléculas, detectando-se facilmente inconsistências entre os dados (Güntert, P. *et al.*, 1998).

Para atribuição estereoespecífica, hidrogênios metilênicos e grupos isopropila podem ser tratados apropriadamente como pseudo-átomos. Quando essa atribuição não pode ser feita manualmente, utilizam-se os dados de nOe e 3J (Güntert, P. *et al.*, 1989). Pelo Método Local, duas buscas em grade de forma paralela são empregadas, sendo uma para cada possibilidade de atribuição. Assim, as conformações locais são verificadas próximas aos grupos a serem atribuídos. Quando há convergência de dados apenas para uma busca em grade, considera-se que a atribuição seja inequívoca.

O Método Global é uma outra alternativa para atribuição estereoespecífica no cálculo da estrutura tridimensional ou por referência a estruturas de homólogos. Embora esse método apresente a vantagem de levar em consideração a estrutura como um todo e, por consequência, todas as restrições conformacionais presentes, uma análise sistemática de conformações locais não é viável. Dessa forma, as atribuições estereoespecíficas são baseadas apenas em análises estatísticas de um número limitado de conformeros.

Quando a atribuição inequívoca pelos métodos local e global não for possível, diversos tratamentos de restrições de distância de átomos diástereotópicos podem ser empregados. Um tratamento considera que os nOe's advêm de um pseudo-átomo localizado no centro entre os átomos diástereotópicos (Wüthrich, K., 1986). Como os nOe's referem-se a átomos, uma correção deve ser adicionada à restrição de distância. Para nOe's inter-residuais, a correção é igual à distância entre o pseudo-átomo e o átomo ou grupo que ele substitui e, para nOe's intra-residuais, igual à diferença máxima estericamente permitida entre as distâncias relevantes aos átomos ou grupos e aos pseudo-átomos, respectivamente. No caso de hidrogênios β -metilênico e grupos metila, as correções são respectivamente de 0,3 e 1 Å, ambos os valores adicionados ao limite superior da restrição de distâncias. A relação entre o limite superior da restrição de distância relativa ao pseudo-átomo (b_Q) e os limites superiores das restrições relativas aos hidrogênios metilênicos (b_1 e b_2), com a correção, é dada pela Equação 9.

$$b_Q = \min(b_1, b_2) + c_Q \quad (9)$$

O método de simetria trata restrições de distância relativas a hidrogênios diástereotópicos não atribuídos de forma estereoespecífica. Nesse método considera-se o limite superior menos restritivo possível para os dois hidrogênios envolvidos, conforme Equação 10.

$$b_Q = \max(b_1, b_2) \quad (10)$$

Outro método combina técnicas de simetria com pseudo-átomos, empregando os programas DIANA (Güntert, P. *et al.*, 1991a) e DYANA (Güntert, P. *et al.*, 1997), conforme Equação 11. Esse método pode fornecer resultados melhores que os dois métodos quando tratados independentemente.

$$b_Q = \frac{\sqrt{b_1^2 + b_2^2}}{2} - c_Q^2 \quad (11)$$

Um outro método utiliza a soma da média das duas distâncias relativas aos substituintes diástereotópicos (d_1 e d_2), conforme Equação 12 (p. 23). Esta técnica não considera explicitamente

$$\langle d \rangle = (d_1^{-6} + d_2^{-6})^{-\frac{1}{6}}$$

pseudo-átomos, mas considera que os dados de nOe's originam-se de ambos os substituintes diastereotópicos simultaneamente, podendo ser utilizada para todos os grupos de hidrogênios não atribuídos estereoespecificamente, sem a necessidade de correções de pseudo-átomos ou de dados de multiplicidade (Brünger, A. T., 1992).

$$\langle d \rangle = (d_1^{-6} + d_2^{-6})^{-\frac{1}{6}} \quad (12)$$

1.3.2.3. Metodologia de geometria de distância

A geometria de distâncias foi a primeira metodologia teórica empregada na análise conformacional a partir de dados de RMN. Através deste método há conversão em coordenadas cartesianas de dados de contornos NOESY em distâncias espaciais entre átomos ou grupos (Blumenthal, L. M., 1953). Com o desenvolvimento de programas computacionais para análises estruturais, na década de 1980 (Braun, W. *et al.*, 1981; Havel, T. F. e Wüthrich, K., 1984; Williamson, M. P., *et al.*, 1985) essa metodologia foi aplicada também a biomacromoléculas. Inicialmente, a metodologia baseou-se em geometria de distâncias de matrizes métricas, fornecendo as primeiras estruturas calculadas a partir de dados de RMN. Tendo em vista os limites computacionais daquela época, muitas informações estruturais não eram consideradas explicitamente nos cálculos. Simplificações da representação de resíduos de aminoácido como conjuntos de pseudo-átomos foram realizadas para diminuir o tempo de processamento (Arseniev, A. S. *et al.*, 1984; Havel, T. F. *et al.*, 1983).

O DISGEO foi o primeiro *software* completo para análise conformacional a partir de dados de RMN (Havel, T. F. e Wüthrich, K., 1984). O algoritmo do programa permitiu a utilização de medidas de distância, incluindo aquelas pouco precisas, para estruturas peptídicas. O alto tempo computacional (proporcional a N^3 para um sistema de N átomos) e o fato de o programa não ser capaz de reconhecer diferença entre imagens especulares para especificar quiralidade (pois os dados de entrada baseavam-se em distâncias interatômicas) não permitiram, no entanto, um largo uso do DISGEO na análise conformacional de peptídeos de maiores massas molares.

A geometria de distâncias de matrizes métricas (*metric matrix distance geometry*) foi a primeira metodologia utilizada para a conversão de restrições de distância obtidas por RMN em estruturas tridimensionais. Através dos valores exatos de todas as distâncias entre um conjunto de pontos em um espaço euclidiano, torna-se possível determinar as coordenadas cartesianas para esses pontos (Crippen, G. M., 1977; Crippen, G. M. e Havel, T. F., 1978).

No cálculo de estruturas tridimensionais, os dados experimentais são inseridos no arquivo de entrada do programa que é constituído por uma tabela de restrições de distância e de conectividades entre os átomos.

Primeiramente, são especificadas as faixas de valores de distância entre pares de átomos, realizando todas as combinações possíveis entre os átomos presentes na molécula, incluindo-se as restrições de distância obtidas experimentalmente. Todas as faixas de valores de distâncias são submetidas a análise de consistência, utilizando-se a desigualdade de triângulos em conjuntos de três átomos (A , B e C , **Figura 1.17**). Para cada conjunto, A e C não se encontram ligados e as distâncias entre $A - C$, $A - B$ e $B - C$ (d_{AC} , d_{AB} e d_{BC} , respectivamente) devem satisfazer a Equação 13. Se um limite superior de distância for maior que a permitida, esse limite deve ser diminuído até que seja satisfeita a equação. Os limites superiores também são submetidos às mesmas considerações.

$$d_{AC} \leq d_{AB} + d_{BC} \quad (13)$$

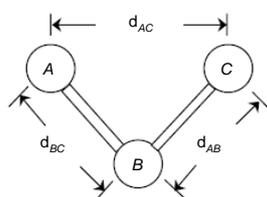


Figura 1.17. Representação de um conjunto de três átomos, A , B e C , mostrando a distância entre eles.

Em seguida, para cada valor de restrição de distância, um valor é escolhido aleatoriamente entre os limites superior e inferior. A conversão desses valores de distância para coordenadas cartesianas é realizada fixando um ponto centróide em que todos os valores dos eixos cartesianos serão zero, de tal forma que todos os átomos passam a ter sua posição determinada pelas coordenadas x_i , y_i e z_i (Equação 14, **Figura 1.18**).

$$\sum_i x_i = 0 \quad \sum_i y_i = 0 \quad \sum_i z_i = 0 \quad (14)$$

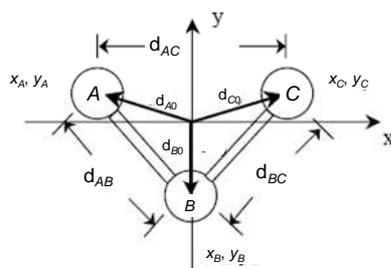


Figura 1.18. Conjunto de três átomos, A , B e C , com os vetores de distância entre o ponto central do plano cartesiano e cada átomo, localizados no espaço por suas respectivas coordenadas cartesianas.

Os vetores d_{i0} , que representam a distância de um átomo i ao ponto centróide 0 , são então definidos e as matrizes métricas são construídas considerando os átomos dois a dois. Para dois átomos i e j , os elementos de uma matriz métrica $N \times N$, em que N é o número total de átomos na estrutura, podem ser calculados pela Equação 15.

$$g_{ij} = \frac{1}{2} (d_{i0}^2 + d_{j0}^2 + d_{ij}^2) \quad (15)$$

Através da Equação 16 podem ser calculados os valores de d_{i0} e d_{j0} sem as coordenadas cartesianas para uma estrutura de N átomos.

$$d_{i0} = \frac{1}{N} \sum_{j \neq i} d_{ij}^2 - \frac{1}{N^2} \sum_{j=1}^N \sum_{k>j} d_{jk}^2 \quad (16)$$

As coordenadas cartesianas podem ser calculadas a partir dos autovalores (λ_i) e autovetores (w_i) da matriz métrica G (Equação 17), em que i corresponde aos eixos x , y , e z . As coordenadas cartesianas relacionam-se com os autovalores e autovetores, conforme Equação 18.

$$Gw_i = \lambda_i w_i \quad (17)$$

$$x_i = \lambda_1 w_{i1} \quad y_i = \lambda_2 w_{i2} \quad z_i = \lambda_3 w_{i3} \quad (18)$$

As coordenadas geradas pelo algoritmo de geometria de distâncias não são ainda satisfatórias, ocorrendo distorções devidas à amostragem aleatória de distâncias entre os valores permitidos pelas restrições conformacionais. Portanto, otimizações de geometria por mecânica molecular (MM) tornam-se necessárias. Um campo de força simplificado é indicado para verificar violações de restrições de distância, se a distância d_{ij} entre os átomos i e j está fora dos limites permitidos. A determinação do erro e é calculada pela Equação 19, em que B_{ij} é o valor do limite (superior ou inferior) da restrição de distância (restrição conformacional) que foi violada.

$$e = \frac{(d_{ij}^2 - B_{ij}^2)^2}{B_{ij}^2} \quad (19)$$

No método de geometria de distâncias de matrizes métricas, apesar de ser intuitivo e de possuir uma base teórica sólida, todas as propriedades conformacionais estão codificadas em valores de distância. Portanto, informações sobre quiralidade e ângulos diedros não podem ser consideradas nos resultados da análise conformacional. As restrições de quiralidade (restrições de distância que são inequívocas somente para uma configuração de um determinado centro quiral) podem ser corrigidas pela otimização de geometria por MM, cujo campo de força pode verificar as possíveis violações. As restrições dadas pelos ângulos

diedros devem ser primeiramente convertidas em restrições de distância para poderem ser utilizadas nos cálculos.

A aleatoriedade dos valores escolhidos de distâncias interatômicas pelo método de geometria de distâncias permite gerar um grande número de estruturas tridimensionais diferentes que satisfazem as restrições conformacionais. Muitas estruturas geradas podem ser distorcidas, provenientes do método de seleção das distâncias que considera essa variável uniforme, independente e distribuída entre os limites das restrições consideradas. Além disso, como há igual probabilidade de o valor de distância estar próximo tanto do limite inferior quanto do superior, geometrias estendidas são freqüentemente geradas (Metzler, W. J. *et al.*, 1989; Havel, T. F., 1990). Esse efeito é especialmente pronunciado em cadeias peptídicas para as quais há apenas um pequeno número de restrições. Para reduzir essas distorções pode-se aplicar o processo de triangulação (Equação 13, p. 24) cada vez que uma distância seja escolhida. Contudo, esse tratamento exige alto trabalho computacional. Devido a essas desvantagens, a geometria de distâncias de matrizes métricas tem sido pouco usada atualmente na análise conformacional de peptídeos, porém continua sendo usada mais freqüentemente em métodos estatísticas de busca por homologia e previsão de estruturas secundárias (Huang, E. S. *et al.*, 1999).

1.3.2.4. Metodologia de Função Alvo Variável

O método de função alvo variável (*Variable Target Function*, VTF) é baseado em informações de distâncias interatômicas e de ângulos de torção. A VTF define a quiralidade a partir de geometrias covalentes previamente parametrizadas, construindo por etapas uma outra estrutura que satisfaça os dados de RMN. Essa metodologia foi empregada primeiramente pelo pacote computacional DISMAN (Braun, W. e Gō, N., 1985) sendo apropriadas para estruturas ricas em formas α -hélice. Porém, o uso desse programa não se tem mostrado satisfatório para formas folha β ou estruturas de topologias muito complexas (Kline, A. D. *et al.*, 1988).

Técnicas híbridas de VTF com reconhecimento simulado têm sido utilizadas na análise conformacional de peptídeos (Pfeiffer, S. *et al.*, 1997). Porém, o caráter randômico da busca da estruturas de partida, incluindo os valores iniciais de distâncias interatômicas e de ângulos diedros, resulta em uma pequena porcentagem de convergência das estruturas de partida em geometrias que satisfaçam as condições de contorno impostas pelos resultados de RMN. O programa DIANA implementa um algoritmo de função alvo variável que reduz drasticamente o tempo computacional dessa técnica (Güntert, P. *et al.*, 1991).

A função alvo (*target function*) inclui termos de restrições conformacionais obtidas experimentalmente. Pelo método de função alvo variável (*variable target function*) restrições conformacionais obtidas experimentalmente são consideradas sucessivamente para estruturas randômicas

geradas de forma computacional. A **Figura 1.19** mostra um esquema do algoritmo utilizado neste procedimento. Na primeira etapa da otimização conformacional ($L = 0$) consideram-se apenas as restrições intra-residuais das estruturas randômicas que passam a adotar de forma independente essas restrições. Em seguida ($L = 1$), são consideradas as restrições entre resíduos vizinhos.

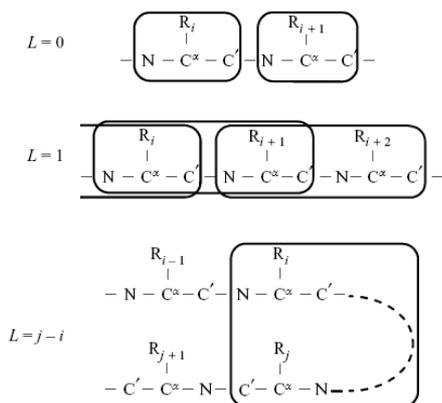


Figura 1.19. Restrições utilizadas em vários níveis de minimização L do algoritmo função alvo variável. Em um dado nível L , todas as restrições de distância entre os resíduos i e j , com $|j - i| \leq L$ são considerados (Güntert, P., 1997)

Posteriormente, as restrições entre átomos mais distantes na estrutura primária são consideradas ($L = j - i$) e, finalmente, restrições entre extremos opostos da molécula podem ser consideradas, caso existam.

As estruturas de partida empregando função alvo variável são parametrizadas, apresentando configurações definidas de centros quirais, comprimentos das ligações e restrições angulares. Assim, esta metodologia apresenta vantagens em relação à determinação estrutural a partir da geometria de distâncias, principalmente quando são tratadas as questões de quiralidade ou distorção das moléculas. Em contrapartida, o método de função alvo variável não é efetivo para estruturas de biomacromoléculas de topologias muito complexas. Apenas uma pequena fração das geometrias de partida converge para conformações com pequenas violações de restrição, necessitando, portanto, de um maior número de geometrias de partida randômicas para se obter um maior número de estruturas finais satisfatórias (com pequenas violações de restrição).

1.3.2.5. Dinâmica Molecular de Ângulos de Torção

A dinâmica molecular (DM) de coordenadas cartesianas pode ser empregada eficientemente tanto para sistemas de poucos números de átomos quanto para biomacromoléculas. Entretanto, cada átomo deve ser definido por três variáveis de posição (x, y, z) e, conseqüentemente, três graus de liberdade. Como resultado,

os cálculos de otimização de geometria tornam-se enormemente dispendiosos computacionalmente, em especial para biomacromoléculas que podem conter mais de centenas de milhares de átomos. Contudo, o uso de ângulos de torção pode reduzir consideravelmente os graus de liberdade da estrutura, pois a variação de um ângulo diedro afeta normalmente três átomos (Güntert, P., 1997). A Equação 20 descreve o emprego das equações de movimento para ângulos de torção e a energia cinética utilizada na otimização de geometria por DM de ângulos de torção é dada pela Equação 21, em que $M(\theta)$ é uma matriz de massa.

$$\frac{d}{dt} \left(\frac{\partial L}{\partial \dot{\theta}_k} \right) - \frac{\partial L}{\partial \theta_k} = 0 \quad (20)$$

$$E_{cin} = \frac{1}{2} \sum_{k,l=1}^n M(\theta)_{kl} \dot{\theta}_k \dot{\theta}_l \quad (21)$$

Para o tratamento de dados, utiliza-se o modelo de estrutura em árvore (*tree structure*), em que a molécula é representada como um conjunto de corpos rígidos conectados entre si pelos ângulos diedros, que constituem os únicos graus de liberdade da estrutura. Os corpos rígidos são constituídos por um ou mais elementos de massa (átomos) com distâncias relativas invariáveis, sendo numerados de 0 a n , a partir da extremidade N -terminal (denominada de base), finalizando na extremidade C -terminal. Cada corpo rígido, com uma numeração de $k \geq 1$, tem um único corpo rígido vizinho mais próximo em direção à base, que possui o número $p(k) < k$. O ângulo de torção entre os corpos rígidos k e $p(k)$ é denominado θ_k . A conformação da molécula é definida unicamente por $\theta = (\theta_1, \dots, \theta_n)$. As energias cinética e potencial, bem como as posições dos átomos e a aceleração torcional, podem ser calculadas com tempo computacional proporcional ao número de ângulos diedros, bem menor se comparado cálculos de DM que empregam coordenadas cartesianas.

Além disso, como apenas os graus de liberdade diferenciam ambos os métodos, os princípios teóricos são conservados, permitindo a otimização de geometria por DM tanto em coordenadas cartesianas quanto em ângulos de torção empregando recozimento simulado.

1.3.3. ANÁLISE E VALIDAÇÃO DE ESTRUTURAS

1.3.3.1. Violação de restrições

A conversão de informações de RMN de proteínas e ácidos nucléicos em estruturas tridimensionais tem se mostrado dependente de metodologias computacionais, bem como as subseqüentes minimizações e análises. Se essas informações não forem suficientes para se obter estruturas definidas, ou se as geometrias

resultantes são inconsistentes com essas restrições, então deve-se determinar novamente o conjunto de dados de entrada até que se obtenha uma estrutura satisfatória. Logo após se obter esse conjunto de estruturas, estas são submetidas à etapa posterior de análise, para determinar o grau de dispersão entre os conformêros calculados, inferir a qualidade do conjunto resultante de estruturas e, por fim, validar ou não o método.

Uma violação de restrição significa que o algoritmo utilizado não satisfaz as condições conformacionais impostas pelas restrições. A maior parte dos erros inerentes aos cálculos pode levar a dois tipos de violação. A violação randômica é verificada normalmente ao final dos cálculos, ocorrendo em regiões diferentes de apenas algumas conformações obtidas. Quando o desvio dos valores finais das variáveis geométricas não difere consideravelmente das restrições, essas violações randômicas não comprometem a análise conformacional. Contudo, a discrepância muito grande entre as geometrias finais e as restrições conformacionais correspondentes pode surgir de erros em etapas anteriores ou do fato de que os dados utilizados não foram suficientes para gerar um grupo definido de conformações similares.

As violações consistentes são assim consideradas caso ocorram em aproximadamente 75% das conformações do conjunto final calculado, indicando falhas mais graves em regiões definidas, principalmente na atribuição nos mapas de contornos de RMN. O número e magnitude das violações de restrição de um conjunto de conformações podem indicar o grau de concordância entre os dados experimentais e os modelos teóricos empregados. Entretanto, a interpretação desse número de violações pode ser dificultada pelos critérios de seleção das conformações baseada em energia.

Os programas computacionais de identificação de violações utilizam um parâmetro denominado valor de corte. As distâncias ou ângulos abaixo do valor de corte não são considerados violações, porém, aqueles valores acima são tratados como violações. Isto permite avaliar se no conjunto final de geometrias de uma estrutura há violações de restrições. No entanto, a indicação de um valor de corte pode encobrir restrições oriundas de violações consistentes, resultando em análises conformacionais incorretas. Assim sendo, torna-se apropriada também a verificação de ocorrência de violações de restrição a valores de corte mais baixos.

As geometrias geradas a partir das informações dos dados de RMN podem apresentar violações estruturais, resultando em imprecisões de algumas regiões específicas do conjunto de geometrias geradas ou, até mesmo, em estruturas terciárias totalmente incorretas. Desta forma, a validação das geometrias obtidas pelas informações dos dados de RMN torna-se muito importante para que a análise conformacional tenha um grau satisfatório de qualidade.

Os programas utilizados no cálculo estrutural possuem uma gama de algoritmos que medem a qualidade dos resultados da análise. Este não é um procedimento trivial, pois envolve aspectos como a qualidade da teoria ou modelo, amostragem e convergência dos resultados, bem como a exatidão do campo de força, a eficiência e adequação do *software* utilizado nos cálculos (Spronk, C. A. E. M. *et al.*, 2004). A validação pode resultar em uma concordância entre o experimento e o modelo. Isso pode indicar que a

simulação reflete realmente o sistema experimental, a técnica de simulação utilizada é insensível à propriedade estudada ou houve compensação de erros. Por sua vez, a não concordância entre os resultados teóricos e experimentais pode ser devida ao modelo estar incorreto, a um campo de força inadequado, à não convergência da simulação, a problemas e a usos incorretos do *software* ou a dados incorretos (van Gunsteren, W. F., 1998).

1.3.3.2. Distribuição de Ângulos Diedros

Combinações dos ângulos diedros ϕ e ψ (**Figura 1.4**, p. 4) são indicadores importantes da qualidade da conformação de regiões definidas de cadeias peptídicas. As possíveis combinações desses dois ângulos estão restritas por fatores estéricos a certas regiões do diagrama de Ramachandran (**Figura 1.20**). O diagrama de Ramachandran (Ramachandran, G. N. *et al.*, 1963) mostra também que essas combinações estão relacionadas com as estruturas secundárias adotadas. A análise da qualidade dos modelos é feita geralmente classificando as combinações de ϕ e ψ em quatro regiões do diagrama, que são apresentados com cores diferentes na **Figura 1.20**. Na região favorável há conformações que não envolvem sobreposições estéricas. A região adicionalmente permitida indica conformações permitidas nos limites extremos para os contatos atômicos desfavoráveis. A região generosamente permitida reflete conformações que são permitidas somente se houver certa flexibilidade nos ângulos de ligação. Na região proibida, as conformações são totalmente impedidas por fatores estéricos.

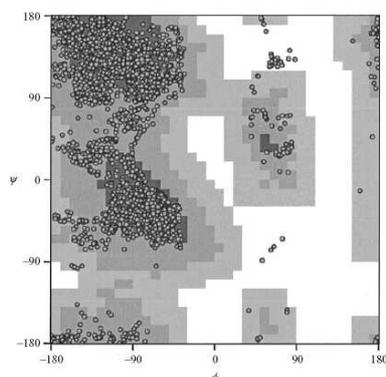


Figura 1.20. Diagrama de Ramachandran de um conjunto de vinte conformações da proteína Ciclofilina A (Ottiger *et al.*, 1997). Cada círculo corresponde aos valores ϕ/ψ de resíduos que não sejam glicina em um dos vinte conformações. As regiões favoráveis, adicionalmente permitidas, generosamente permitidas e proibidas, estão representadas, respectivamente, por cinza-escuro, cinza-médio, cinza-claro e branco.

A representação pelo diagrama de Ramachandran não considera os valores específicos de ϕ e ψ dos diferentes resíduos de aminoácido, à exceção de resíduos de prolina e glicina (Spronk, C. A. E. M. *et al.*,

2004). Um método que leva em consideração valores de ϕ e ψ característicos de cada resíduo foi desenvolvido no programa WHAT IF (Hoofst, R. W. *et al.*, 1997). Esse método utiliza *Z-scores* calculados tanto para cada resíduo quanto para a cadeia peptídica, resultando em uma distribuição de ângulos mais precisa. Normalmente, utiliza-se *Z-scores* combinados à representação gráfica do diagrama de Ramachandran.

Os dados em regiões proibidas podem significar conformações anormais ou erros de cálculo, o que será verificado apenas pela análise dos dados de entrada. Os resíduos de D-aminoácidos são um exemplo de valores em regiões proibidas que não necessariamente constituem um erro. Todavia, resíduos em regiões permitidas do diagrama de Ramachandran não significam necessariamente ausência de erros. Em todos os casos, os *Z-scores* calculados, bem como a dispersão desses valores no diagrama devem ser levados em consideração.

Uma validação pode ser baseada também nos ângulos ω (**Figura 1.11**, p. 13). Entretanto, esse ângulo pode assumir somente valores de 0° (forma *cis*) e 180° (forma *trans*) devido ao caráter parcial de ligação dupla entre o carbono e o nitrogênio da ligação peptídica. A maioria dos resíduos adota preferencialmente a forma *trans*. A forma *cis* pode ser adotada por resíduos de prolina devido à ausência de ligações de hidrogênio dos nitrogênios *N*-terminais e a cadeia lateral ser mais rígida que as dos outros aminoácidos (Rundgren, H. *et al.*, 2007). No entanto, os campos de força na etapa de cálculo podem restringir à forma *trans* muitos modelos com resíduos de prolina. Neste caso, os valores de ω devem ser explicitamente especificados antes do cálculo.

1.3.3.3. Outras Propriedades Geométricas

Além da distribuição de ângulos diedros, diversos outros métodos de validação diretamente relacionados às propriedades geométricas têm sido empregados para inferir sobre a qualidade das geometrias calculadas. A maioria desses métodos utiliza-se do parâmetro estatístico *Z-score* ou do RMS *Z-score*, que são capazes de indicar a aceitabilidade das propriedades calculadas (Linge, J. P. *et al.*, 2003). O *Z-score* relaciona um valor x de um parâmetro a uma distribuição gaussiana de um banco de dados (Equação 22). Nesta equação, $\langle x_{bd} \rangle$ e $\sigma(x_{bd})$ são respectivamente a média e o desvio padrão desse valor. Pelos valores de *Z-score* calculados sabe-se quais dados são valores isolados (*outliers*), ou seja, quais são improváveis de ocorrer.

$$Z = \frac{x - \langle x_{bd} \rangle}{\sigma(x_{bd})} \quad (22)$$

O RMS *Z-score* permite a análise da qualidade dos dados e do *Z-score*, checando se a distribuição de valores tem mais ou menos valores isolados que o esperado e é dado pela seguinte Equação 23. O parâmetro Z_j é o *Z-score* definido pela Equação 22 para a observação j , sendo que N é o número total de observações.

$$RMSZ = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^N Z_j^2}{N}} \quad (23)$$

Alguns métodos de validação de geometria utilizam tratamentos estatísticos para os comprimentos e ângulos de ligação. Esses parâmetros são descritos na literatura com um considerável grau de exatidão para um vasto número de estruturas (Allen, F. H. *et al.* 1983; Engh, R. A. *et al.*, 1991), encontrando-se definidos nos campos de força utilizados nos cálculos. No entanto, a aplicação de outras restrições desses valores disponíveis em bancos de dados pode limitar enormemente o número de conformeros calculados (Spronk, C. A. E. M. *et al.*, 2002).

Analogamente, outras propriedades como a quiralidade e a geometria tetraédrica de certos carbonos podem ser também utilizadas. Em relação à quiralidade, sua utilização para a validação tornou-se de pouco uso, pois as configurações dos carbonos não são definidas experimentalmente. A configuração é definida durante o cálculo estrutural e não há riscos de inversão de configurações. Por outro lado, a geometria tetraédrica de átomos de carbono pode ser utilizada ainda, uma vez que grandes desvios dessa propriedade são improváveis de ocorrer em estruturas reais. Portanto, distorções significativas dessa geometria são forte indício de erro.

A planaridade de certos grupos pode fornecer informações sobre a qualidade da análise estrutural. Grupos planos estão presentes em nove dos vinte aminoácidos naturais. Os desvios da planaridade que podem ocorrer nos resíduos da cadeia peptídica foram extensamente estudados por difração de raios-X e encontram-se descritos em bancos como o CSD (*Cambridge Structural Database*) (Allen, F. H. *et al.* 1983; Engh, R. A. *et al.*, 1991). Como esses grupos podem ser modelados de forma incorreta, com distorções em relação à geometria plana, torna-se importante a comparação com os bancos de dados.

Além da planaridade, validações de geometria podem ser realizadas pelas conformações das cadeias laterais ou, mais especificamente, de seus rotâmeros. As cadeias laterais apresentam-se preferencialmente em conformações alternadas (*anti* ou *gauche*) em detrimento das conformações eclipsadas. Essas populações conformacionais dependem da natureza do aminoácido, estrutura secundária presente e o meio em que se encontra, sendo conhecidas por difração de raios-X de alta resolução e indexadas em bancos de dados. A validação utiliza esses valores dos bancos de dados como parâmetros para comparação com as conformações calculadas (Kuszewski, J. *et al.*, 1996; Kuszewski, J. *et al.*, 1997; Kuszewski, J. *et al.*, 2000; Kuszewski, J. *et al.*, 2001; Bertini, I. *et al.*, 2003).

Esse tipo de validação é importante em geometrias obtidas por dados de RMN, pois quando os termos relativos aos ângulos diedros são desconsiderados nos cálculos, podem ocorrer conformações eclipsadas. Assim, a qualidade do modelo aumenta significativamente quando se aplicam os valores de distribuição de populações obtidos a partir desses bancos de dados. Contudo, uma validação das conformações baseada apenas nesses mesmos bancos de dados pode mascarar possíveis erros estruturais.

1.3.3.4. Interações entre Átomos Não Ligados

Interações interatômicas podem ser utilizadas como critério para verificar a qualidade dos modelos. As ligações de hidrogênio são muito utilizadas por serem responsáveis pela estabilização de estruturas secundárias e terciárias de cadeias peptídicas. Esse método baseia-se em distâncias ótimas entre os átomos que participam da ligação de hidrogênio, tendo-se como referência as posições dos heteroátomos envolvidos na ligação. A qualidade e validação do modelo de conformações derivadas por RMN são dependentes da variação permitida das coordenadas desses heteroátomos. No entanto, esse problema pode ser minimizado aliando-se este método à validação por potenciais eletrostáticos.

As interações eletrostáticas têm uma importância especial na estabilização de conformações e podem ser empregadas eficientemente para a validação de modelos calculados. Um exemplo é o uso de dados de constante de pK_a na análise conformacional de certas cadeias laterais (Powers, N. e Jensen, H. J., 2006). Porém, as interações eletrostáticas apresentam certas dificuldades em serem detectadas por RMN, uma vez que diversos grupos responsáveis pela interação, como grupos carboxilatos, só podem ter suas posições inferidas por meios indiretos, através de hidrogênios de outras cadeias laterais e variações no deslocamento químico de átomos próximos a esses grupos. Um tratamento às propriedades eletrostáticas pode ser dado durante o cálculo, escolhendo-se um campo de força apropriado e adição explícita de moléculas de solvente (Spronk, C. A. E. M. *et al.*, 1999).

1.3.3.5. Desvio Quadrático Médio (RMS – Root Mean Square)

O desvio quadrático médio (RMS) é um método utilizado geralmente para quantificar as diferenças entre as geometrias de um conjunto de átomos. Os cálculos do RMS dependem da forma da função restrigente. A função potencial bi-harmônica inclui todos os desvios em relação a uma distância definida. No caso da função do tipo “potencial de poço quadrado”, serão considerados somente os desvios que se encontrarem fora dos limites superior e inferior (Brünger, A. T. *et al.*, 1998), resultando a Equação 24 (p. 34). O parâmetro d_{kl} é a distância calculada para a restrição k no modelo l , r_k^{sup} o limite superior da restrição

k e r_k^{inf} é o limite inferior da restrição k . A soma é calculada para todas as N_r restrições de distância e para todos os N_m modelos. Como resultado, tem-se a medida da diferença das posições entre os átomos nas estruturas.

$$RMS_{NOE} = \sqrt{\frac{1}{N_r N_m} \sum_{k=1}^{N_r} \sum_{l=1}^{N_m} (\Delta_{kl})^2} \quad \text{Com} \quad \begin{cases} d_{kl} > r_k^{\text{sup}} & \Delta_{kl} = (d_{kl} - r_k^{\text{sup}}) \\ r_k^{\text{inf}} < d_{kl} \leq r_k^{\text{sup}} & \Delta_{kl} = 0 \\ r_k < r_k^{\text{inf}} & \Delta_{kl} = (r_k^{\text{inf}} - d_{kl}) \end{cases} \quad (24)$$

O “raio de RMS” (*RMS radius*) é um método relativamente intuitivo, constituindo o raio de uma circunferência que envolve as geometrias com RMS's mais próximos entre si. Esse método é usado normalmente para medir a dispersão de geometria em um conjunto de conformações e trata-se de uma média dos valores de RMS's calculados dos pares de conformações com a geometria média. Essa geometria média é determinada sobrepondo as geometrias e medindo a média aritmética entre as suas coordenadas cartesianas de forma a se obter um menor valor de RMS (Güntert, P., 1997).

O valor de RMS não fornece informações sobre a consistência entre os dados experimentais, tampouco corresponde necessariamente ao espaço conformacional permitido pelas restrições conformacionais. Além disso, a amostragem das geometrias pelo algoritmo de cálculo pode estar viciada, com geometrias em acordo com os dados, mas que diferem significativamente das resultantes do cálculo estrutural. Isso pode ocorrer quando são empregadas poucas geometrias para o tratamento estatístico. De um modo geral, a qualidade/confiabilidade dos resultados desse método está relacionada à menor dispersão das geometrias e, conseqüentemente, a menores valores de RMS. Normalmente, um valor de RMS entre 0 e 3 Å sugere forte similaridade entre as geometrias (Tsai, C. S., 2002). Entretanto, podem ocorrer situações em que o valor de RMS é baixo, mas a qualidade dos resultados seja baixa.

1.3.3.6. Fatores R de RMN e Validação Cruzada

O fator R (*R-factor*) é um modelo utilizado inicialmente em cristalografia de raios-X para se quantificar a qualidade e exatidão da geometria otimizada por cálculos computacionais. Apesar de valores baixos do fator R indicarem uma concordância entre modelos experimentais e calculados, têm sido verificados também baixos valores para modelos incorretos (Brünger, A. T., 1992b). Como alternativa, foi proposto o uso do fator R livre (*free R-factor*), que consiste na divisão dos dados de difração em um conjunto de trabalho e um conjunto de teste. O conjunto de trabalho, com aproximadamente 90% dos dados, é usado para calcular o modelo estrutural e o outro, validar o modelo estrutural. A geometria calculada apresenta-se próxima àquela obtida experimentalmente quando os valores do fator R livre tornam-se mais próximos aos valores do fator R . Este método minimiza os erros de superajustamento (*overfitting*) presentes no cálculo do fator R e aumenta a robustez dessa grandeza. Em RMN, o uso do fator R para intensidades de

nOe's é análogo aos realizados em Cristalografia de raios-X, sendo definidas pela Equação 25. Nesta equação, A_{ij}^{calc} e A_{ij}^{exp} são, respectivamente, as intensidades dos sinais de nOe calculados e experimentais resultantes da interação entre os *spins* i e j , $W_{ij}(\tau_m)$ é o fator de peso dependente do tempo de mistura τ_m e a variável p pode possuir um valor unitário ou igual a 1/6, para mostrar a dependência entre a intensidade do nOe e a distância interatômica.

$$R = \frac{\sum_{i,j} W_{ij}(\tau_m) |A_{ij}^{\text{calc}}(\tau_m)^p - A_{ij}^{\text{exp}}(\tau_m)^p|}{\sum_{i,j} W_{ij}(\tau_m) A_{ij}^{\text{exp}}(\tau_m)^p} \quad (25)$$

Os fatores R obtidos a partir de nOe's não são utilizados normalmente em análises conformacionais, pois as intensidades dos sinais de nOe's nem sempre representam fielmente as distâncias interatômicas. Por isso, a validação cruzada tem sido utilizada para calcular o fator R livre de um conjunto de restrições de distâncias obtidas por RMN. Como as restrições de distância contêm apenas informações sobre posições relativas dos átomos, um único conjunto de testes não é suficiente para calcular um fator R livre confiável, necessitando de um número de conjuntos escolhido aleatoriamente para se calcular um fator R livre médio.

A utilização de valores de RDC tem sido uma alternativa para o cálculo de fatores R , conforme descrito na Equação 25, em que D_{obs} e D_{calc} são respectivamente os acoplamentos dipolares residuais observados e calculados; D_a^{AB} e η são respectivamente a componente axial e a rombicidade do tensor de acoplamento (Clare, G. M. *et al.*, 1999).

$$R_{\text{dip}} = \left[\frac{5 \langle (D_{\text{obs}} - D_{\text{calc}})^2 \rangle}{2 (D_a^{AB})^2 (4 + 3\eta^2)} \right]^{1/2} \quad (26)$$

1.3.3.7. Validação Independente e Fatores Q

Na validação independente de geometrias, um tipo específico ou subconjunto dentre os dados experimentais é desconsiderado e utilizado somente para validar o resultado. A validação independente foi utilizada na análise conformacional da ubiquitina (Cornilescu, G. *et al.*, 1998), utilizando-se deslocamentos químicos anisotrópicos de carbonos carbonílicos. Alterações de deslocamento químico foram medidas em meio líquido cristalino e comparadas com valores calculados de modelos não considerando essas informações. Estruturas calculadas empregando acoplamentos dipolares residuais como restrições orientacionais mostraram alta concordância com as estruturas calculadas sem acoplamento dipolar residual. Essa concordância foi medida pelo fator Q : , conforme Equação 26. Nessa equação, $\Delta\delta^{\text{med}}$ e $\Delta\delta^{\text{calc}}$ são as

variações medidas e calculadas de deslocamento químico, respectivamente. A maior concordância entre o modelo e o dado independente observado está relacionada com o menor valor do fator Q .

$$Q = \frac{RMS(\Delta\delta^{med} - \Delta\delta^{prev})}{RMS(\Delta\delta^{med})} \quad (27)$$

1.4. SÍNTESE EM FASE SÓLIDA DE PEPTÍDEOS, PELA ESTRATÉGIA FMOC.

A síntese em fase sólida baseia-se na construção de uma cadeia peptídica, resíduo a resíduo, sobre um suporte sólido insolúvel, resíduo a resíduo. Esse método tem algumas vantagens claras: possibilita separar as cadeias peptídicas intermediárias somente pela retirada de solventes ou filtração, e utiliza um menor volume de solventes, em comparação com as sínteses em solução. Esse método consiste em acoplamentos de aminoácidos, lavagens da resina e desproteções dos grupos *N*-terminais sucessivos, sendo possível automatizar todo o procedimento. Pelo fato de sempre se utilizar reagentes em excesso, os rendimentos dessa modalidade de síntese são, em geral, consideravelmente altos. Contudo, existem algumas desvantagens, tais como a perda sucessiva de rendimento quando um determinado acoplamento for incompleto e o acúmulo de impurezas na resina, que pode ocasionar reações secundárias com o produto (Chan e White, 2000).

Em geral, para se certificar do sucesso das reações, utilizam-se testes qualitativos simples e de fácil execução de forma a poderem ser utilizados a cada acoplamento ou desproteção. O teste mais utilizado para esse fim é o Teste de Kaiser (Troll e Cannan, 1953), que identifica aminas primárias na estrutura por meio de uma variação da coloração da resina.

Toda síntese em fase sólida, independentemente da estratégia empregada, tem o mesmo fundamento. Primeiramente, todas as resinas empregadas têm uma base polimérica insolúvel e ligada a ela, vários grupos reativos, denominados ligantes, que irão reagir com os aminoácidos e prendê-los ao suporte insolúvel. Todos os aminoácidos utilizados têm seus grupos reativos (amino ou carboxila e alguns grupos de cadeias laterais) protegidos para não ocorrerem muitas reações secundárias. Os grupos protetores da extremidade responsável pelo acoplamento (extremidade amino ou carboxi) devem ser lábeis em um meio que não cause a desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais, de forma que estes últimos devem permanecer ligados aos resíduos de aminoácidos até o final da síntese. Cada aminoácido da sequência é adicionado à cadeia pelo grupo não protegido, sendo que, ao final do acoplamento, tem-se a outra extremidade ainda protegida. É feita, então, a desproteção dessa extremidade e o subsequente acoplamento do próximo resíduo.

Ao final da síntese, é feita a clivagem do peptídeo, separando-o da resina, e, concomitantemente, a desproteção de todos os grupos protetores das cadeias laterais. A **Figura 1.21** mostra uma representação esquemática da síntese de peptídeos em fase sólida.

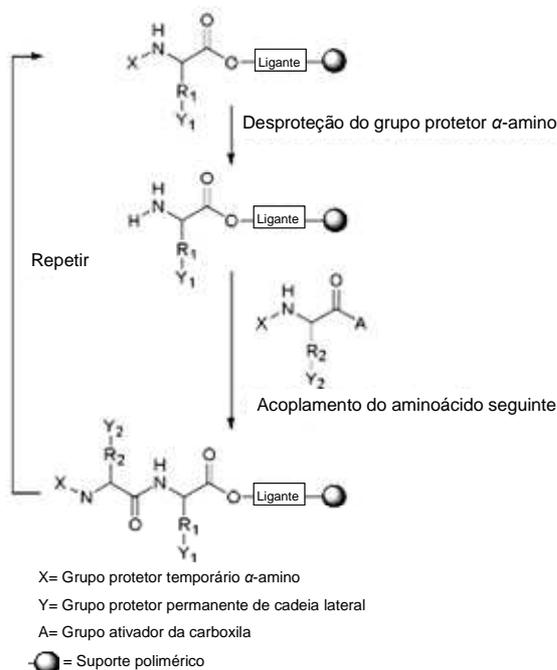


Figura 1.21. Representação esquemática do princípio da síntese de peptídeos em fase sólida. Modificado de <http://www.cem.com>.

A estratégia Fmoc é uma metodologia que envolve o uso do 9-fluorenil-metoxi-carbonila (Fmoc, **Figura 1.22**, p.38) como protetor do grupo α -amino. Esse grupo é facilmente removido em meio básico, enquanto que os grupos protetores das cadeias laterais devem ser facilmente removidos em meio ácido. Em geral, utiliza-se para a desproteção uma solução de piperidina e, para a clivagem final emprega-se TFA, que provoca a quebra da ligação entre o peptídeo e a resina e retira os grupos protetores das cadeias laterais, além de ser uma substância extremamente volátil, podendo ser retirada do meio por evaporação simples. Juntamente com os aminoácidos são utilizados compostos denominados ativadores, que irão ativar o componente carboxílico que irá reagir com a extremidade *N*-terminal desprotegida. Comumente, utilizam-se compostos como carbodiimidas, sais de fosfônio e hidroxibenzotriazola como ativadores. Os principais ativadores utilizados nessa estratégia de síntese são mostrados na **Figura 1.23**, p. 38.

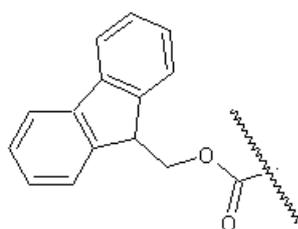
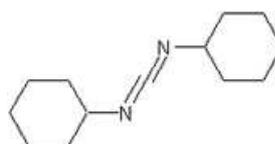
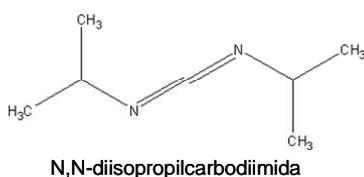


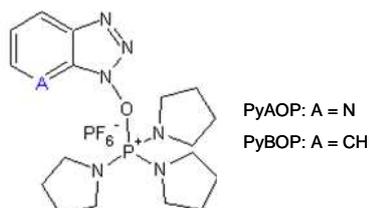
Figura 1.22. Grupo protetor 9-fluorenilmtoxycarbonila (Fmoc) de terminação α -amino.

Carbodiimidias

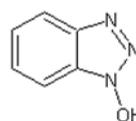


N,N-diciclo-hexilcarbodiimida

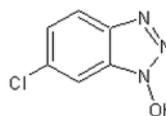
Sais de fosfônio



Ativadores Adicionais



Hidroxibenziltriazola



6-cloro-hidroxibenziltriazola

Figura 1.23. Reagentes ativadores da carbonila mais utilizados na síntese em fase sólida de peptídeos, na estratégia Fmoc

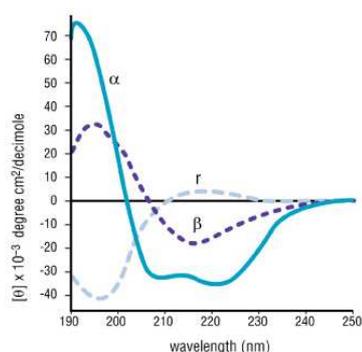
1.5. DICROÍSMO CIRCULAR

A espectroscopia de dicroísmo circular (CD) baseia-se na absorção preferencial de uma das componentes circulares da luz plano-polarizada por grupos cromóforos de uma amostra opticamente ativa. Entrando em contato com a amostra, essa luz passa a apresentar certa diferença de fase entre as amplitudes de suas componentes circulares (Brahms e Brahms, 1980; Cantor e Timasheff, 1982). Essa diferença é denominada elipsidade, θ , podendo assumir valores positivos ou negativos, dependendo da componente preferencialmente absorvida.

A espectroscopia CD é bastante utilizada no estudo estrutural de peptídeos. Nesta classe de substâncias, o grupo cromóforo de maior importância é o grupo amida ($R_1-(C=O)-NH-R_2$), correspondente à ligação peptídica. Apesar de existir influência de grupos aromáticos pertencentes às cadeias laterais de determinados resíduos de aminoácido, é a análise das absorvâncias das ligações peptídicas que fornece informações valiosas a respeito da estrutura secundária dos peptídeos.

As intensidades e energias referentes às absorções por esses cromóforos dependem dos valores adotados pelos ângulos diedros ψ e ϕ (**Figura 1.4**, p. 4). Isso ocorre porque esses ângulos diedros definem as condições de coplanaridade dos orbitais envolvidos na ligação peptídica. Como os valores desses ângulos dependem das interações intramoleculares, do estado de agregação e interações que a molécula pode fazer com o solvente, as absorções são bastante dependentes das conformações adotadas.

Através do estudo por CD, pode-se inferir a predominância das estruturas secundárias α -hélice e folha- β , ou a ausência de um padrão estrutural recorrente (denominado estrutura randômica). Cada estrutura secundária (ou ausência dela) corresponde a determinadas transições eletrônicas que implicam em absorvâncias, de sinal positivo ou negativo em determinado comprimento de onda (λ). A determinação da estrutura secundária predominante ou estrutura secundária média é realizada por comparação com espectros padrões de CD de outras amostras cuja estrutura secundária é conhecida e bem definida. Essa comparação é realizada por meio de cálculos de deconvolução (Cantor e Timasheff, 1982), em que se considera que o espectro CD do peptídeo é uma combinação linear de diferentes espectros. Esses espectros de CD padrões e suas respectivas absorções e transições são mostrados na **Figura 1.24**.



Estrutura	Transição	λ /nm
Randômico	$n \rightarrow \pi^*$	Positivo a 212
	$\pi \rightarrow \pi^*$	Negativo a 195
Folha β	$\pi \rightarrow \pi^*$	Positivo a 196
α -hélice	$n \rightarrow \pi^*$	Negativo a 218
	$\pi \rightarrow \pi^*$	Positivo a 192
α -hélice	$\pi \rightarrow \pi^*$	Negativo a 209
	$n \rightarrow \pi^*$	Negativo a 222

Figura 1.24. Espectros padrão de dicroísmo circular, em que α se refere a α -hélice; r, a estruturas randômicas e β , a estruturas β -folha.

CAPÍTULO 2

PARTE EXPERIMENTAL

2.1. MATERIAL E MÉTODOS

2.1.1 MATERIAIS

-Todas as pesagens da síntese foram feitas na balança analítica Metler, modelo AE166, com precisão de 0,0001g.

- Para a síntese da cadeia 1, foi utilizada a resina RINK, com grau de substituição de 0,63 mmol/g. Para a síntese da cadeia 2, foi utilizada a resina TENTAGEL SRAM, com grau de substituição de 0,27 mmol/g.

- Todos os derivados de aminoácidos tendo Fmoc como grupo protetor da extremidade aminoterminal foram da marca NOVABIOCHEM.

- A lavagem da resina antes e depois das etapas de desproteção foi feita com dimetilformamida (DMF), diclorometano (DCM) e álcool isopropílico (IPA) alternadamente.

- O DMF utilizado foi da marca SYNTH, sendo previamente purificado por destilação a vácuo.

- Os DCMs utilizados foram das marcas SYNTH e MERCK .

- O IPA utilizado foi da marca SYNTH.

- Nas etapas de acoplamento, utilizaram-se como reagentes ativadores a 1-hidroxibenzotriazola (HOBT), da marca NOVABIOCHEM, e a N,N'-dimetilcarbodiimida (DIC), da marca SIGMA-ALDRICH. Os solventes utilizados para esses reagentes foram DMF e DCM.

- Para a desproteção dos grupos N-terminais antes de cada acoplamento, utilizou-se, inicialmente uma solução 20% v/v de piperidina (previamente destilada) em DMF e, em seguida, uma solução 20% v/v de 4-metil-piperidina em DMF.

- Para uma avaliação qualitativa das reações de acoplamento e desproteção, foi utilizado o teste de Kaiser, que emprega três soluções: KCN em piridina, fenol em etanol e ninhidrina em piridina, adicionadas em pequenos volumes, na proporção 1:2:1, respectivamente e, em seguida, aquecia-se o sistema a, no mínimo, 80°C por cerca de 5 minutos.

- Para a clivagem dos peptídeos da resina, utilizaram-se como reagentes seqüestradores de carbocátions trisopropilsilano (TIS) e 1,2-etanoditiol (EDT), solubilizados em uma solução composta de TFA e água, na proporção de 19:1.

- A purificação dos produtos de síntese foi realizada em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O método de identificação de substância utilizado foi detecção por ultravioleta na faixa 210-215 nm, que corresponde à faixa de absorção da ligação peptídica. A purificação foi realizada em escala semipreparativa, enquanto que a escala analítica foi utilizada para se obterem perfis iniciais da amostra.

- Para a CLAE, utilizou-se um cromatógrafo Varian, do modelo ProStar 210, com detector na região do ultravioleta do modelo ProStar 330 e uma válvula de injeção da marca Rheodyne. Todos esses equipamentos encontram-se no Departamento de Química do ICEx da UFMG.

- A coluna analítica utilizada foi uma Microsorb 100-5 C18 250×4,6 mm e a coluna semipreparativa utilizada foi uma Dynamax 100-5 C18 250×10 mm, acompanhadas, respectivamente, de *loops* de 5 μL e 250 μL .

- Para as fases móveis da CLAE foram utilizadas soluções de 0,1% v/v de TFA, em água MILI-Q, e de 0,08% v/v de TFA, em acetonitrila, para compor os gradientes utilizados.

- A água no nível de pureza Mili-Q foi obtida pelo aparelho QPAK, da marca Milipore, que se encontra no Departamento de Química, ICEx, UFMG.

- As amostras foram liofilizadas em um liofilizador LABCONCO, modelo 8910 e utilizou-se uma bomba WELCH modelo Directorr 8915, pertencente ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

- Os espectros de massa foram obtidos em espectrômetro Bruker MALDI TOF modelo Autoflex III, pertencente ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG para as amostras previamente sintetizadas da Cadeia 1 e para a Cadeia 2 sintetizada manualmente.

- Os espectros de dicroísmo circular foram obtidos em um aparelho JASCO modelo J-810, com um sistema de controle acoplado de temperatura da marca Peltier Jasco modelo PFD-425S, pertencente ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Foram feitos espectros das cadeias 1 e 2, em água mili-Q, em 10%, 20%, 40%, 60% e 80% v/v de TFE em água e em tampão fosfato.

- Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e ^{15}N foram obtidos no Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear (CNRMN), no Centro de Ciências da Saúde da UFRJ em um Bruker modelo DRX600 da série AVANCE, operando a 600,130, 150,903 e 60,834 MHz, respectivamente. Como solvente, foram utilizadas soluções de trifluoretanol- d_2 em água mili-Q e um tampão fosfato que mantinha o pH da solução próximo de 8,0. Para a aquisição dos espectros, utilizou-se uma solução de 4mM de cada peptídeo e o volume utilizado dessa solução foi de aproximadamente 0,5 mL. O padrão utilizado para referência interna foi o 2,2-dimetil-2-isopentano-5-sulfonato de sódio (DSS) para os espectros de ^1H e ^{13}C . Os espectros de ^{15}N foram calibrados com referência aos espectros de ^1H e ^{13}C .

- Empregaram-se seqüências de pulso padrão para experimentos de correlação 2D homo e heteronuclear. Foi utilizada uma sonda de detecção inversa multinuclear de 5 mm com pulso ^1H 90° e largura de 11,3 s. Os mapas de contornos 2D HSQC foram obtidos com seqüência de pulso ($^1J(\text{C},\text{H})$ e $^1J(\text{N},\text{H})$), empregando incrementos de tempo de 512, coletados para cada conjunto de dados de 1024 para *zero filling*. Foi utilizado o modo de aquisição *TPPI*.

- O tempo de mistura para a aquisição do mapa de contornos 2D $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ NOESY foi de 120 ms. O experimento de TOCSY teve um tempo de mistura de 80 ms.

- O processamento dos dados de RMN foi feito pelo programa NMRDraw. Utilizando-se o algoritmo NMRPipe (Delaglio *et al.*, 1995), converteram-se esses dados para o formato do programa NMRView 5.0 (Johnson *et al.*, 1994), onde foram interpretados os mapas de contornos. Todos os programas e algoritmos utilizados nesta etapa foram criados para serem executados em plataforma Linux.

- O cálculo do conjunto de estruturas obtidas por análise de RMN foi realizado utilizando-se o programa Xplor-NIH versão 2.17 (Schwieters *et al.*, 2003; Schwieters *et al.*, 2006) e o algoritmo de *simulated annealing sa_new.inp* (Schwieters *et al.*, 2003). Utilizou-se uma estrutura de partida randômica gerada pelo algoritmo *generate_input* e com uma topologia determinada pelo programa *seq2psf*, e que levava em conta a terminação amidada da extremidade C-terminal de ambas as cadeias.

- O cálculo teve como parâmetros iniciais uma temperatura inicial de 1000 K, um número total de passos (*steps*) em altas temperaturas igual a 14000, um número total de passos durante cada resfriamento igual a 6000. O resfriamento simulado foi feito de 50 em 50 K até que se chegasse a uma temperatura de 100 K. O cálculo foi realizado em três etapas principais: uma levando em conta um valor limite de violação de nOe de 0,5 Å, a seguinte considerando um valor de 0,3 Å para esse limite, e uma etapa final considerando um limite de violação de 0,1 Å. Só se considerou o cálculo concluído quando as vinte estruturas mais estáveis não apresentavam mais violações sistemáticas em nenhum dos limites estipulados.

- Os valores de restrição de distância utilizados foram os diretamente obtidos por meio de sinais de nOe. As intensidades dos sinais de nOe foram convertidas em valores de distância por meio da metodologia de calibração proposta por Hybert *et al.* (Güntert *et al.*, 1991) que considera apenas três valores de limite superior para essas restrições: 2,8 Å, 3,4 Å e 5,0 Å (os valores de nOe são classificados qualitativamente quanto às respectivas intensidades de seus sinais como fraco, médio e forte, respectivamente). Essa conversão foi realizada por meio do programa NMRView 5.0 (Johnson *et al.*, 1994).

- O cálculo estrutural foi realizado para serem geradas 600 estruturas. Desse número, foram selecionadas as 20 estruturas de menor energia total e, por meio do programa MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996), elas foram agrupadas de modo a se obter a melhor sobreposição das estruturas. Dessas estruturas sobrepostas, foi obtido o valor de RMSD (*Root Mean Square Deviation*) para parte da validação do cálculo.

2.1.2 MÉTODOS

2.1.2.1. Procedimento Geral

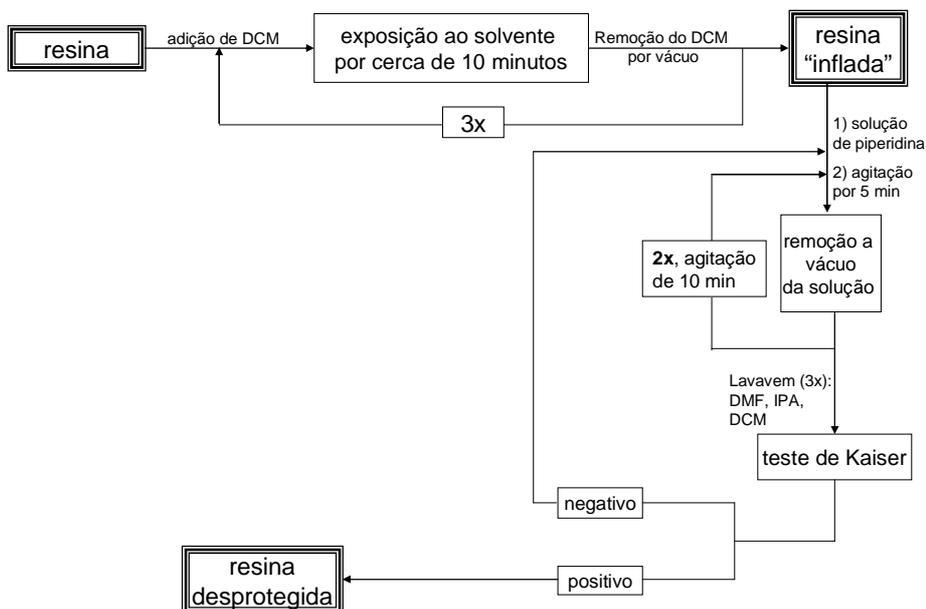
Ambas as cadeias foram sintetizadas em fase sólida, utilizando a estratégia Fmoc, iniciando-se do resíduo de aminoácido C-terminal em direção à extremidade N-terminal, de forma a serem obtidas cadeias com a extremidade C-terminal amidada.

2.1.2.1.1. Preparação da Resina

O primeiro procedimento da síntese constitui na preparação da resina. Isto é feito primeiramente colocando a resina seca no recipiente em que a reação ocorrerá. Em seguida, verte-se sobre a resina um pequeno volume de DCM (em geral 5 mL são suficientes, mas deve ser, acima de tudo, um volume capaz de cobrir toda a resina). A resina deve ficar em contato com o DCM por cerca de 10 minutos. Findo este período de tempo, deve-se remover este solvente por meio de uma bomba para criar um vácuo. Em seguida, deve-se repetir este processo por mais três vezes. Esta etapa é importante, pois o DCM aumenta a superfície de contato da resina, dando a esta um aspecto mais “inflado”, o que facilita o acoplamento dos aminoácidos.

2.1.2.1.2. Desproteção da Resina

Em seguida, sucede-se a desproteção da resina. Assim como os derivados de aminoácido, resinas que originam peptídeos amidados na extremidade C-terminal encontram-se protegidas pelo grupo Fmoc. A remoção desse grupo é feita utilizando-se uma solução de piperidina ou 4-metil-piperidina em DMF, na concentração 20% v/v. Esta solução para a desproteção é adicionada ao frasco da reação, a um volume suficiente para cobrir toda a resina. Submete-se o frasco à agitação moderada, por cerca de 5 minutos e, em seguida, remove-se a solução de piperidina por meio de vácuo. Repete-se este procedimento por mais duas vezes, porém com um tempo de agitação de 10 minutos. Este procedimento deve garantir a desproteção de toda a resina, para que não se tenha diminuições muito grandes do rendimento final da reação. Em seguida, deve-se lavar a resina com DMF, IPA e DCM, nesta ordem e alternadamente, por três vezes, removendo-se cada solvente aplicando-se vácuo sobre o recipiente. Por fim, deve-se fazer o teste de Kaiser para averiguar a desproteção da resina. Neste caso, o teste deve ser positivo, ou seja, os grãos da resina devem estar bem azuis. Este procedimento de preparo da resina encontra-se resumido no **Esquema 2.1** (p. 45).

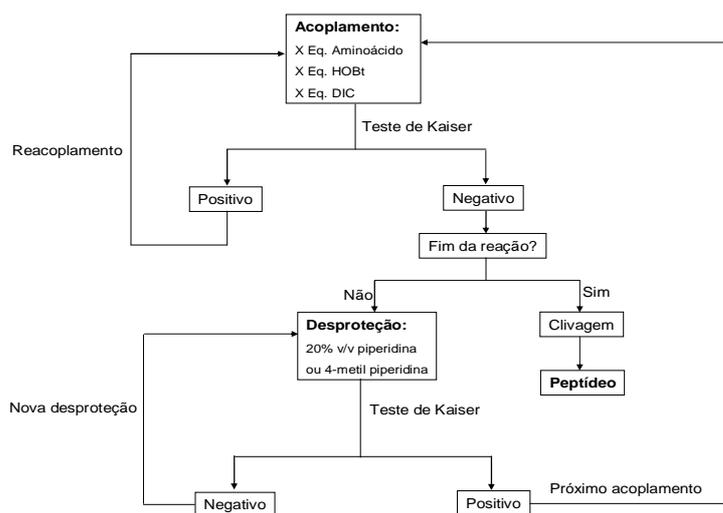


Esquema 2.1. Preparação da resina amidada, com grupo protetor Fmoc, para a síntese de peptídeos.

2.1.2.1.3. Síntese dos peptídeos

Feita a preparação da resina, dá-se início à síntese propriamente dita, que consiste em acoplamentos consecutivos dos derivados de aminoácido à resina. A cada acoplamento, deve-se verter sobre a resina desprotegida uma solução contendo o derivado de aminoácido e as substâncias ativadoras dissolvidos em DCM e DMF na proporção 1:1. Para as duas cadeias, utilizaram-se como ativadores HOBt e DIC que eram misturados a cada aminoácido a ser acoplado nas mesmas quantidades de equivalente molar. O frasco com a solução supracitada é então submetido a agitação moderada durante todo o tempo de reação. Finda a reação, realizam-se quatro lavagens de DMF, álcool isopropílico (IPA) e DCM intercaladas, tal qual a lavagem feita na etapa de preparação da resina e, após, o teste de Kaiser que, depois da reação de acoplamento, deve apresentar resultados negativos, ou seja, os grãos da resina devem mostrar-se claros, em suas cores originais. Se o resultado for realmente negativo, submete-se o sistema à desproteção do grupo amino do último resíduo acoplado, se não, deve-se repetir a reação de acoplamento até que o teste seja negativo. A desproteção é feita utilizando-se uma solução 20% v/v de piperidina ou de 4-metil piperidina adicionada sobre a resina, a um volume suficiente para cobri-la completamente. O sistema é, em seguida, submetido a agitação moderada. Em geral a desproteção é realizada em duas etapas, de 12 minutos cada, sendo que a solução para a desproteção é retirada do frasco entre as duas etapas. Novamente, realiza-se o teste de Kaiser que, desta vez, deverá apresentar resultados positivos, ou seja, os grãos, ao final do tempo de aquecimento devem estar de

uma coloração marrom escura, azulada ou arroxeadada, dependendo do último resíduo acoplado ou das características da cadeia que está sendo sintetizada. Em seguida, acopla-se o próximo resíduo de aminoácido. As etapas desse procedimento repetem-se até que todos os resíduos de aminoácido sejam acoplados. Quando isso ocorrer, a resina (com a cadeia peptídica ligada a ela) é submetida à clivagem, liberando, então, a cadeia peptídica amidada. Este protocolo é ilustrado no **Esquema 2.2**.

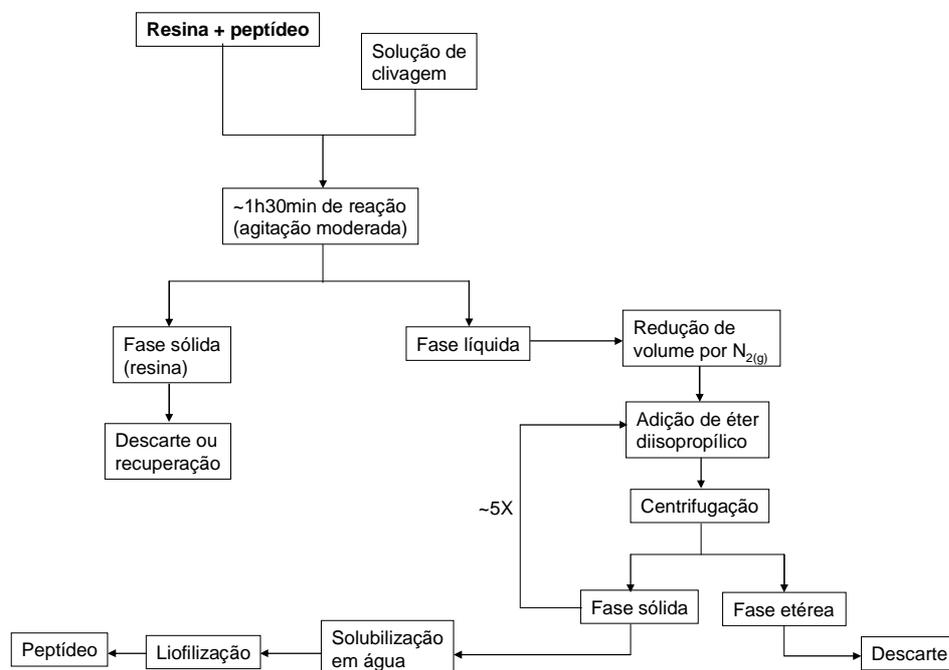


Esquema 2.2. Organograma do protocolo utilizado nas sínteses das cadeias 1 e 2 da distinctina.

2.1.2.1.4. Clivagem dos peptídeos

Ambas as cadeias foram clivadas com solução de 94,5% de ácido trifluoroacético (TFA), 2,5% de água Mili-Q, 2,5% de etanoditiol (EDT) e 1% de triisopropilsilano (TIS), seguindo-se o protocolo padrão de clivagem da estratégia de síntese *Fmoc*. Para se realizar a clivagem, deve se utilizar um volume de 10 a 25 mL dessa solução por grama do sistema resina-peptídeo. Adiciona-se esse volume ao frasco em que se encontra a resina a ser clivada e mantém-se o frasco sob agitação moderada durante o tempo reacional, que é, em geral, cerca de 1h30min. Após o fim da reação, o peptídeo estará solubilizado nessa solução de clivagem juntamente com os grupos protetores das cadeias laterais, e não mais ligado à resina. Separa-se, então, a fase líquida da resina, transfere-a a um tubo falcon, submetendo-a à ação de nitrogênio gasoso para evaporar todos os compostos voláteis utilizados, de forma a restar, na fase líquida, basicamente água, o peptídeo e os demais produtos secundários. Considera-se que se chegou a esta condição quando o volume da solução de clivagem não estiver mais reduzindo. É então adicionado ao tubo certo volume de éter diisopropílico (aproximadamente 10 mL) previamente resfriado em banho de gelo. O sistema é centrifugado e as fases sólida e líquida são separadas. Novamente, adiciona-se o éter ao sólido restante e, mais uma vez, centrifuga-se a amostra e separa-se o líquido do sólido, repetindo-se este passo por pelo menos mais três vezes. Ao fim das centrifugações, quando o sólido estiver bem compactado, este é dissolvido em água de

alto grau de pureza e a amostra é, por fim, liofilizada, para o produto ser caracterizado e purificado. O procedimento de clivagem está representado no **Esquema 2.3**.



Esquema 2.3 Representação do protocolo da reação de clivagem dos peptídeos

2.1.3. SÍNTESE DA CADEIA 1 DA DISTINCTINA

A cadeia 1, cuja seqüência encontra-se na **Tabela 2.1**, foi sintetizada utilizando-se 220 mg de resina da marca Rink, com grau de substituição 0,63 mmol/g, objetivando-se obter cerca de 350 mg de peptídeo bruto ao final da síntese. Como se tratava de uma resina amidada, a síntese se deu a partir da extremidade C-terminal em direção à N-terminal. Desta forma, o primeiro acoplamento foi do resíduo Ile22 e o último acoplamento, do resíduo Glu1. Utilizou-se, para todos os reagentes envolvidos na síntese uma quantidade de 4 equivalentes molares em relação à quantidade esperada do produto final. Como ativadores foram utilizados, para cada acoplamento, 85,7 mg de *N*-hidroxibenzotriazol (HOBt) anidro da marca Novabiochem e 88 µL de *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC) da marca Sigma-Aldrich. Foram utilizados ainda aminoácidos da marca Novabiochem com as cadeias laterais protegidas quando necessário.

Tabela 2.1. Seqüência do monômero Cadeia 1 da distinctina.

Monômero	Seqüência Peptídica
Cadeia 1	ENREV PPGFT ALIKT LRKCK II-NH ₂

As condições reacionais foram as mesmas para todos os acoplamentos, variando-se somente o aminoácido utilizado em cada etapa. O tempo reacional para o primeiro acoplamento foi de 3h30min e, para os demais acoplamentos, foi de cerca de 1h30min. Após o término da síntese, deu-se início à etapa de clivagem. A clivagem foi realizada utilizando-se sobre a resina utilizando-se a solução descrita anteriormente (p. 46).

2.1.4. SÍNTESE DA CADEIA 2 DA DISTINCTINA.

A cadeia 2, cuja seqüência encontra-se na **Tabela 2.2**, foi sintetizada a partir de 313 mg de resina amidada Tentagel SRAM com grau de substituição de 0,27 mmol/g. A síntese foi planejada de forma a produzir aproximadamente 250 mg do peptídeo, com marcação isotópica por ^{15}N no resíduo de leucina na posição 16 (Leu16). O primeiro acoplamento foi realizado utilizando-se reagentes a 4 equivalentes molares em relação à quantidade final de peptídeo. Assim como na síntese da cadeia 1, a seqüência de reações de acoplamento se deu da extremidade *C*-terminal para a *N*-terminal, ou seja, do resíduo de valina na posição 25 da estrutura primária (Val25) para o resíduo de asparagina na posição 1 (Asn1). As quantidades utilizadas para os ativadores HOBt e DIC foram, respectivamente, 51,7 mg 53 μL .

Tabela 2.2. Seqüência do monômero Cadeia 2 da distinctina.

Monômero	Seqüência Peptídica
Cadeia 2	NLVSG LIEAR KYLEQ LHRKL KNCKV-NH ₂

A clivagem foi realizada de forma análoga à reação de clivagem da cadeia 1, utilizando-se 4 mL da solução de clivagem.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. SÍNTESE DAS CADEIAS DA DISTINCTINA

3.1.1. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DE AMOSTRAS DA CADEIA 1.

Algumas amostras da Cadeia 1 obtidas previamente em sintetizador automático (CH1-A, CH1-B e CH1-C) foram utilizadas para estabelecer condições de análise e purificação por CLAE, apesar de apresentarem bem degradadas com aspectos úmidos e escurecidas. A **Tabela 3.1** apresenta as condições de análise da amostra CH1-C-1. A **Figura 3.1** mostra o cromatograma obtido nas condições dadas pela Tabela 3.1. O baixo grau de pureza do peptídeo foi evidenciado pelo grande número de picos até um tempo de retenção (*tr*) de 24 min, destacando-se os picos em tempo de retenção de 25,7, 28,9 e 30,9 min (FCH1-C-1, FCH1-C-2 e FCH1-C-3, respectivamente), sendo um desses provavelmente o monômero da Cadeia 1 por serem os mais abundantes e pelo *tr* de polaridade similar a peptídeos e proteínas. Os picos de *tr* maior do que 31 min podem ser devidos a impurezas em concentrações significativas.

Tabela 3.1. Variação da composição da fase móvel com o tempo da análise CH1-C-1, sob um fluxo de 1,0 mL/min.

Água (0,1% v/v TFA)	Acetonitrila (0,08% v/v TFA)	Tempo (minutos)
100%	0%	0
0%	100%	60

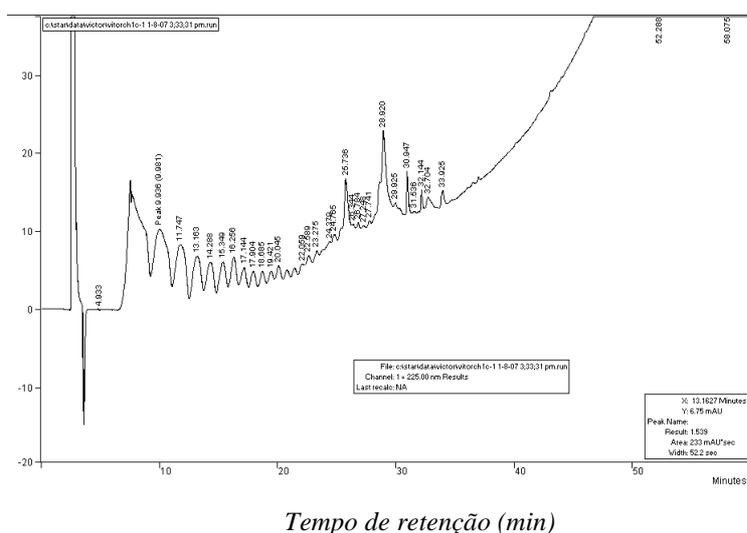


Figura 3.1. Perfil de CLAE da amostra CH1-C, nas condições análise CH1-C-1 (coluna analítica Microsorb C18; fluxo de 1 mL/min; solventes A: H₂O:TFA (10:1) e B: ACN:TFA (100:8); gradiente linear de 0 a 100% em 60 min.

As mesmas condições CH1-C-2 (**Tabela 3.2**, p.51) foram empregadas na análise das amostras CH1-A e CH1-B. O cromatograma de CH1-A (**Figura 3.3**, p.52) apresenta um perfil semelhante ao de CH1-C (**Figura 3.2**, p.51). Porém, os picos FCH1-A-1 ($tr= 15,3$ min) e FCH1-A-2 ($tr= 19,1$ min) são correspondentes respectivamente aos picos de FCH1-C-1 e FCH1-C-2 do cromatograma da **Figura 3.2** (p.51) e com menores intensidades relativas. O pico de FCH1-A-3 ($tr= 22,4$ min) correspondente a FCH1-C-3 apresenta intensidade bem menor em relação a CH1-C (**Figura 3.2**, p. 51).

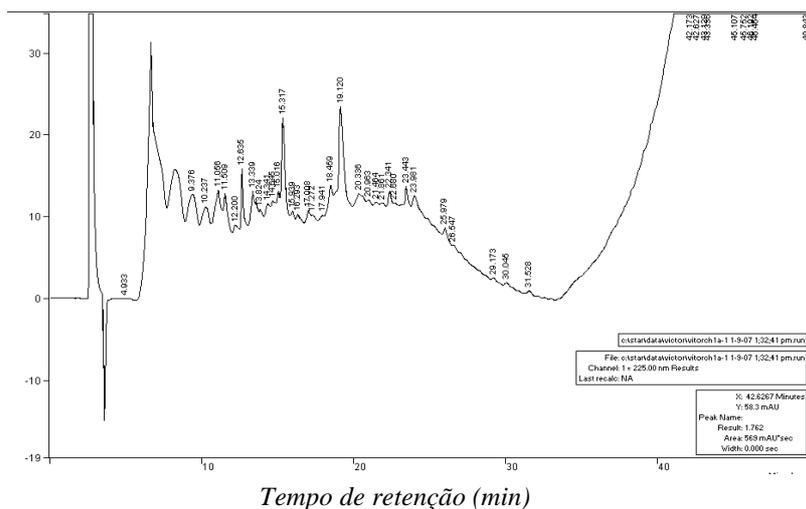


Tabela 3.3. Frações coletadas nas análises cromatográficas das amostras A (**Fig. 3.3**, p. 52), B (**Fig. 3.4**, p. 52) e C (**Fig. 3.2**, p. 51), apresentadas de acordo com seus respectivos tempos de retenção.

Frações	Tempos de retenção médios aproximados (min.)
FCH1-A-1, FCH1-B-1, FCH1-C-1	15,4
FCH1-A-2, FCH1-B-2, FCH1-C-2	19,1
FCH1-A-3, FCH1-B-3, FCH1-C-3	22,4

As frações FCH1-A-1, FCH1-A-2, FCH1-A-3, FCH1-B-1, FCH1-B-2, FCH1-B-3, FCH1-C-1, FCH1-C-2 e FCH1-C-3 foram recolhidas seqüencialmente na coluna semi-preparativa, liofilizadas e enviadas para análise por espectrometria de Massas (EM). A **Figura 3.5** mostra o perfil CLAE da purificação da amostra CH1-C. As frações da amostra CH1-B não apresentaram quantidade suficiente de produto para análise e, portanto, foram obtidos os ionogramas de massas apenas para as outras duas amostras.

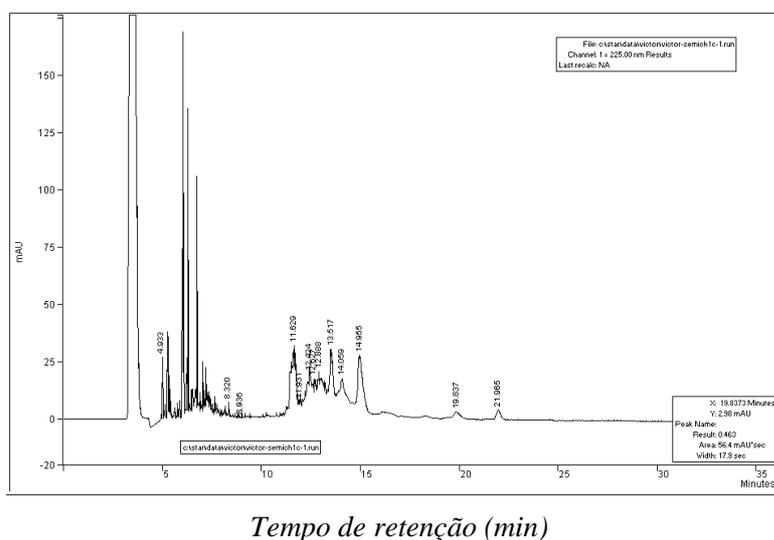


Figura 3.5. Perfil CLAE da purificação da amostra CH1-C sob a condição CH1-C-2, com um fluxo de 4,5 mL/min, destacando FCH1C-1 ($tr = 11,6$ min), FCH1C-2 ($tr = 13,5$ min) e FCH1C-3 ($tr = 14,1$ min); coluna Dynamax C18 e solventes H₂O:TFA 0,1% e ACN:TFA 0,08%

A **Figura 3.6** (p. 54) apresenta o ionograma por espectrometria de massas da fração FCH1-A-1. Alguns picos podem ser destacados, como os registrados em m/z 2219,640, 2397,848, 2412,666, 2377,596, além do pico em m/z 2460,704 predominante nos três ionogramas. O ionograma da fração FCH1-C-1 (**Figura 3.7**, p. 54) apresenta o pico-base em m/z 2168, seguido do pico em m/z 670. Nenhum pico corresponde ao valor de massa/carga do íon molecular da Cadeia 1, indicando que essas frações correspondem a produtos secundários da síntese.

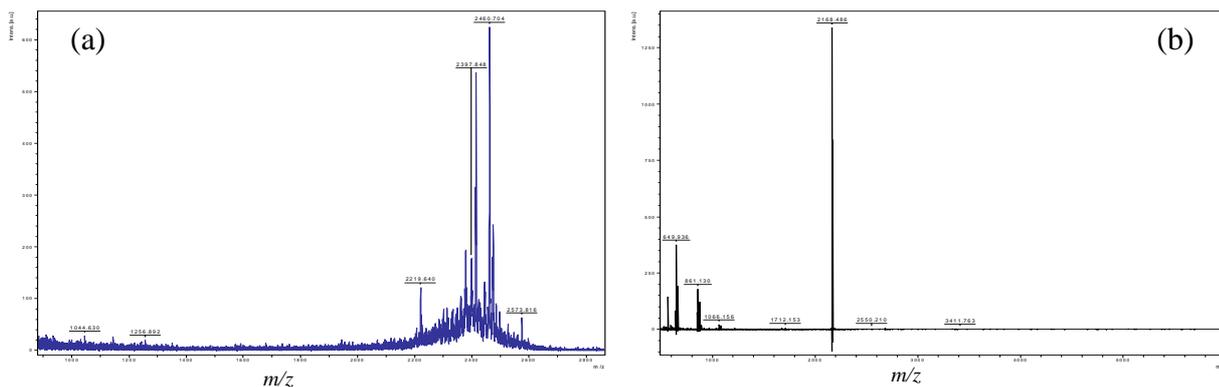


Figura 3.6. Ionogramas: (a) da amostra CH1-A-1 e (b) da fração FCH1-C-1.

As **Figuras 3.7** e **3.8** mostram os ionogramas por EM das frações FCH1-A-2 e FCH1-C-2, respectivamente. O pico-base em m/z 2525, encontra-se próximo à massa molecular da cadeia 1 (cujo valor calculado é de 2526 g/mol), podendo ser atribuído ao pico $M^+ - 1$, além de um sinal em m/z 1263, correspondendo ao pico M^{2+} conforme mostra as **Figuras 3.7** e **3.8**.

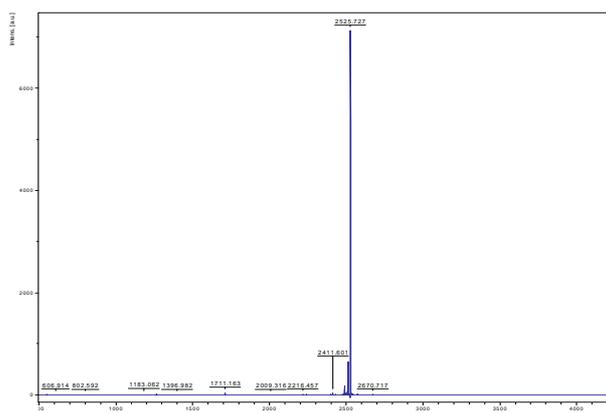


Figura 3.7. Ionograma da fração FCH1-A-2 da amostra CH1-A

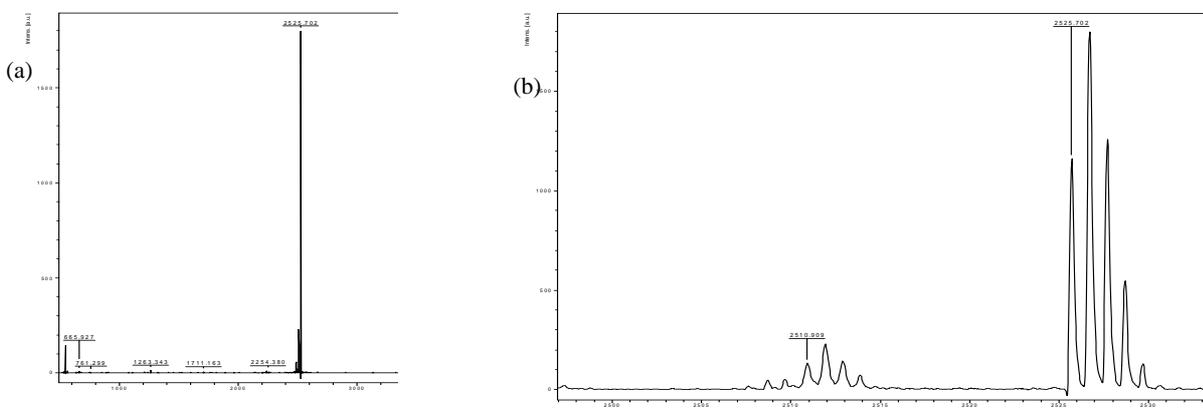


Figura 3.8. (a) Ionograma da fração FCH1-C-2; (b) ampliação da região próxima ao pico do íon molecular.

As **Figura 3.9** apresenta os ionogramas das frações FCH1-A-3 e FCH1-C-3. Em ambos os ionogramas pode-se verificar apenas um pico-base em m/z 2573, indicando haver predominantemente um produto secundário nessas amostras.

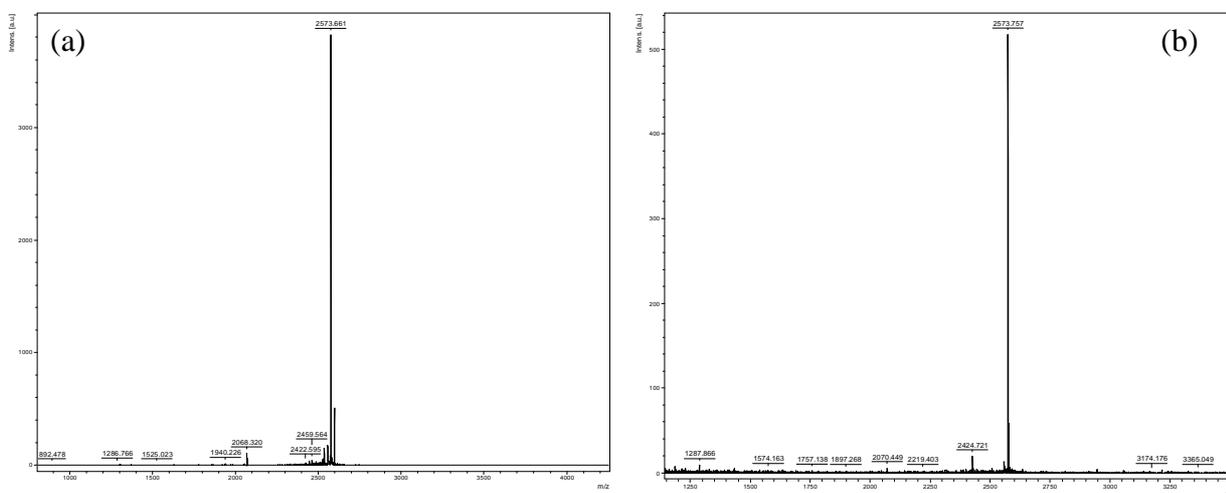


Figura 3.9. Ionogramas (a) da amostra CH1-A-3 e (b) da fração FCH1-C-3.

3.1.2. SÍNTESE DA CADEIA 1

A síntese da Cadeia 1 foi feita manualmente, pela estratégia Fmoc (Chan e White, 2000). O sentido de acoplamento é apresentado na **Tabela 3.4**. O acoplamento e a desproteção foram acompanhados pelo teste de Kaiser, um teste qualitativo para a identificação de aminas primárias. Assim, a presença de grupos amino livres na seqüência peptídica é evidenciada pela cor púrpura nos grãos em que o teste é realizado.

Tabela 3.4. Seqüência peptídica da cadeia 1 da distinctina, com a ordem de acoplamento dos aminoácidos

Peptídeo	Seqüência peptídica																					
Cadeia 1	E	N	R	V	P	P	G	F	T	A	L	I	K	L	R	K	C	K	I	I		
	22	21	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1

A síntese da cadeia 1 foi realizada eficientemente, não necessitando de reacoplamentos. A **Tabela 3.5** (p. 56) mostra as quantidades dos demais reagentes utilizados para cada etapa, bem como os resultados de acoplamento e desproteção através dos testes de Kaiser. Após a conclusão da síntese, foi realizada a etapa de clivagem, utilizando-se a solução descrita anteriormente (p. 46) sobre a resina. Foram obtidos 286 mg do peptídeo bruto ao final da síntese, consistindo em 95% de rendimento.

Tabela 3.5. Acompanhamento da síntese da Cadeia 1 – ENREV PPGFT ALIKT LRKCK II-NH₂.

Número do Acoplamento	Derivado de Aminoácido	Acoplamento				Desproteção		
		Massa de Aminoácido	Teste de Kaiser	Reacoplamento	Solvente	Tempo de reação	Tempo de desproteção	Teste de Kaiser
1	Fmoc-Ile-OH	198 mg	Negativo	Não	DMF	3 h 30 min	15 min	Positivo
2	Fmoc-Ile-OH	198 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	1 h 30 min	12 min	Positivo
3	Fmoc-Lys(Boc)-OH	262 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	1 h 30 min	12 min	Positivo
4	Fmoc-Cys(Trt)-OH	328 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	1 h 30 min	12 min	Positivo
5	Fmoc-Lys(Boc)-OH	262 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	1 h 30 min	12 min	Positivo
6	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	363 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	1 h 30 min	12 min	Positivo
7	Fmoc-Leu-OH	198 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	1 h 30 min	12 min	Positivo
8	Fmoc-Thr(<i>t</i> -Bu)-OH	223 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	1 h 30 min	12 min	Positivo
9	Fmoc-Lys(Boc)-OH	262 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	1 h 30 min	12 min	Positivo
10	Fmoc-Ile-OH	198 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	1 h 30 min	12 min	Positivo
11	Fmoc-Leu-OH	198 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	1 h 30 min	12 min	Positivo
12	Fmoc-Ala-OH	174 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	1 h 30 min	12 min	Positivo
13	Fmoc-Thr(<i>t</i> -Bu)-OH	223 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	1 h 30 min	12 min	Positivo
14	Fmoc-Phe-OH	297 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	1 h 30 min	12 min	Positivo
15	Fmoc-Gly-OH	120 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	1 h 30 min	12 min	Positivo
16	Fmoc-Pro-OH	189 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	1 h 30 min	12 min	Positivo
17	Fmoc-Pro-OH	189 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	1 h 30 min	12 min	Positivo
18	Fmoc-Val-OH	190 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	1 h 30 min	12 min	Positivo
19	Fmoc-Glu(Trt)-OH	248 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	1 h 30 min	12 min	Positivo
20	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	363 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	1 h 30 min	12 min	Positivo
21	Fmoc-Asn(Trt)-OH	334 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	1 h 30 min	12 min	Positivo
22	Fmoc-Glu(Trt)-OH	248 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	1 h 30 min	12 min	Positivo

3.1.3. SÍNTESE DA CADEIA 2

A síntese da Cadeia 2 foi feita manualmente, pela estratégia Fmoc (Chan e White, 2000), com resina amidada. O sentido de acoplamento é apresentado na **Tabela 3.6**, da extremidade *C*-terminal para a extremidade *N*-terminal. O acoplamento e a desproteção foram acompanhados pelo teste de Kaiser, um teste qualitativo para a identificação de amins primárias. Assim, a presença de grupos amino livres na seqüência peptídica é evidenciada pela cor púrpura nos grãos em que o teste é realizado.

Tabela 3.6. Seqüência peptídica da Cadeia 2 da distinctina, com a ordem de acoplamento dos aminoácidos

Peptídeo	Seqüência peptídica																								
Cadeia 2	N	L	V	S	G	L	I	E	A	R	K	Y	L	E	Q	L	H	R	K	L	K	N	C	K	V
	25	24	23	22	21	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1

A síntese foi iniciada com a resina mantida por 15 min em um meio para desproteção (neste caso, o meio utilizado foi a piperidina). Procedeu-se a síntese pela etapa de acoplamento do primeiro resíduo, a valina, por uma reação de cerca de 210 min. Os acoplamentos seguintes ocorreram sob agitação moderada por um tempo de reação de cerca de 90 min.

Até o oitavo acoplamento (Arg18) a reação foi realizada eficientemente. No entanto, o nono acoplamento, adição do resíduo His17, o resultado do teste de Kaiser foi duvidoso, apresentando grãos de resina mais escuros que o usual, sendo realizado um reacoplamento com tempo de reação maior (120 min). O mesmo procedimento foi realizado para os dois acoplamentos subseqüentes (adição dos resíduos Leu16 e Gln15). Para os próximos acoplamentos, os reagentes de Kaiser foram preparados recentemente, mantendo o tempo de reação por 120 min. Apenas nos dois últimos acoplamentos, realizaram-se as reações sob agitação moderada por cerca de 150 min. Além disso, houve problemas na desproteção do resíduo Leu2, sendo que o teste de Kaiser apresentou grãos de resina demasiado claros. Adicionaram-se, então, algumas gotas de Triton X-305 da Sigma-Aldrich a fim de desagregar os grãos da resina, cuja compactação poderia estar impedindo a ação da solução de piperidina. Em seguida foi realizada mais uma desproteção por 20 min. Observou-se que, desta vez, os grãos ficaram mais escuros, mas, mesmo assim, ainda estavam mais claros que o esperado. A **Tabela 3.7** mostra um resumo da síntese, com as massas utilizadas de cada aminoácido, tempos de reação e resultados dos testes de Kaiser.

Tabela 3.7 Acompanhamento da síntese da Cadeia 2 – NLVSG LIEAR KYLEQ LHRKL KNCKV-NH₂

Número do Acoplamento	Resíduo de Aminoácido	Acoplamento				Desproteção		
		Massa de Aminoácido	Teste de Kaiser	Reacoplamento	Solvente	Tempo de reação	Tempo de desproteção	Teste de Kaiser
1	Fmoc-Val-OH	115 mg	Negativo	Não	DMF	3 h 30 min	15 min	Positivo
2	Fmoc-Lys(Boc)-OH	158 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	1 h 30 min	12 min	Positivo
3	Fmoc-Cys(Trt)-OH	198 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	1 h 30 min	12 min	Positivo
4	Fmoc-Asn(Trt)-OH	202 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	1 h 30 min	12 min	Positivo
5	Fmoc-Lys(Boc)-OH	158 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	1 h 30 min	12 min	Positivo
6	Fmoc-Leu-OH	120 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	1 h 30 min	12 min	Positivo
7	Fmoc-Lys(Boc)-OH	158 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	1 h 30 min	12 min	Positivo
8	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	219 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	1 h 30 min	12 min	Positivo
9	Fmoc-His(Trt)-OH	209 mg	Ambíguo	Sim	DMF/DCM 1:1	1 h 30 min	12 min	Positivo
10	Fmoc-Leu*-OH	120 mg	Ambíguo	Sim	DMF/DCM 1:1	2 h	12 min	Positivo
11	Fmoc-Gln-OH	124 mg	Ambíguo	Sim	DMF/DCM 1:1	2 h	12 min	Positivo
12	Fmoc-Glu-OH	144 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	2 h	12 min	Positivo
13	Fmoc-Leu-OH	120 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	2 h	12 min	Positivo
14	Fmoc-Tyr(<i>t</i> -Bu)-OH	155 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	2 h	12 min	Positivo
15	Fmoc-Lys(Boc)-OH	158 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	2 h	12 min	Positivo
16	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	219 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	2 h	12 min	Positivo
17	Fmoc-Ala-OH	105 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	2 h	12 min	Positivo
18	Fmoc-Glu-OH	144 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	2 h	12 min	Positivo
19	Fmoc-Ile-OH	120 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	2 h	12 min	Positivo
20	Fmoc-Leu-OH	120 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	2 h	12 min	Positivo
21	Fmoc-Gly-OH	100 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	2 h	12 min	Positivo
22	Fmoc-Ser(<i>t</i> -Bu)-OH	130 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	2 h	12 min	Positivo
23	Fmoc-Val-OH	115 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	2 h	12 min	Positivo
24	Fmoc-Leu-OH	120 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	2 h 30 min	20 min	Ambíguo
25	Fmoc-Asn(Trt)-OH	202 mg	Negativo	Não	DMF/DCM 1:1	2 h 30 min	20 min	Positivo

3.1.4. PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS

3.1.4.1. Purificação e caracterização da Cadeia 1

A partir das condições experimentais das análises de espectrometria de massas e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) no estudo das amostras CH1-A, CH1-B e CH1-C (ver item 3.1.1), a Cadeia 1 apresenta um $tr = 19,4$ min (**Tabela 3.3**, p. 53). A análise por CLAE da Cadeia 1 sintetizada manualmente apresenta um pico muito intenso de $tr = 19,8$ min (**Figura 3.10**), confirmando o produto desejado.

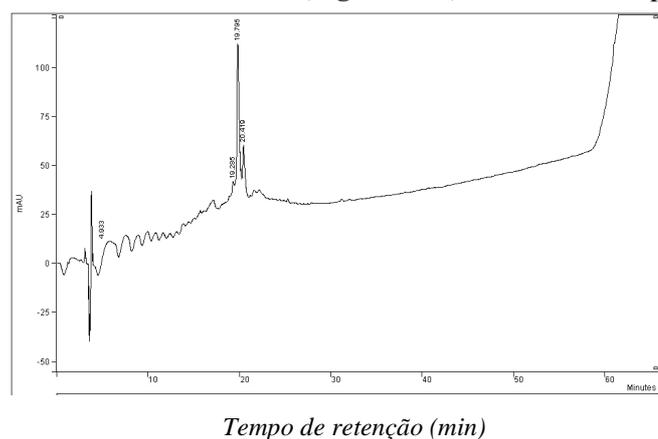


Figura 3.10. Perfil CLAE da amostra bruta da Cadeia 1 sintetizada manualmente (método CH1-C-2 descrito na **Tabela 3.2** - p. 51; coluna Microsorb C-18; solventes, H₂O:TFA 0,1% e ACN:TFA 0,08%).

O produto bruto (40 mg) foi purificado por CLAE, com injeções de 200 μ L de solução 5 mg/mL da amostra em coluna semi-preparativa. O perfil cromatográfico resultante dessa purificação é apresentado na **Figura 3.11**. Todas as alíquotas referentes ao produto foram reunidas e liofilizadas, obtendo-se 30 mg (rendimento de 75%) de produto. As condições de fluxo e gradiente utilizadas encontram-se resumidas na **Tabela 3.8** (p. 60). O fluxo utilizado foi de 3,0 mL/min e $tr = 17,1$ min.

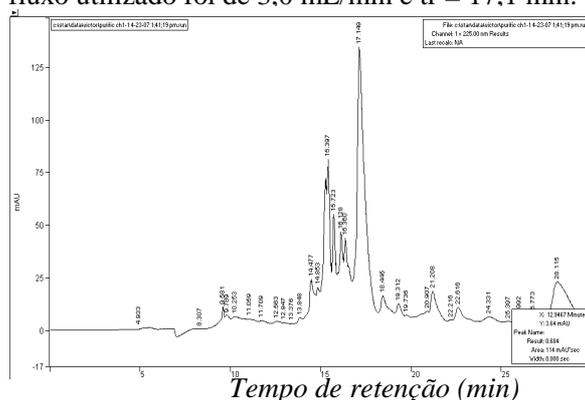


Figura 3.11. Perfil CLAE da amostra purificada da Cadeia 1 sintetizada manualmente (método descrito na **Tabela 3.8** – p. 60; fluxo de 3,0 mL/min; coluna Dynamax C18; solventes H₂O:TFA 0,1% e ACN:TFA 0,08%).

Tabela 3.8. Gradiente utilizado para a purificação da cadeia 1, empregando fluxo de 3,0 mL/min.

Água (0,1% v/v TFA)	Acetonitrila (0,08% v/v TFA)	Tempo (minutos)
100 %	0%	0
60%	40%	10
55%	45%	20
0%	100%	25

3.1.4.2. Purificação e caracterização da Cadeia 2

Após a liofilização da Cadeia 2 sintetizada manualmente, foi realizada análise por CLAE. O produto (1,0 mg) foi dissolvido em 1 mL de água e as análises foram realizadas por injeções de 20 μ L dessa solução. Inicialmente foi empregado um gradiente de 100% de solução de 0,1% de TFA em água e, no final, de 100% de solução 0,08% de TFA em acetonitrila, por 6 min (**Tabela 3.9**). O cromatograma resultante é mostrado na Figura 3.14.

Tabela 3.9. Primeiro gradiente utilizado para análise da cadeia 2, empregando fluxo de 3,0 mL/min

Água (0,1% v/v TFA)	Acetonitrila (0,08% v/v TFA)	Tempo (minutos)
100%	0%	0
0%	100%	60

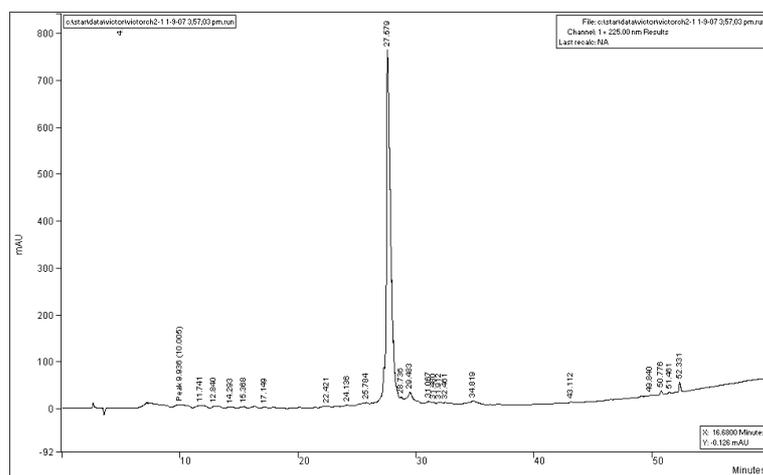


Figura 3.12. Perfil de CLAE da Cadeia 2 sintetizada manualmente (condições dadas na Tabela 3.9; coluna Microsorb C18; solventes H₂O:TFA 0,1% e ACN:TFA 0,08%).

O cromatograma da **Figura 3.12** (p. 60) registra um pico intenso em $t_r = 27,6$ min, indicando um alto grau de pureza do produto sintetizado. Para diminuir o tempo de análise e resolver melhor os picos nas regiões próximas ao da Cadeia 2, foi utilizado um gradiente com duração de 40 minutos, conforme descrito na **Tabela 3.10**. Nesta análise o pico predominante foi registrado em $t_r = 27,5$ min, conforme mostrado na **Figura 3.13**.

Tabela 3.10. Segundo gradiente utilizado para a análise do produto obtido da síntese da cadeia 2. O fluxo para este gradiente foi de 3,0 mL/min.

Água (0,1% v/v TFA)	Acetonitrila (0,08% v/v TFA)	Tempo (minutos)
100%	0%	0
75%	25%	10
50%	50%	35
0	100%	40

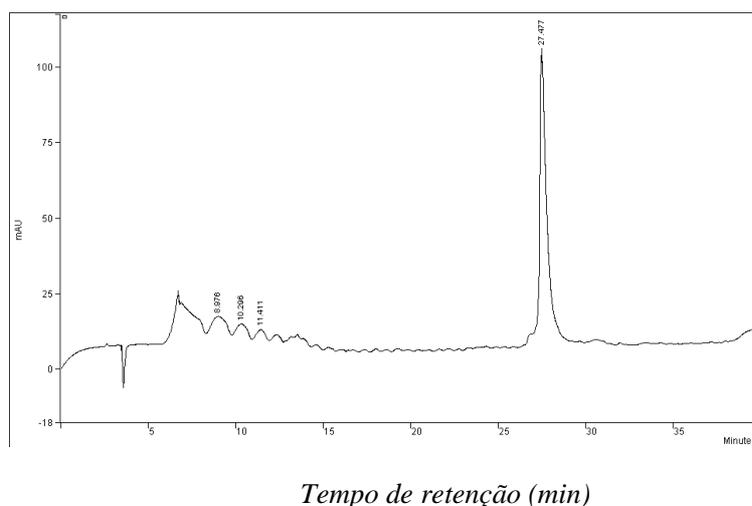
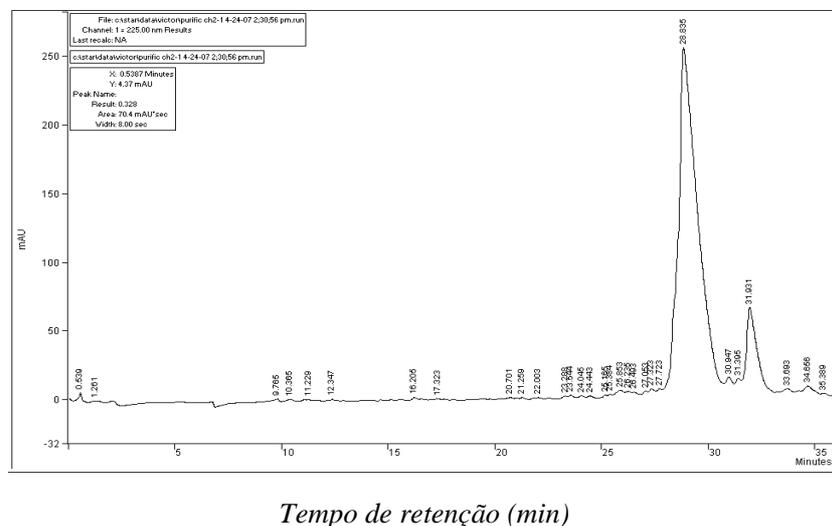


Figura 3.13. Cromatograma do produto de síntese da cadeia 2, utilizando-se o gradiente descrito na Tabela 3.10 (coluna Microsorb C18, solventes H₂O:TFA 0,1% e ACN:TFA 0,08%).

A purificação do produto de síntese da Cadeia 2 foi realizada após terem sido estabelecidas as condições de análise. As condições utilizadas são descritas na **Tabela 3.10**, porém com um fluxo de 4,5 mL/min. Uma solução do produto foi preparada a uma concentração de 5 mg/mL, injetando-se 200 μ L de cada vez. O cromatograma obtido é mostrado na **Figura 3.14** (p. 62). Durante a purificação, foram recolhidas duas frações: FCH2-1, que consistiu em um pico de intensidade muito baixa, com tempo de

retenção muito próximo ao do sinal principal, e FCH2-2, que consistiu no pico predominante do cromatograma.



Tempo de retenção (min)

Figura 3.14. Cromatograma do produto purificado da síntese da cadeia 2, nas condições descritas na **Tabela 3.10**.

Ambas as frações foram recolhidas e liofilizadas para análise por espectrometria de massas. Apesar de quantidade recolhida de FCH2-1 não ter sido suficiente para análise, pôde-se obter o ionograma de FCH2-2 (**Figura 3.15**), que confirmou ser esta fração a cadeia 2, uma vez que foram observados picos em m/z 2952, correspondendo a $M^+ - 1$, e de m/z 1479, relativo a M^{2+} . Além disso, pôde ser verificar o alto grau de pureza apresentado pelo produto final da síntese.

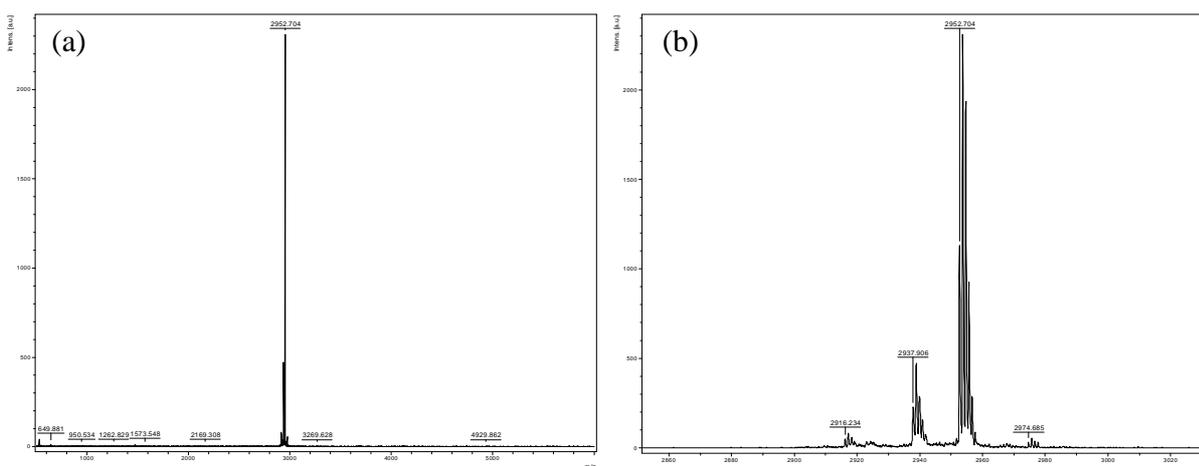


Figura 3.15. (a) Ionograma da fração FCH2-2; (b) ampliação da região do ionograma próxima ao pico do íon molecular.

3.2. DICROÍSMO CIRCULAR (CD)

Os estudos de dicróismo circular (CD) foram realizados com o intuito de serem obtidas informações a respeito das estruturas secundárias de ambos os monômeros da distinctina (Cadeia 1 e Cadeia 2), em diferentes concentrações de TFE, que foi o meio utilizado nos experimentos de RMN. A literatura registra que 2,2,2-trifluoroetanol é um solvente que promove a formação de ligações de hidrogênio intramoleculares em regiões de peptídeos onde há tendência α -helicoidal, porém não induz estruturas onde não há essa tendência (Goodman *et al.*, 1971; Marion *et al.*, 1988; Bruschi e Gierasch, 1990; Blanco *et al.*, 1994; Gesell *et al.*, 1997).

O espectro de CD do monômero Cadeia 1, mostrado na **Figura 3.16**, indica uma certa tendência desse peptídeo em adotar a forma α -helicoidal. Isso é evidenciado pela presença de uma região positiva próximo a 190 nm, correspondente a uma transição $\pi \rightarrow \pi^*$, seguida de dois mínimos com valores negativos em 205 nm e em 220 nm, correspondendo às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$, respectivamente. Entretanto, se comparado ao padrão desse tipo de estrutura (**Figura 1.24**, p. 39), percebe-se que os mínimos do espectro registrado para a Cadeia 1 ocorrem a uma menor intensidade e são menos definidos. Isso sugere que, embora haja estrutura α -hélice, esta não se encontra presente em grande parte do peptídeo, coexistindo com outras formas. Todavia, foi também observado que o aumento da concentração de TFE favorece a forma α -hélice desse peptídeo, ocorrendo um máximo de estruturação a 80% de TFE.

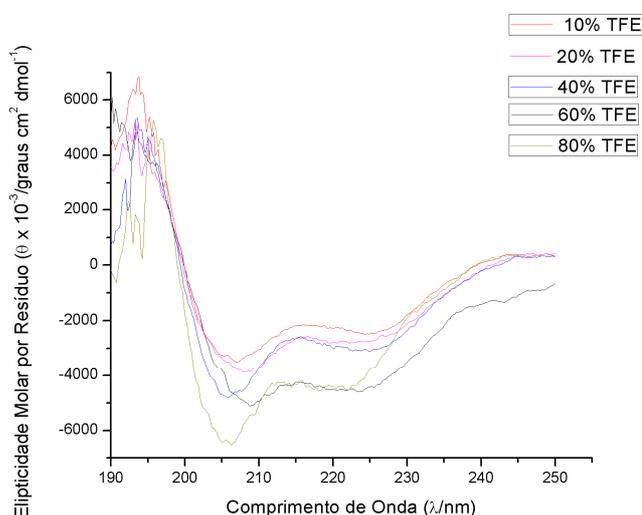


Figura 3.16. Espectros de dicróismo circular (CD) do monômero Cadeia 1 da distinctina, em 10% de TFE (vermelho), em 20% de TFE (magenta), em 40% de TFE (azul), em 60% de TFE (preto) e em 80% de TFE (marrom).

O espectro de CD da Cadeia 2 (**Figura 3.17**) mostrou uma forte tendência α -helicoidal, correspondendo perfeitamente ao espectro padrão dessa estrutura secundária (**Figura 1.24**, p. 39), apresentando dois mínimos na região negativa, em 209 e 222 nm. Foi observado também o aumento da estruturação com o aumento da concentração de TFE na solução, apresentando um máximo de estruturação em 80% de TFE, assim como observado para a Cadeia 1. Entretanto, se comparada a este monômero, a Cadeia 2 apresentou uma predominância de estrutura α -hélice, evidenciada pelo espectro com os mínimos e máximo bem definidos.

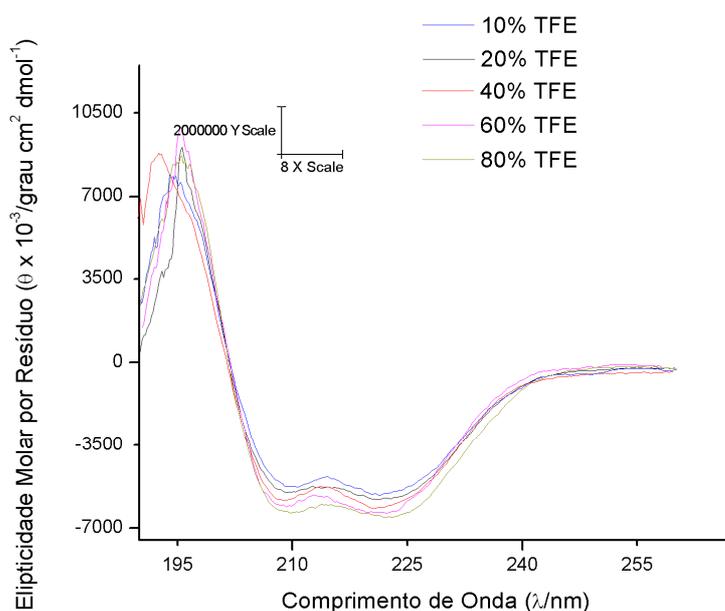


Figura 3.17. Espectros de dicroísmo circular (CD) do monômero Cadeia 2, da distinctina em 10% de TFE (azul), em 20% de TFE (preto), em 40% de TFE (vermelho), em 60% de TFE (magenta) e em 80% de TFE (marrom).

3.3. ANÁLISE CONFORMACIONAL POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

A análise estrutural da distinctina em sua forma heterodimérica e com as extremidades *C*-terminal carboxiladas em ambas as cadeias foi realizada anteriormente por RMN em solução aquosa (Raimondo *et al.*, 2005). Como resultados desse estudo, ambas as cadeias, quando condensadas no heterodímero, apresentam-se preferencialmente em solução aquosa na forma α -helicoidal e como tetrâmero (estrutura quaternária composta por dois dímeros, mantida por ligações de hidrogênio). No entanto, não são descritos na literatura estudos sobre a estrutura do heterodímero ou dos seus monômeros por RMN em meios que mimetizam membranas. Nesta seção será descrita a análise conformacional por RMN dos monômeros da distinctina (Cadeia 1 e Cadeia 2).

Pelos estudos anteriores (Raimondo *et al.*, 2005) e os dados de dicroísmo circular, ambas as cadeias da distinctina apresentam alto conteúdo de formas α -helicoidais, tendo a cadeia 1 um conteúdo menor devido à presença de resíduos de prolina. Desta forma, foram realizados experimentos de RMN em que a forma helicoidal fosse favorecida, obtendo-se mapas de contorno 2D TOCSY, NOESY, ^1H ^{15}N -HSQC e ^1H ^{13}C -HSQC. Nesses experimentos foram empregados trifluoretanol- d_2 (TFE- d_2) em água, na concentração 50% v/v, com os peptídeos amidados na extremidade *C*-terminal para favorecer adoção de formas α -helicoidais.

A análise dos espectros de RMN foi realizada pelo método de atribuição seqüencial (Billeter *et al.*, 1982). Este método consiste na identificação tanto dos resíduos de aminoácido por meio de mapas de contornos TOCSY quanto da seqüência peptídica e de elementos de estruturas secundária e terciária por meio de mapas de contornos NOESY. Outros experimentos como ^1H ^{13}C -HSQC e ^1H ^{15}N -HSQC foram utilizados como fontes auxiliares de informação para a elucidação estrutural e para resolver ambigüidades da análise dos outros mapas de contornos.

As atribuições dos hidrogênios iniciaram-se pela análise dos mapas de contornos TOCSY, assinalando o máximo possível de conectividades intra-residuais, levando-se em conta os padrões TOCSY descritos na literatura para cada resíduo (Wüthrich, 1986). Nesta etapa, priorizou-se a identificação de resíduos característicos e/ou únicos na seqüência peptídica, permitindo a atribuição de forma inequívoca de hidrogênios de uma determinada região da seqüência peptídica. Para ambas as cadeias teve-se como ponto de partida o resíduo de glicina, pois apresenta conectividades características que facilita sua identificação, além de ser encontrado apenas um deste resíduo em cada cadeia. Os resíduos de aminoácidos aromáticos, como fenilalanina (Cadeia 1) e tirosina (Cadeia 2) e os resíduos de valina, isoleucina e alanina em ambas as cadeias auxiliaram também a elucidação estrutural. No entanto, como vários resíduos idênticos encontram-se em ambas as cadeias, não se pôde concluir as atribuições somente pela análise dos mapas de contornos TOCSY.

A interpretação dos dados de RMN foi dificultada pela presença de vários resíduos de lisina e leucina, pois hidrogênios destes resíduos apresentam deslocamentos químicos e padrões de conectividade muito similares entre si. Dessa forma, foram analisadas as correlações inter-residuais advindas do mapa de contornos NOESY e de informações complementares dos mapas de contornos HSQC, que foram importantes para interpretar correlações sobrepostas, em especial, nos mapas de contornos TOCSY e NOESY.

3.3.1. ANÁLISE POR RMN DA CADEIA 1 DA DISTINCTINA.

A **Figura 3.18** mostra o mapa de correlação TOCSY da cadeia 1 com as atribuições de sinais. Pela análise, foram identificados os sinais relativos a resíduos característicos, como glicina, fenilalanina, treonina e arginina e cisteína. Nessa etapa inicial, foram atribuídos os hidrogênios α , β e amídicos de resíduo da seqüência peptídica.

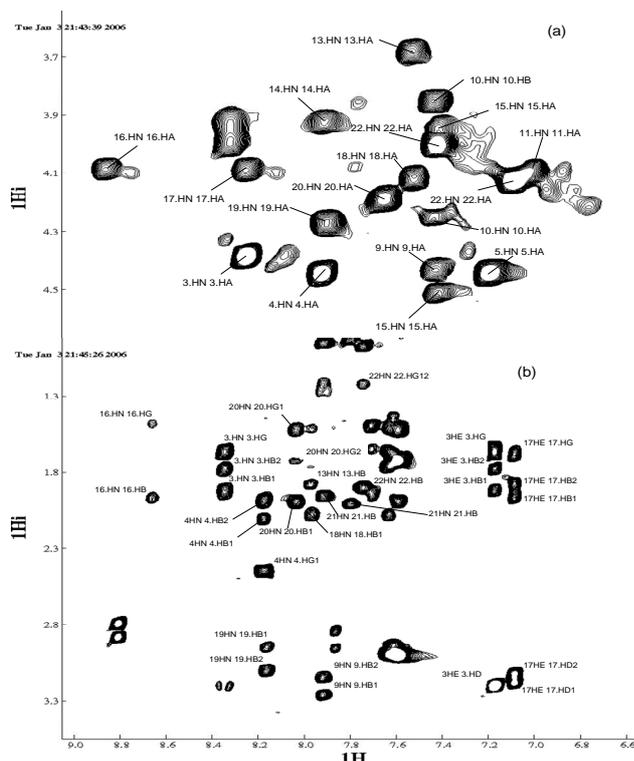


Figura 3.18. Mapa de contornos TOCSY da cadeia 1 (600 MHz; TFE- d_2 : H_2O 1:1) mostrando conectividades intra-residuais dos tipos: (a) $\text{H}^{\text{N}}/\text{H}^{\alpha}$ e (b) $\text{H}^{\text{N}}/\text{H}^{\beta}$.

A **Figura 3.19**, p. 67, apresenta mapas de contornos NOESY da cadeia 1, registrando as quatro regiões principais utilizadas para a elucidação estrutural: de correlações entre H^{α} e H^{N} , H^{N} e H^{N} , H^{N} e H^{β} , além de correlações entre H^{α} e H^{β} . De acordo com os dados de Dicroísmo Circular da Cadeia 1, a região entre a extremidade N -terminal e o resíduo Pro7 não apresenta formas α -helicoidais, diferentemente da região α -

helicoidal entre Gly8 e Ile22. Apesar do resíduo Pro7 não se encontrar na região α -helicoidal, seus hidrogênios puderam ser atribuídos pela proximidade espacial com o resíduo Gly8. A partir da atribuição de hidrogênios do resíduo Gly8, foram assinalados hidrogênios de resíduos adjacentes, até a extremidade C-terminal da Cadeia 1. Em seguida, os sinais relativos a hidrogênios dos resíduos Glu1 a Pro6 foram atribuídos.

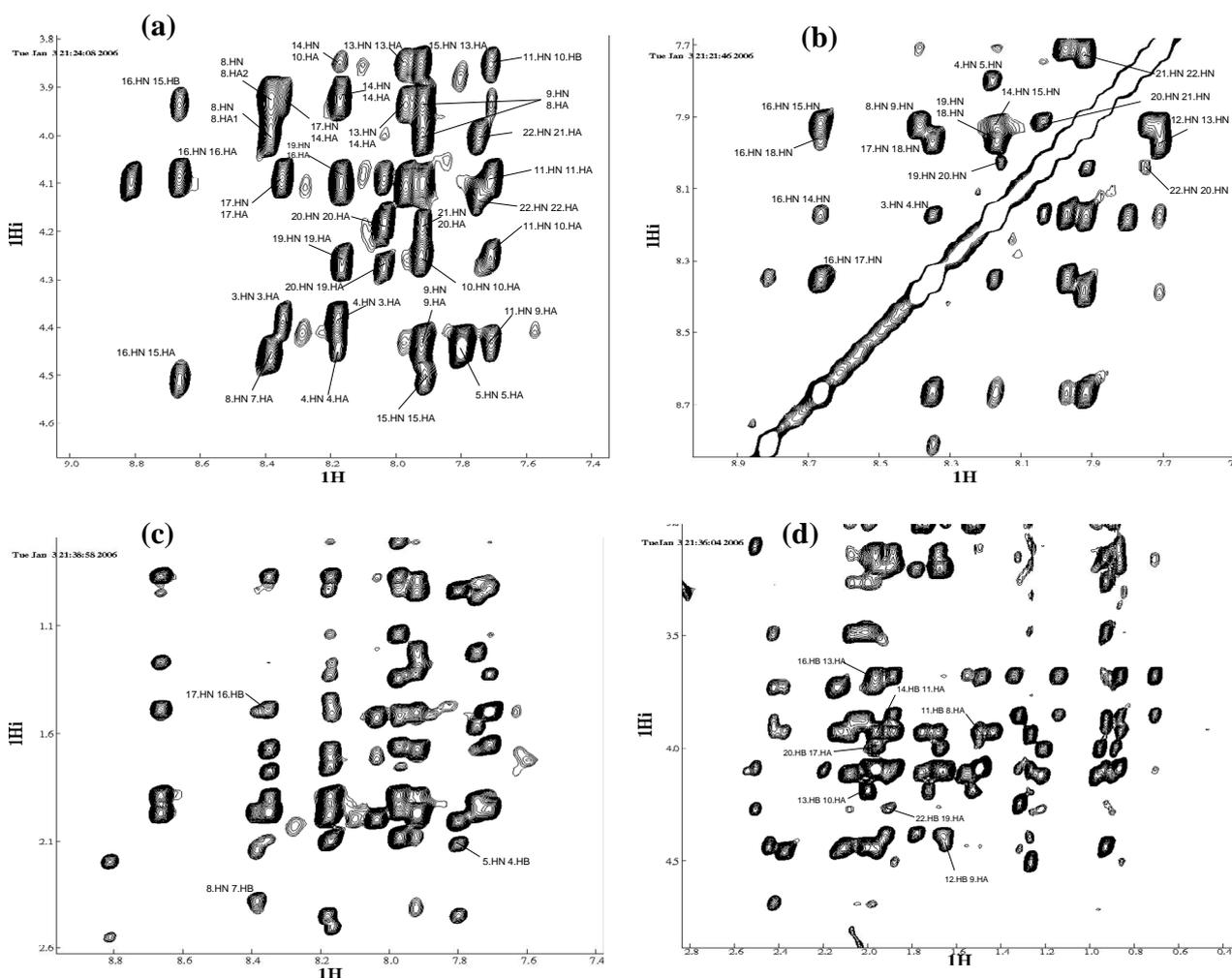


Figura 3.19. Mapas de contornos NOESY da Cadeia 1 (600 MHz; TFE- d_2 :H $_2$ O 1:1) mostrando conectividades inter-residuais dos tipos: (a) $d_{\alpha N}(i, i+1)$, $d_{\alpha N}(i, i+2)$, $d_{\alpha N}(i, i+3)$ e $d_{\alpha N}(i, i+4)$; (b) $d_{NN}(i, i+1)$ e $d_{NN}(i, i+2)$; (c) $d_{\beta N}(i, i+1)$ e (d) $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$.

A identificação dos sinais relativos aos hidrogênios do resíduo de Gly8 foi realizada inicialmente pela atribuição de H $^\alpha$ no mapa de contornos ^{13}C - ^1H HSQC (**Figura 3.20**, p. 68). A correlação entre C $^\alpha$ e H $^\alpha$ foi identificada inequivocamente por ser o único sinal desdobrado de fase negativa registrado naquela região, permitindo a atribuição estereoespecífica dos dois hidrogênios H $^\alpha$ deste resíduo. Além disso, o mapa de

contornos TOCSY mostra correlações dos dois hidrogênios H^α com o hidrogênio amídico. O hidrogênio amídico do resíduo de Pro7 foi atribuído pelas correlações NOESY do tipo $d_{\alpha N}(i, i+1)$ (**Figura 3.19a**, p.67) e $d_{\beta N}(i, i+1)$ (**Figura 3.19c**, p. 67) com os hidrogênios do resíduo Gly8, além de confirmado pelo padrão de correlações escalares de prolina no mapa de contornos TOCSY. O hidrogênio amídico do resíduo Phe9 foi atribuído pelo padrão TOCSY. Os hidrogênios aromáticos H^δ e H^ϵ foram atribuídos a partir das correlações NOESY de $d_{NN}(i, i+1)$ e $d_{\alpha N}(i, i+1)$ com o resíduo Gly8 (**Figuras 3.19b** e **3.19a**, p. 67, respectivamente).

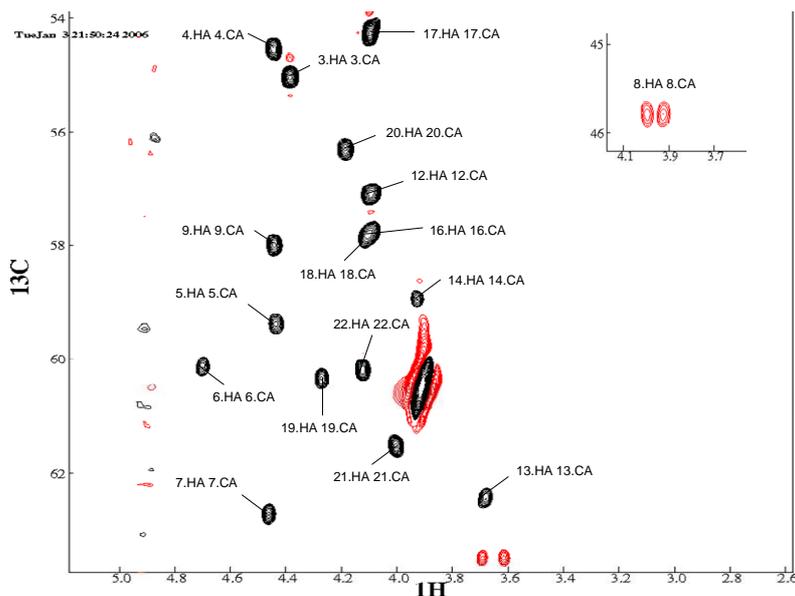


Figura 3.20. Mapa de contornos ^{13}C - ^1H HSQC da Cadeia 1 (600 MHz; TFE- d_2 : H_2O 1:1) mostrando conectividades intra-residuais $\text{C}^\alpha - \text{H}^\alpha$ (em destaque correlações do resíduo Gly8).

Os sinais dos hidrogênios do resíduo Ala11 foram identificados principalmente pela correlação entre C^β e H^β no mapa de contornos ^{13}C - ^1H HSQC e pelo fato de não haver correlações com nenhum outro hidrogênio de cadeia lateral além dos H^β . No mapa de contornos ^{13}C - ^1H HSQC são registradas duas correlações relativas aos hidrogênios metílicos deste resíduo. A atribuição foi confirmada pelas correlações NOESY dos tipos $d_{\alpha N}(i, i+2)$ (**Figura 3.19a**, p. 67) e $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$ (**Figura 3.19d**, p. 67) entre os hidrogênios da Ala11 com Phe9 e Gly8, respectivamente.

A Cadeia 1 apresenta dois resíduos de treonina, Thr10 e Thr15. O resíduo Thr10 foi identificado pelo sinal de RMN de ^1H com deslocamentos químicos dos hidrogênios beta em torno de δ_{H} 3,9 ppm. A atribuição dos hidrogênios do resíduo Thr10 foi realizada pelas correlações de nOe $d_{\alpha N}(i, i+1)$ (**Figura 3.19a**, p. 67), $d_{NN}(i, i+1)$ (**Figura 3.19b**, p. 67) e $d_{\beta N}(i, i+1)$ com Ala11 (**Figura 3.19c**, p. 67). Correlações de nOe do tipo $d_{NN}(i, i+1)$, $d_{\alpha N}(i, i+1)$ e $d_{\beta N}(i, i+1)$ com Phe9 não foram observadas, pois os valores de deslocamento químico de HN de ambos os resíduos são muito próximos, sobrepostos a outros sinais.

O resíduo Leu12 foi identificado pela correlação $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$ com Phe9 (**Figura 3.19d**, p. 67) e pelo padrão TOCSY característico deste resíduo. Apesar de haver poucas correlações envolvendo esse resíduo, através da atribuição das correlações dos resíduos adjacentes foi possível realizar o assinalamento da Leu12. A identificação do resíduo Ile13 foi realizada pelas correlações com os hidrogênios do resíduo Leu12, como $d_{\text{NN}}(i, i+1)$ (**Figura 3.19b**, p. 67), $d_{\beta\text{N}}(i, i+1)$ (**Figura 3.19c**, p. 67) e $d_{\alpha\text{N}}(i, i+1)$ (**Figura 3.19a**, p. 67). Além disso, foram identificados os nOe's $d_{\alpha\text{N}}(i, i+3)$ com Thr10 e $d_{\alpha\text{N}}(i, i+4)$ com Phe9 (**Figura 3.19a**, p. 67).

O resíduo Lys14 apresentou um grande número de correlações no mapa de contornos NOESY. Correlações de nOe do tipo $d_{\text{NN}}(i, i+1)$ (**Figura 3.19b**, p. 67), $d_{\alpha\text{N}}(i, i+1)$ (**Figura 3.19a**, p. 67) e $d_{\beta\text{N}}(i, i+1)$ (**Figura 3.19c**, p. 67) com Ile13, $d_{\text{NN}}(i, i+2)$ com Leu12 (**Figura 3.19b**, p. 67) e $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$ com Ala11 (**Figura 3.19d**, p. 67) permitiram identificar o resíduo Lys14, bem como confirmar atribuições anteriores. O resíduo Thr15 apresentou também correlações do tipo nOe suficientes para o seu assinalamento. Além disso, o padrão TOCSY observado para Thr10 foi utilizado na identificação dos sinais do resíduo Thr15. As correlações de nOe encontradas para a Thr15 foram: $d_{\alpha\text{N}}(i, i+3)$ com Leu12, $d_{\alpha\text{N}}(i, i+2)$ com Ile13 (**Figura 3.19a**, p. 67) e $d_{\text{NN}}(i, i+1)$ (**Figura 3.19b**, p. 67) e $d_{\beta\text{N}}(i, i+1)$ (**Figura 3.19c**, p. 67) com Lys14.

O resíduo Leu16 apresentou correlações escalares entre seus átomos de hidrogênio pouco sobrepostas, permitindo a identificação através do seu padrão TOCSY. Além disso, foram observados sinais de nOe referentes à Leu16 como $d_{\alpha\text{N}}(i, i+1)$ (**Figura 3.19a**, p. 67), $d_{\text{NN}}(i, i+1)$ (**Figura 3.19b**, p. 67) e $d_{\beta\text{N}}(i, i+1)$ (**Figura 3.19c**, p. 67) com Thr15, $d_{\text{NN}}(i, i+2)$ (**Figura 3.19b**, p. 67) com Lys14 e $d_{\alpha\text{N}}(i, i+3)$ (**Figura 3.19a**, p. 73) e $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$ (**Figura 3.19d**, p. 67) com Ile13.

O resíduo Arg17 foi identificado pelas correlações TOCSY de H^ϵ com H^β , H^γ e H^δ , características desse resíduo (**Figura 3.18**, p. 66). A atribuição de H^ϵ foi confirmada pelo mapa de contornos ^{15}N - ^1H HSQC, através da correlação do sinal de nitrogênio em δ_{N} 83,5 com o sinal de hidrogênio em δ_{H} 7,1 (**Figura 3.21**). A inspeção do mapa de contornos NOESY permitiu atribuir as correlações de nOe do tipo $d_{\text{NN}}(i, i+1)$ e $d_{\beta\text{N}}(i, i+1)$ com Leu16, $d_{\alpha\text{N}}(i, i+3)$ com Lys14 e $d_{\alpha\text{N}}(i, i+4)$ com Ile13.

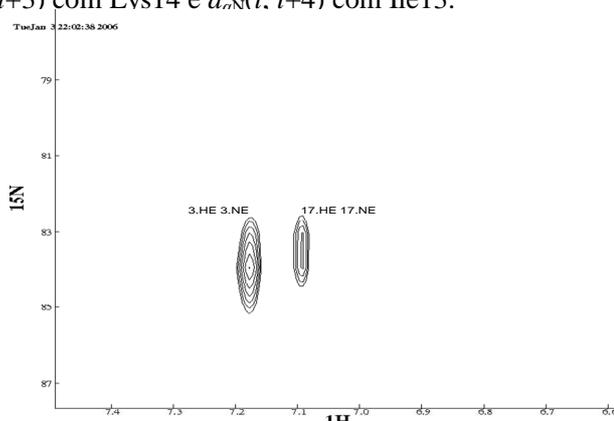


Figura 3.21. Mapa de contornos ^{15}N - ^1H HSQC da Cadeia 1 (600 MHz; TFE- d_2 : H_2O 1:1) mostrando conectividades intra-residuais entre H^ϵ e N^ϵ dos resíduos Arg3 e Arg17.

O resíduo Lys18 foi identificado pelas seguintes correlações de nOe: $d_{\text{NN}}(i, i+1)$ com Arg17, $d_{\text{NN}}(i, i+2)$ com Leu16 (**Figura 3.19b**, p. 67) e $d_{\alpha\text{N}}(i, i+3)$ com Thr15 (**Figura 3.19a**, p. 67). A identificação de Lys18 foi completada pela identificação do resíduo Cys19, que apresentou correlação de nOe do tipo $d_{\alpha\text{N}}(i, i+1)$ (**Figura 3.19a**, p. 67), $d_{\beta\text{N}}(i, i+1)$ (**Figura 3.19c**, p. 67) e $d_{\text{NN}}(i, i+1)$ (**Figura 3.19b**, p. 67) com Lys18. Foram registradas ainda outras correlações de nOe inter-residuais, como $d_{\alpha\text{N}}(i, i+3)$ (**Figura 3.19a**, p. 67) e $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$ (**Figura 3.19d**, p. 67) com Leu16.

A presença de uma correlação NOESY devida a nOe intenso relativo a H_{N} do resíduo Cys19 na região dos hidrogênios amídicos permitiu a identificação do resíduo Lys20. Esta correlação de nOe foi classificada como sendo do tipo $d_{\text{NN}}(i, i+1)$ com Lys20 (**Figura 3.19b**, p. 67). Essa atribuição foi confirmada por outras correlações inter-residuais registradas no mapa de contornos NOESY: $d_{\alpha\text{N}}(i, i+1)$ (**Figura 3.19a**, p.67) e $d_{\beta\text{N}}(i, i+1)$ (**Figura 3.19c**, p. 67) com Cys19, $d_{\alpha\text{N}}(i, i+3)$ (**Figura 3.19a**, p. 67) e $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$ (**Figura 3.19d**, p. 67) com Arg17.

O resíduo Ile21 foi identificado a partir das correlações de nOe $d_{\text{NN}}(i, i+1)$ (**Figura 3.19b**, p. 67) e $d_{\alpha\text{N}}(i, i+1)$ (**Figura 3.19a**, p. 67) com Lys20 e Ile22, de $d_{\text{NN}}(i, i+1)$ (**Figura 3.19b**, p. 67) e $d_{\alpha\text{N}}(i, i+1)$ (**Figura 3.19a**, p. 67) com Ile21, de $d_{\text{NN}}(i, i+2)$ (**Figura 3.19b**, p. 67) com Lys20 e de $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$ (**Figura 3.19d**, p. 67) e $d_{\alpha\text{N}}(i, i+3)$ (**Figura 3.19a**, p. 67) com Cys19. Esses resíduos apresentaram padrões TOCSY de resíduos de isoleucina. Os hidrogênios do grupo amida na extremidade C-terminal foram atribuídos pela análise do mapa de contornos ^1H - ^{15}N HSQC e pelas seguintes correlações de nOe identificadas: $d_{\alpha\text{N}}(i, i+4)$ com Cys19 e $d_{\alpha\text{N}}(i, i+2)$ com Ile21.

Após a atribuição da região alfa-helicoidal do peptídeo, foi realizada a atribuição dos sinais relativos aos demais resíduos. O resíduo Val5 foi considerado primeiramente por ser o único resíduo na cadeia 1 e apresentar um padrão TOCSY característico que pode ser facilmente confirmado pelo mapa de contornos ^1H - ^{13}C HSQC. O mapa de contornos TOCSY mostra correlações do resíduo Val5 bem definidas e intensas, permitindo identificar os sinais relativos aos hidrogênios da cadeia lateral. O mapa de contornos NOESY mostra correlações inter-residuais de Val5 e Glu4 do tipo $d_{\text{NN}}(i, i+1)$ (**Figura 3.19b**, p. 67) e $d_{\beta\text{N}}(i, i+1)$ (**Figura 3.19c**, p. 67). O resíduo Glu4 mostra correlações de nOe do tipo $d_{\alpha\text{N}}(i, i+1)$ (**Figura 3.19a**, p. 67) e $d_{\text{NN}}(i, i+1)$ (**Figura 3.19b**, p. 67) com o resíduo Arg3, que foi identificada por apresentar os mesmos tipos de correlações observadas para o resíduo de Arg17 (**Figura 3.21**, p. 69).

O resíduo de Pro6 foi identificado pelo mapa de contornos TOCSY, por apresentar um padrão semelhante ao observado para o resíduo Pro7. Este último resíduo apresentou correlações de nOe não observados para peptídeos alfa-helicoidais, como $d_{\alpha\delta}(i, i+2)$ com Glu4, $d_{\alpha\delta}(i, i+2)$ com Val5 e $d_{\alpha\delta}(i, i+1)$ com Pro7. Os resíduos Glu1 e Asn2 foram identificados somente pelo mapa de contornos NOESY e apenas por correlações intra-residuais. Não se encontraram correlações inter-residuais para estes resíduos.

Apesar dos mapas de contornos ^{15}N - ^1H HSQC e ^{13}C - ^1H HSQC não terem sido empregados de forma tão sistemática quanto aos mapas de contornos NOESY e TOCSY, os primeiros foram muito importantes na confirmação das atribuições realizadas pela técnica TOCSY, por meio da investigação de sinais relativos a hidrogênios de cadeias laterais, bem como na resolução de sinais sobrepostos. Os mapas de contornos HSQC foram importantes principalmente quando os sinais dos mapas de contornos TOCSY se apresentaram sobrepostos. Como nas dimensões de ^{15}N e ^{13}C não foram observadas sobreposições de sinais, a atribuição de todos os resíduos de aminoácidos da Cadeia 1 pôde ser realizada de forma inequívoca.

Pela análise realizada, a atribuição dos sinais dos resíduos da Cadeia 1 foi quase que totalmente atribuída, exceto os grupos CH do resíduo Glu1, hidrogênios H^{η} e nitrogênios N^{η} e nitrogênios N^{ζ} de resíduos de arginina e os grupos amino da posição ζ de resíduos de lisina. Além disso, foi obtida uma rede coerente de correlações de nOe, evidenciando uma predominância da forma α -helicoidal. A **Figura 3.22** mostra um resumo das correlações de nOe características de forma α -helicoidal na Cadeia 1, indicando a estrutura secundária esperada do resíduo de Gly8 até a extremidade C-terminal da cadeia. A **Tabela 3.11** (p. 72) mostra os deslocamentos químicos de ^1H e $^{13}\text{C}^{\alpha}$ atribuídos para cada resíduo da Cadeia 1. Tendo concluídas as atribuições, pôde-se especificar os tipos de correlações devidas a nOe e, para cada um destes tipos de nOe, foram estabelecidas as restrições de distância dos dados de entrada para o cálculo teórico de otimização de geometria em nível de dinâmica molecular.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23		
	E	N	R	E	V	P	P	G	F	T	A	L	I	K	T	L	R	K	C	K	I	I	Amida		
$d_{n,n(i,i+1)}$																									
$d_{\alpha,n(i,i+1)}$																									
$d_{\alpha,n(i,i+2)}$																									
$d_{\alpha,n(i,i+3)}$																									
$d_{\alpha,n(i,i+4)}$																									
$d_{\alpha,\beta(i,i+3)}$																									
$d_{\beta,n(i,i+1)}$																									
$d_{n,n(i,i+2)}$																									

Figura 3.22. Resumo dos tipos de nOe's característicos de forma α -helicoidal presentes no mapa de contornos NOESY do monômero Cadeia 1 em TFE- d_2 : H_2O (1:1).

Tabela 3.11. Deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ^1H e de ^{13}C da Cadeia 1 (600 MHz; TFE- d_2 : H_2O 1:1; pH 8,0; 22 °C)

Resíduo	Deslocamentos Químicos δ (ppm)				
	NH	C^αH	C^βH	Outros	C^α
Glu1	-	-	-	-	-
Asn2	-	-	-	-	-
Arg3	8,35	4,39	1,92; 1,78	$\gamma\text{-CH}_2 = 1,67; 1,65$ $\delta\text{-CH}_2 = 3,21$ $\varepsilon\text{-NH} = 7,17$	55,0
Glu4	8,18	4,47	2,20; 2,12	$\gamma\text{-CH}_2 = 2,40$	54,5
Val5	7,80	4,44	2,05	$\gamma\text{-CH}_2 = 0,87$	59,6
Pro6	-	4,73	2,44	$\gamma\text{-CH}_2 = 2,14$ $\delta\text{-CH}_2 = 3,90; 3,48$	60,1
Pro7	-	4,45	2,37	$\gamma\text{-CH}_2 = 2,16$	62,4
Gly8	8,41	4,03; 3,96	-	-	45,7
Phe9	7,92	4,45	3,30; 3,24	$\delta\text{-CH} = 7,30$	58,0
Thr10	7,96	4,21	3,87	$\gamma\text{-CH}_2 = 1,27$	22,9
Ala11	7,71	4,10	1,48	-	-
Leu12	7,73	4,11	1,67	-	57,1
Ile13	7,99	3,65	1,90	$\gamma\text{-CH}_2 = 1,36$	62,2
Lys14	8,17	3,92	1,92	$\gamma\text{-CH}_2 = 1,47$ $\varepsilon\text{-CH}_2 = 2,95$	59,0
Thr15	7,90	4,56	3,95	$\gamma\text{-CH}_2 = 1,20$	23,1
Leu16	8,67	4,13	2,03	$\gamma\text{-CH}_2 = 1,53$ $\delta\text{-CH}_2 = 0,85$	57,6
Arg17	8,34	4,12	2,01; 1,92	$\gamma\text{-CH}_2 = 1,73$ $\delta\text{-CH}_2 = 3,20; 3,13$ $\varepsilon\text{-NH} = 7,10$	54,5
Lys18	7,91	4,16	2,10	$\gamma\text{-CH}_2 = 1,74; 1,52$	57,8
Cys19	8,18	4,27	3,11; 3,02	-	60,5
Lys20	7,99	4,22	2,04	$\gamma\text{-CH}_2 = 1,61$ $\delta\text{-CH}_2 = 1,70$	56,4
Ile21	7,90	4,00	2,05	$\gamma\text{-CH}_2 = 1,23$	61,4
Ile22	7,76	4,15	1,92	$\gamma\text{-CH}_2 = 1,25$	60,3

3.3.2. ANÁLISE POR RMN DA CADEIA 2 DA DISTINCTINA.

A atribuição dos sinais dos resíduos da Cadeia 2 foi realizada analisando inicialmente o mapa de contornos TOCSY (Figura 3.Y1) nas regiões de correlações envolvendo hidrogênios amídicos com hidrogênios α e das cadeias laterais. Isto foi possível pois a Cadeia 2 contém muitos resíduos característicos, tais como valina (Val3 e Val25), glicina (Gly5), arginina (Arg10 e Arg18), tirosina (Tyr12), asparagina (Asn1 e Asn22), histidina (His17) e cisteína (Cys23), além do resíduo Leu16 marcado isotopicamente com ^{15}N . Assim, pontos da seqüência peptídica da Cadeia 2 foram determinados e permitiram a atribuição dos demais resíduos. Assim mesmo, a atribuição dos sinais de ressonância foi dificultada por diversas sobreposições entre sinais referentes a resíduos próximos entre si na seqüência peptídica.

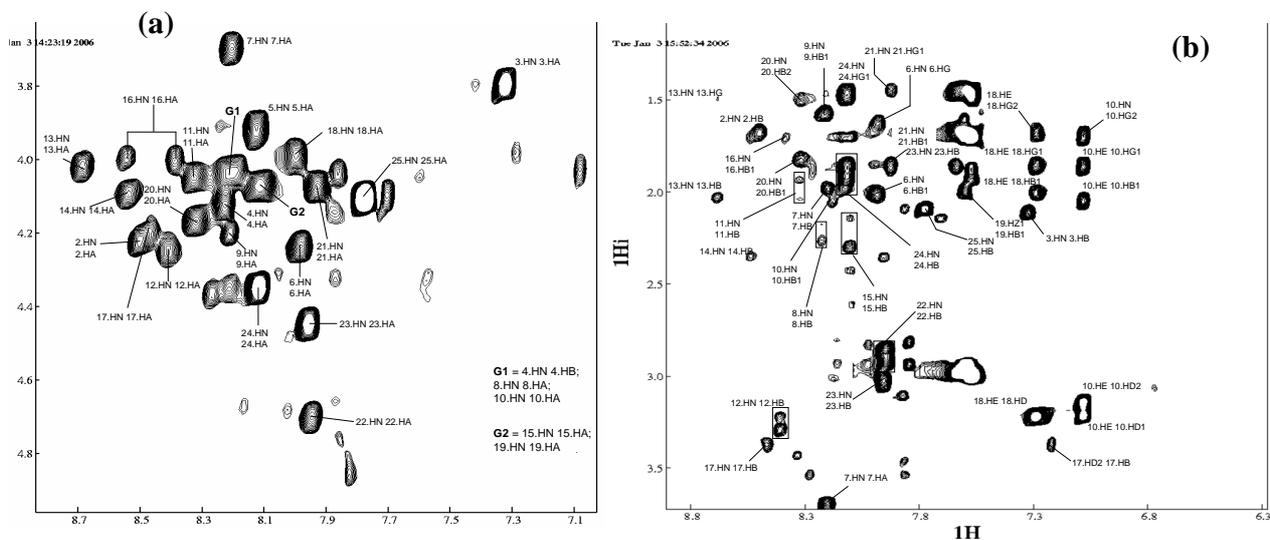


Figura 3.23. Mapas de contornos TOCSY da Cadeia 2 (600 MHz; TFE-d₂:H₂O 1:1) mostrando as conectividades intra-residuais dos tipos: (a) H^N/H^α e (b) H^N/H^β.

Após a atribuição dos hidrogênios α , β e amídicos, foi realizada a análise do mapa de contornos NOESY. Tendo em vista que os dados de CD da Cadeia 2 indicaram formas α -helicoidais, a análise por NOESY foi realizada considerando correlações dos tipos H ^{α} /H^N (**Figura 3.24a**, p. 74), H^N/H^N (**Figura 3.24b**, p.74), H^N/H ^{β} (**Figura 3.24c**, p. 74) e H ^{α} /H ^{β} (**Figura 3.24d**, p. 74).

O resíduo Gly5 foi confirmado pelo mapa de contornos ¹H ¹³C-HSQC (**Figura 3.25**; p. 74) e utilizado tanto para atribuição dos sinais referentes aos demais resíduos quanto para identificar interações inter-moleculares. A identificação de Gly5 foi realizada pelo mapa de contornos TOCSY, pois o hidrogênio H ^{α} deste resíduo apresenta correlação somente com H^N desse resíduo. Como há apenas um resíduo de glicina na Cadeia 2, esse resíduo foi identificado inequivocamente, permitindo a identificação dos demais resíduos da seqüência peptídica.

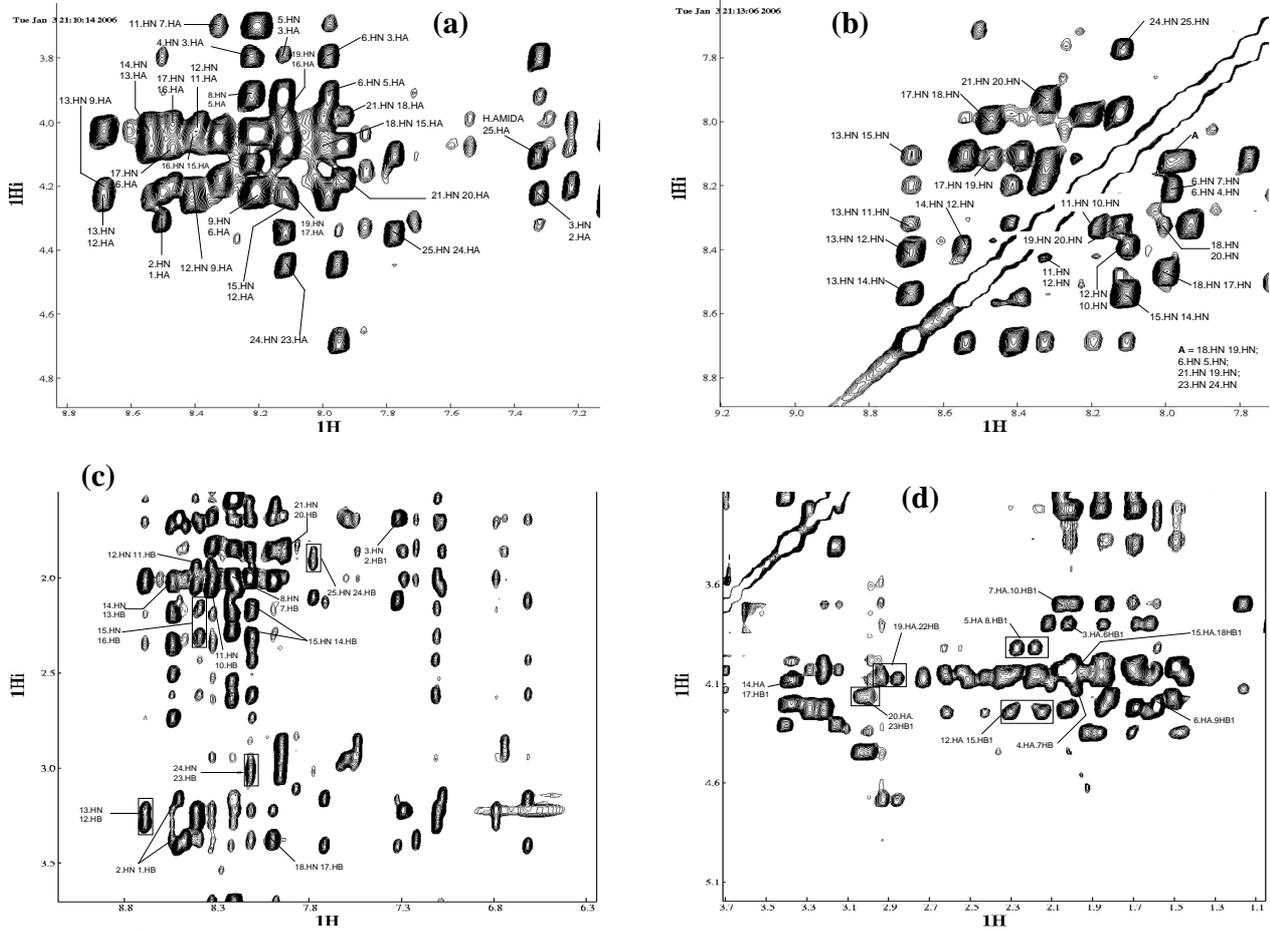


Figura 3.24. Mapas de contornos NOESY da Cadeia 2 (600 MHz; TFE-d₂:H₂O 1:1) mostrando conectividades inter-residuais dos tipos: (a) $d_{\alpha N}(i, i+1)$, $d_{\alpha N}(i, i+2)$, $d_{\alpha N}(i, i+3)$ e $d_{\alpha N}(i, i+4)$; (b) $d_{NN}(i, i+1)$ e $d_{NN}(i, i+2)$; (c) $d_{\beta N}(i, i+1)$ e (d) $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$.

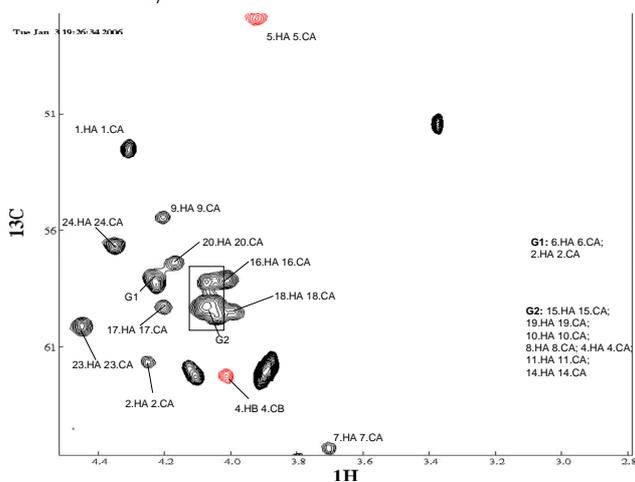


Figura 3.25. Mapa de contornos ¹³C-¹H HSQC da Cadeia 2 (600 MHz; TFE-d₂:H₂O 1:1) mostrando conectividades intra-residuais C^α/H^α.

A partir das correlações entre hidrogênios H_N (**Figura 3.24b**, p. 74) foram identificados os resíduos Val3, Ser4 e Leu6. As correlações TOCSY da Cadeia 2 (**Figura 3.23**, p. 73) permitiram identificar o resíduo Val3, confirmado pelo padrão TOCSY característico de valina e pelas correlações $d_{NN}(i, i+1)$ (**Figura 3.24b**, p. 74) e $d_{\beta N}(i, i+1)$ (**Figura 3.24c**, p. 74) com Ser4, $d_{\alpha N}(i, i+2)$ (**Figura 3.24a**, p. 74) com Gly5, $d_{\alpha N}(i, i+3)$ (**Figura 3.24a**, p. 74) e $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$ (**Figura 3.24d**, p. 74) com Leu6. As correlações entre Gly5 e Ser4 foram confirmadas pelo padrão TOCSY (**Figura 3.23**, p. 73), caracterizado por deslocamentos químicos próximos de H^α e H^β . O hidrogênio H^β foi confirmado pelo mapa de contornos 1H ^{13}C -HSQC, devido à presença de um sinal de CH_2 na região característica de C^α , porém o carbono apresenta um deslocamento químico muito grande para pertencer a uma glicina, **Figura 3.25**, p. 74). O resíduo Leu6 apresenta um padrão TOCSY bem característico (**Figura 3.23**, p. 73), mostrando as correlações com Val3. O resíduo Leu2 foi identificado pelas correlações $d_{NN}(i, i+1)$ (**Figura 3.24b**, p. 74), $d_{\beta N}(i, i+1)$ (**Figura 3.24c**, p. 74) e $d_{\alpha N}(i, i+1)$ (**Figura 3.24b**, p. 74) com Val3. O resíduo Asn1 foi identificado pelo mapa de contornos NOESY (**Figura 3.24a**, p. 74), pois as correlações devidas ao H_N não foram registradas no mapa de contornos TOCSY. As correlações de Asn1 foram $d_{\alpha N}(i, i+1)$ (**Figura 3.24a**, p. 74) e $d_{\beta N}(i, i+1)$ (**Figura 3.24c**, p. 74) com Leu2 e $d_{\alpha N}(i, i+2)$ (**Figura 3.24a**, p. 74) com Val3.

O resíduo Ile7 foi identificado pelo seu padrão TOCSY (**Figura 3.23**, p. 73) e seus hidrogênios foram confirmados por 1H ^{13}C -HSQC. As correlações de NOESY deste resíduo foram $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$ (**Figura 3.24d**, p. 74) com Ser4, $d_{NN}(i, i+1)$ (**Figura 3.24b**, p. 74) com Leu6 e $d_{\alpha N}(i, i+3)$ (**Figura 3.24a**, p. 74). Demais correlações não foram confirmadas pois H_N de Ile7 apresenta um deslocamento químico muito próximo a H_N de Ser4 e Gly5.

O hidrogênio H_N do resíduo Glu8 não foi atribuído inequivocamente, pois a correlação TOCSY do tipo H^α/H_N apresenta-se sobreposta às correlações H^α/H_N do resíduo Arg10 e H^β/H_N da Ser4 (**Figura 3.23**, p. 73). No entanto, os demais hidrogênios foram atribuídos pelas correlações TOCSY de H^α com os hidrogênios da cadeia lateral. Além disso, H^α foi confirmado pela correlação $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$ com Gly5 (**Figura 3.24d**; p. 74). A atribuição de H_N foi realizada pelas correlações NOESY dos tipos $d_{NN}(i, i+2)$ (**Figura 3.24b**, p. 74) com Leu6, $d_{\alpha N}(i, i+1)$ (**Figura 3.24a**, p. 74) e $d_{\beta N}(i, i+1)$ (**Figura 3.24c**, p. 74) com Ile7. As correlações $d_{NN}(i, i+1)$ com Ile7 e com Ala9 apresentam-se sobrepostas, não sendo facilmente observadas no mapa de contornos NOESY (**Figura 3.24b**, p. 74).

O resíduo Ala9 foi identificado pelas correlações 1H ^{13}C -HSQC (**Figura 3.25**, p. 74) dos hidrogênios H^β da cadeia lateral. O H_N desse resíduo apresenta deslocamento químico próximo aos hidrogênios correspondentes de Glu8 e Arg10. Além disso, H_α apresenta-se sobreposto ao sinal correspondente de Leu6. Consequentemente, Ala9 foi identificado inequivocamente pelas correlações dos tipos $d_{\alpha N}(i, i+3)$ com Tyr12 e $d_{\alpha N}(i, i+4)$ com Leu13 (**Figura 3.24a**, p. 74).

Os resíduos Arg10 e Arg18 foram identificadas pelo padrão TOCSY, conforme correlações mostradas na **Figura 3.26** dos hidrogênios H^e e H^d com H^b e H^g em cada resíduo. O resíduo Arg10 foi identificado pelas correlações devidas a nOe dos tipos $d_{\alpha N}(i, i+1)$ e $d_{\beta N}(i, i+1)$ com o resíduo Lys11, como mostrado nas **Figuras 3.24a** e **3.24c**, respectivamente (p.74). A correlação de Arg10 do tipo $d_{NN}(i, i+1)$ com Ala9 pode ser atribuída apesar da sobreposição de sinais nessa região do mapa de contornos (**Figura 3.24b**, p. 74).

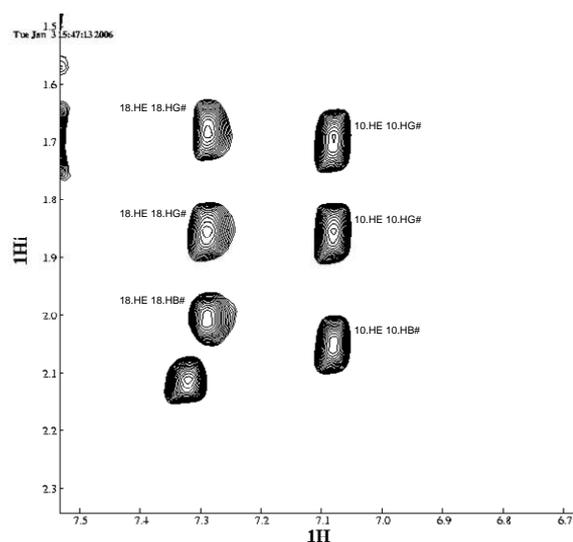


Figura 3.26. Mapa de contornos TOCSY da Cadeia 2 (600 MHz; TFE-d₂:H₂O 1:1) mostrando conectividades intra-residuais de H^e com os demais hidrogênios da cadeia lateral de Arg10 e Arg18.

O resíduo Lys11 foi identificado pelas correlações de nOe do tipo $d_{\alpha N}(i, i+4)$ com Ile7, além dos tipos $d_{\beta N}(i, i+1)$ (**Figura 3.24c**, p. 74) e $d_{NN}(i, i+1)$ (**Figura 3.24b**, p. 74) com Tyr12. Padrões TOCSY de lisina para Lys11 não foram observados pela ausência de correlações de H_N com hidrogênios da cadeia lateral do resíduo. Além disso, não foram confirmadas as correlações de H_N com H^a do resíduo, pois há sobreposição de correlações de H^a dos resíduos Glu8, Glu14, Gln15, Leu20 e Lys21 com seus correspondentes hidrogênios de suas cadeias laterais. No entanto, o resíduo Lys11 foi confirmado a partir da identificação inequívoca de Tyr12 devida a padrões TOCSY bem definidos, principalmente pelos sinais desdobrados de H^b na correlação desses sinais com H_N , como mostrado na **Figura 3.23**, (p. 73). Além disso, foram observadas as correlações TOCSY entre H^e e H^d deste resíduo (**Figura 3.27a**, p. 77) e esses hidrogênios foram atribuídos pelo mapa de contornos ¹³C-¹H-HSQC na região dos carbonos aromáticos (**Figura 3.27b**, p. 77).

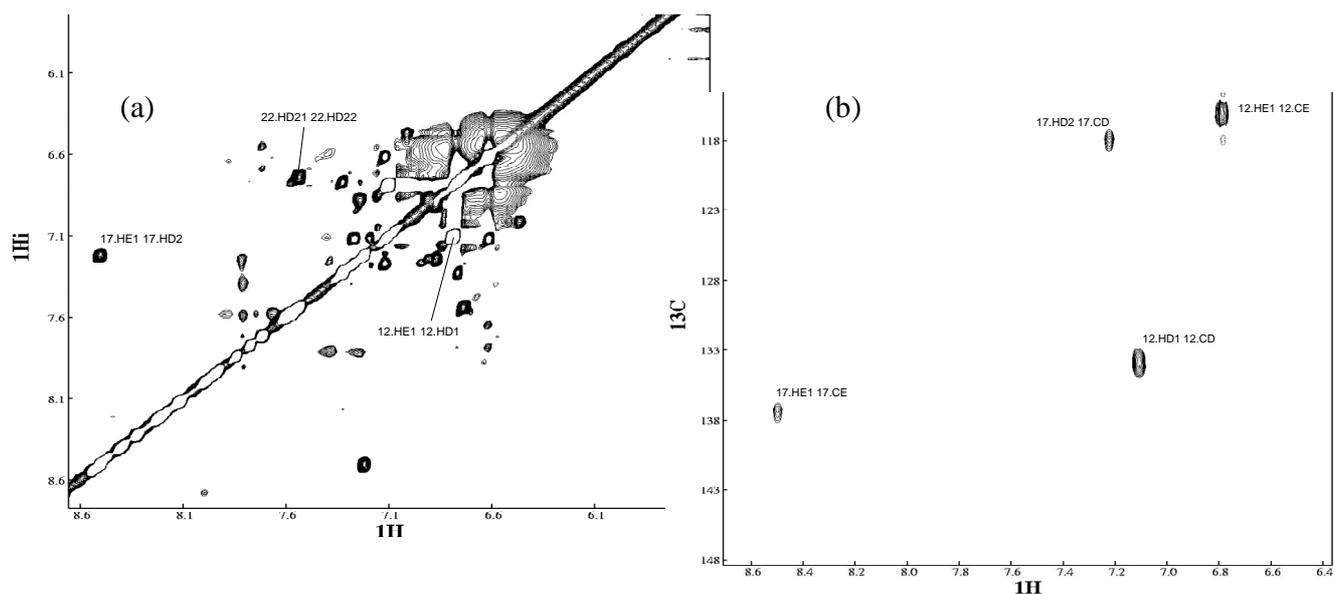


Figura 3.27. Mapas de contornos (a) TOCSY, mostrando conectividades intra-residuais entre os hidrogênios aromáticos da cadeia lateral de Tyr12 e His17 e entre os hidrogênios H_N de Asn22, e (b) ^{13}C - 1H HSQC, mostrando conectividades intra-residuais entre hidrogênios e carbonos aromáticos das cadeias laterais de Tyr12 e His17, da Cadeia 2 (600 MHz; TFE- d_2 : H_2O 1:1).

O resíduo Leu13 foi identificado facilmente, pois o H_N não apresenta sobreposição com outros hidrogênios amídicos. Apesar desse resíduo não apresentar um padrão TOCSY devido aos muitos resíduos de leucina e lisina presentes na cadeia que sobrepõem em diferentes regiões do mapa de contornos TOCSY. No entanto, foram registradas as correlações NOESY como $d_{\alpha N}(i, i+4)$ com Ala9 (**Figura 3.24a**, p. 74), $d_{NN}(i, i+2)$ com Lys11 (**Figura 3.24b**, p. 74), $d_{NN}(i, i+1)$ (**Figura 3.24c**, p. 74), $d_{\alpha N}(i, i+1)$ (**Figura 3.24a**, p. 74) e $d_{\beta N}(i, i+1)$ (**Figura 3.24c**, p. 74) com Tyr12, e $d_{\beta N}(i, i+1)$ com Glu14 (**Figura 3.24c**, p. 74). Essa última correlação foi importante para atribuição de sinais do resíduo Glu14. Apesar da sobreposição de sinais que envolviam correlações entre hidrogênios de cadeia lateral e hidrogênios H^α dos resíduos Glu8, Glu14 e Gln15, estes sinais foram resolvidos na região denominada “Glx”, possibilitando uma atribuição mais precisa de Glu14, bem como dos demais resíduos “Glx” (**Figura 3.28**, p. 78). Como o sinal de H_N do resíduo Leu13 apresenta-se muito próximo ao sinal correspondente de Leu16 (ver p. 73, **Figura 3.23**), as correlações TOCSY de H_N do resíduo Glu14 do tipo $d_{NN}(i, i+1)$ com Gln15 e $d_{NN}(i, i+2)$ com Leu16 não foram confirmadas. No entanto, as correlações NOESY do tipo $d_{NN}(i, i+1)$ (**Figura 3.24b**, p. 74) e $d_{\alpha N}(i, i+1)$ (**Figura 3.24a**, p. 74) com Leu13 e $d_{\alpha N}(i, i+4)$ (**Figura 3.24a**, p. 74) com Arg10, forneceram atribuições inequívocas desse resíduo. No grupo Glx, a correlação TOCSY entre H^α e H_N do resíduo Gln15 apresenta-se sobreposta a correlação correspondente de Lys19. Assim, Gln15 foi identificado principalmente pelas correlações de nOe dos tipos $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$ (**Figura 3.24d**, p. 74) e $d_{\alpha N}(i, i+3)$ (**Figura 3.24a**, p. 74) com Tyr12, $d_{NN}(i, i+2)$ com Leu13 e $d_{NN}(i, i+1)$ com Glu14 (**Figura 3.24b**, p. 74).

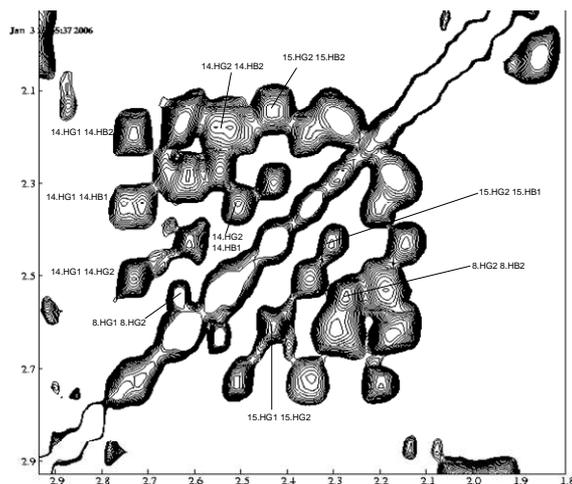


Figura 3.28. Região “Glx” do mapa de contornos TOCSY da Cadeia 2 (600 MHz; TFE-d₂:H₂O 1:1) mostrando conectividades intra-residuais das cadeias laterais de Glu8, Glu14 e Gln15.

A **Figura 3.29** apresenta o mapa de contornos ¹H,¹⁵N-HSQC da cadeia 2. O resíduo Leu16 apresenta desdobramento do sinal de H_N devido à marcação de ¹⁵N neste resíduo. Os sinais de HN, registrados em δ_H 8,55 e 8,38, apresenta correlações TOCSY (**Figura 3.23**, p. 73) e NOESY (**Figura 3.24a**, p. 74) com H^α. O sinal em δ_H 8,38 foi importante na identificação de Leu16, pois não se encontra sobreposto a nenhum outro. O hidrogênio HN apresenta correlações NOESY dos tipos $d_{\beta N}(i, i+1)$ (**Figura 3.24d**, p. 74) e $d_{NN}(i, i+1)$ (**Figura 3.24b**, p. 74) com Gln15, $d_{\alpha N}(i, i+1)$ com His17 (**Figura 3.24a**, p. 74) e $d_{\alpha N}(i, i+3)$ com Lys19 (**Figura 3.24a**, p. 74).

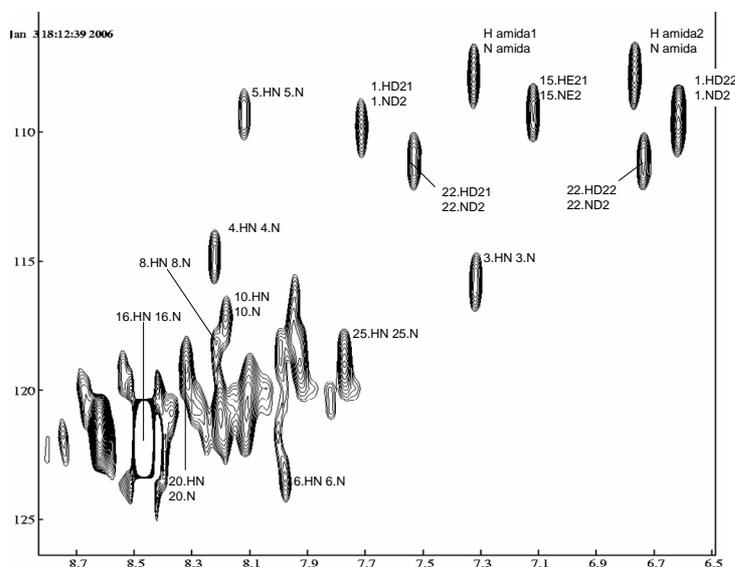


Figura 3.29. Mapa de contornos ¹⁵N-¹H HSQC da Cadeia 2 (600 MHz; TFE-d₂:H₂O 1:1) mostrando conectividades intra-residuais N/H_N.

O resíduo His17 foi identificado pelas correlações TOCSY (**Figura 3.27a**, p. 77) dos hidrogênios aromáticos da cadeia lateral dos tipos $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$ (**Figura 3.24d**, p. 74) e $d_{\alpha N}(i, i+3)$ (**Figura 3.24a**, p. 74) com Glu14, $d_{\alpha N}(i, i+2)$ com Gln15, $d_{\alpha N}(i, i+1)$ com Leu16 (**Figura 3.24a**, p. 74), $d_{\beta N}(i, i+1)$ (**Figura 3.24c**, p. 80) e $d_{NN}(i, i+1)$ (**Figura 3.24b**, p. 74) com Arg18 e $d_{\alpha N}(i, i+4)$ com Leu13 e com Lys21. O resíduo Arg18 foi identificado de forma semelhante a Arg10 (**Figura 3.26**, p. 76), porém com correlações NOESY dos tipos $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$ com Gln15 (**Figura 3.24d**, p. 74), $d_{NN}(i, i+1)$ (**Figura 3.24b**, p. 74) e $d_{\beta N}(i, i+1)$ (**Figura 3.24c**, p. 74) com His17, $d_{NN}(i, i+1)$ com Lys19, $d_{NN}(i, i+2)$ com Leu20 (**Figura 3.24b**, p. 74) e $d_{\alpha N}(i, i+3)$ (**Figura 3.24a**, p. 74) com Lys21.

As correlações TOCSY entre H_N e H^α do resíduo Lys19 apresentam-se sobrepostas às correlações correspondentes de Gln15 (**Figura 3.23**, p. 73). Além disso, correlações TOCSY entre H_N e hidrogênios da cadeia lateral apresentam-se sobrepostas as correlações correspondentes dos resíduos de lisina e leucina. No entanto, Lys19 foi identificado pelas correlações NOESY dos tipos $d_{\alpha N}(i, i+3)$ com Leu16 (**Figura 3.26a**, p. 80), $d_{NN}(i, i+1)$ com Arg18, $d_{NN}(i, i+1)$ com Leu20, $d_{NN}(i, i+2)$ com Lys21 (**Figura 3.24b**, p. 74) e $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$ (**Figura 3.24d**, p. 74) e $d_{\alpha N}(i, i+3)$ (**Figura 3.24a**, p. 74) com Asn22.

O resíduo Leu20 apresentou um padrão TOCSY característico de leucina (**Figura 3.23**, p. 73) e as correlações dos tipos $d_{\alpha N}(i, i+1)$ (**Figura 3.24a**, p. 74) e $d_{\beta N}(i, i+1)$ (**Figura 3.24c**, p. 74) com Lys21 e $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$ (**Figura 3.24d**, p. 74) com Cys23, além de correlações NOESY com os resíduos Arg18 e Lys19, permitiram a indicação de Leu20. O resíduo Lys21 foi identificado pelas correlações de nOe do tipo $d_{\alpha N}(i, i+3)$ com Arg18 (**Figura 3.24a**, p. 74), $d_{NN}(i, i+2)$ com Lys19 (**Figura 3.24a**, p. 74), $d_{NN}(i, i+1)$ (**Figura 3.24a**, p. 74), $d_{\beta N}(i, i+1)$ (**Figura 3.24c**, p. 74) e $d_{\alpha N}(i, i+1)$ (**Figura 3.46a**, p. 74) com Leu20, além de $d_{NN}(i, i+1)$ com Asn22. Por sua vez, este último resíduo apresentou um padrão TOCSY (**Figura 3.23**, p. 73) característico de asparagina, com sinais de H^β desdobrados e correlações NOESY tanto com H_N quanto com H^α . As correlações NOESY do tipo $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$ foram observadas entre esse resíduo e Lys19 (**Figura 3.24d**, p. 74). No entanto, as sobreposições do sinal de H_N desse resíduo com o sinal correspondente de Cys23 não permitiram a atribuição inequívoca das correlações NOESY dos tipos $d_{NN}(i, i+1)$ (**Figura 3.24b**, p. 74) e $d_{\alpha N}(i, i+1)$ (**Figura 3.24a**, p. 74) com Cys23.

O resíduo Cys23 foi identificado pelo padrão TOCSY característico (**Figura 3.23**, p. 73) que apresenta apenas um sinal relativo a H^β não desdobrado e pelas correlações NOESY dos tipos $d_{\alpha N}(i, i+2)$ com Lys21 (**Figura 3.24a**, p. 74), $d_{\alpha N}(i, i+1)$ (**Figura 3.24a**, p. 74) e $d_{NN}(i, i+1)$ (**Figura 3.24b**, p. 74) com Lys24. Este último resíduo apresentou um padrão TOCSY completo, com correlações NOESY dos tipos $d_{\alpha N}(i, i+4)$ (**Figura 3.24a**, p. 74) com Leu20 e $d_{NN}(i, i+1)$ (**Figura 3.24b**, p. 74) e $d_{\alpha N}(i, i+1)$ (**Figura 3.24a**, p. 74) com Val25. O resíduo Val25 foi identificado pelo padrão TOCSY característico de valina (**Figura 3.23**, p. 73) e pelas correlações NOESY com Lys24, $d_{\alpha N}(i, i+2)$ com Cys23 e com o hidrogênio do grupo amida C-terminal, com sinal em δ_H 7,62 (**Figura 3.24a**, p. 74).

A análise por RMN da Cadeia 2 não permitiu identificar algumas correlações NOESY devido a sobreposições de sinais. No entanto, uma rede coerente e robusta de restrições de distância entre os átomos de hidrogênio pôde ser proposta (**Figura 3.30**).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	Amida	
	N	L	V	S	G	L	I	E	A	R	K	Y	L	E	Q	L	H	R	K	L	K	N	C	K	V		
$d_{n,n(i,i+1)}$																											
$d_{\alpha,n(i,i+1)}$																											
$d_{\alpha,n(i,i+2)}$																											
$d_{\alpha,n(i,i+3)}$																											
$d_{\alpha,n(i,i+4)}$																											
$d_{\alpha,\beta(i,i+3)}$																											
$d_{\beta,n(i,i+1)}$																											
$d_{n,n(i,i+2)}$																											

Figura 3.30. Resumo dos tipos de nOe's característicos de formas α -helicoidais obtidas a partir do mapa de contornos NOESY da Cadeia 2 da distinctina em TFE- d_2 : H_2O 1:1).

A **Tabela 3.12** (p. 87) apresenta os dados de deslocamentos químicos de 1H e $^{13}C^\alpha$ atribuídos para cada resíduo. Os dados de NOESY foram convertidos em restrições de distância para serem utilizados no cálculo de dinâmica molecular.

Tabela 3.12. Deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ^1H e de ^{13}C da Cadeia 2 (600 MHz; TFE- d_2 : H_2O 1:1; pH 8,0; 22 °C)

Resíduo	Deslocamentos Químicos (ppm)				
	NH	C^αH	C^βH	Outros	C^α
Asn1	-	4,31	3,40; 3,16	$\delta\text{-NH}_2 = 7,71; 6,62$	52,5
Leu2	8,50	4,22	1,69	$\gamma\text{-CH}_2 = 0,97$	58,4
Val3	7,32	3,79	2,12	$\gamma\text{-CH}_2 = 0,98; 1,03$	65,6
Ser4	8,22	4,13	3,91; 4,01	-	61,8
Gly5	8,12	3,92	-	-	47,0
Leu6	7,98	4,24	1,62; 2,02	$\gamma\text{-CH} = 1,62$ $\delta\text{-CH}_2 = 0,92$	58,1
Ile7	8,20	3,70	1,99	$\gamma\text{-CH}_2 = 1,16; 1,18$ $\gamma\text{-CH}_3 = 0,94$ $\delta\text{-CH}_2 = 0,85$	65,3
Glu8	8,23	4,05	2,28; 2,27	$\gamma\text{-CH}_2 = 2,55; 2,63$	Sobr.
Ala9	8,21	4,20	1,58	-	55,4
Arg10	8,18	4,03	2,05	$\gamma\text{-CH}_2 = 1,70; 1,86$ $\delta\text{-CH}_2 = 3,15$ $\varepsilon\text{-NH} = 7,08$	Sobr.
Lys11	8,33	4,05	1,94; 2,04	$\gamma\text{-CH}_2 = 0,85$ $\delta\text{-CH}_2 = 1,45; 1,69$ $\varepsilon\text{-CH}_2 = 2,95; 2,99$ $\zeta\text{-NH}_2 = 7,60$	Sobr.
Tyr12	8,41	4,25	3,22; 3,28	$\delta\text{-CH}_2 = 7,10$ $\varepsilon\text{-CH}_2 = 6,79$	61,6
Leu13	8,68	4,02	2,03	$\gamma\text{-CH}_2 = 1,50$ $\delta\text{-CH}_2 = 0,96$	Sobr.
Glu14	8,54	4,09	2,19; 2,35	$\gamma\text{-CH}_2 = 2,50; 2,73$	Sobr.
Gln15	8,11	4,07	2,15; 2,30	$\gamma\text{-CH}_2 = 2,43; 2,61$	Sobr.
Leu16	8,39	4,00	1,71	$\gamma\text{-CH}_2 = 1,49$ $\delta\text{-CH}_2 = 0,85$	59,5
His17	8,47	4,20	3,37	$\delta\text{-CH}_2 = 7,22$ $\varepsilon\text{-NH} = 8,50$	59,3
Arg18	8,00	3,98	2,01	$\gamma\text{-CH}_2 = 1,68; 1,86$ $\delta\text{-CH}_2 = 3,22$ $\varepsilon\text{-NH} = 7,29$	Sobr.
Lys19	8,12	4,07	1,99	$\zeta\text{-NH}_2 = 7,60$	Sobr.
Leu20	8,32	4,17	1,51; 1,83	$\gamma\text{-CH} = 0,84$	57,4
Lys21	7,93	4,07	1,86	$\gamma\text{-CH}_2 = 1,46$ $\varepsilon\text{-CH}_2 = 2,95$ $\zeta\text{-NH}_2 = 7,54$	Sobr.
Asn22	7,95	4,70	2,86; 2,93	$\delta\text{-NH}_2 = 7,53; 6,74$	Sobr.
Cys23	7,95	4,45	3,00; 3,04	$\delta\text{-SH}_2 = 2,26$	60,1
Lys24	8,12	4,35	1,92; 1,87	$\gamma\text{-CH}_2 = 1,48$ $\varepsilon\text{-CH}_2 = 3,00$ $\zeta\text{-NH}_2 = 7,57$	56,7
Val25	7,77	4,10	2,09	$\gamma\text{-CH}_2 = 0,96$	62,2

3.4. CÁLCULO ESTRUTURAL A PARTIR DOS DADOS DE RMN.

Após a atribuição dos hidrogênios de ambos os monômeros, foram realizadas as restrições de distância entre esses núcleos a partir dos dados de nOe. A calibração das intensidades dos sinais foi realizada empregando o programa NMRView (Johnson *et al.*), pelo método de Hyberts *et al.* Este método de calibração semi-quantitativo considera apenas três tipos de sinais de nOe, classificados por suas intensidades: fraca, média ou forte. A cada classe, atribui-se um valor de limite superior das restrições de distância: 2,8 Å para nOe's de intensidade forte, 3,4 Å para nOe's de intensidade média e 5,0 Å para nOe's de intensidade fraca, referentes a interações tanto inter-moleculares quanto intra-moleculares.

Todos os dados de entrada para o cálculo foram provenientes dos sinais de nOe. Para o tratamento dos grupos diastereotópicos, utilizou-se o método de pseudo-átomos e o hidrogênio amídico de cada resíduo foi adicionado na lista de informações de restrições de distância, considerando-se um limite superior da restrição de distância de 5,0 Å. Como resultado, os cálculos forneceram as geometrias da Cadeia 1 (**Figura 3.31**, p.83) e da Cadeia 2 (**Figura 3.32**, p. 84). Para ambos os conjuntos de estrutura, os resíduos polares foram representados em verde e os apolares em azul.

A Cadeia 1 apresenta uma forma α -hélice do resíduo Gly8 até a extremidade C-terminal amidada, com uma dobra bem definida da cadeia principal na região das prolinas (Pro6 e Pro7), deduzida por nOe's relativos às interações entre hidrogênios α de aminoácidos anteriores aos resíduos de prolina e os hidrogênios δ das cadeias laterais dos resíduos Pro6 e Pro7. A influência dos resíduos de prolina na formação de dobras e, em especial, em diversos aspectos estruturais de proteínas e peptídeos *trans*-membranas tem sido amplamente estudada, pois regiões ricas em resíduos de prolina apresentam normalmente um importante papel na atividade de certos peptídeos antimicrobianos (Csordes, F. S. *et al.*, 2002; Pal, D. *et al.*, 1999; Orzáez, M. *et al.*, 2004; Lu, H. *et al.*, 2001; Cai, M. *et al.*, 1995; Nardi, F. *et al.*, 2000; Williamson, M. P.; 1994). No caso da Cadeia 1, o fragmento Pro6-Pro7-Gly8 é responsável pela flexibilidade da estrutura, pois resíduos de prolina impedem a formação de ligações de hidrogênio e rigidez da estrutura, além do resíduo de glicina acentuar a flexibilidade nessa região.

A região de forma α -helicoidal da Cadeia 1 mostra um caráter anfipático acentuado, com resíduos polares e apolares orientados em faces opostas da cadeia. Ao contrário da região próxima à dobra, a região de forma α -helicoidal mostra-se melhor definida, apresentando um RMS de 0,54 Å, contra 1,34 Å da cadeia toda.

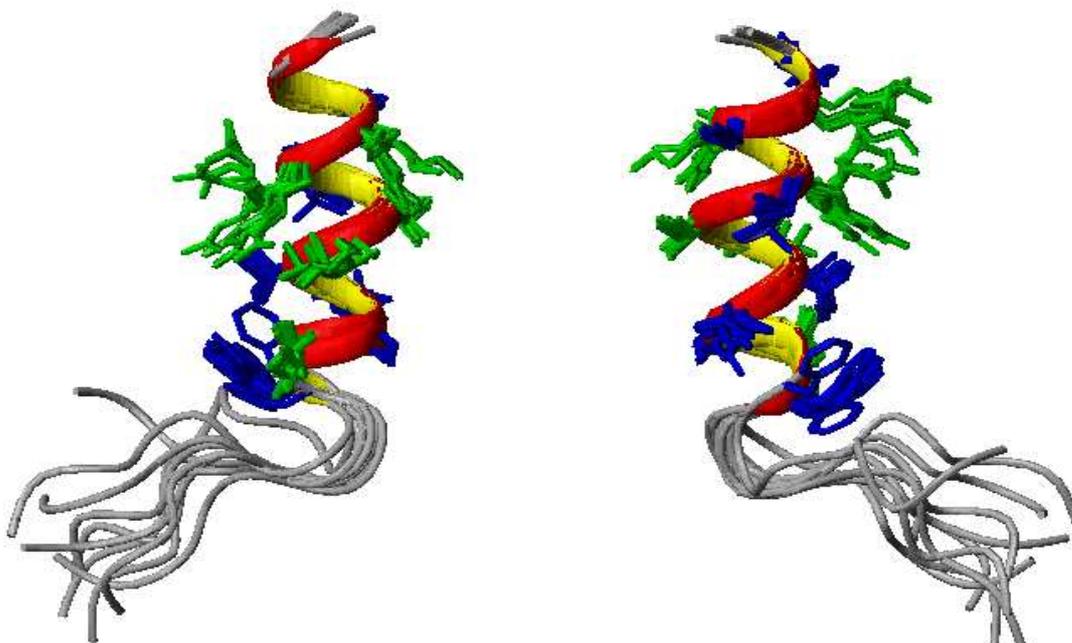


Figura 3.31. Conjunto das vinte estruturas mais estáveis resultantes do cálculo de dinâmica molecular da Cadeia 1, com o alinhamento das estruturas na região Gly8-Ile22.

A Cadeia 2 apresentou, por sua vez, formas α -helicoidais em toda a sua extensão, em consequência principalmente do grande número de nOe's do tipo $d_{\alpha N}(i, i+4)$. Apesar da região *C*-terminal amidada estabilizar acentuadamente a forma α -helicoidais, uma menor definição dessa forma é observada na extremidade *N*-terminal. Similarmente a Cadeia 1, as regiões de formas α -helicoidais da Cadeia 2 apresentam um caráter anfipático acentuado no conjunto total das estruturas, evidenciando a capacidade desse peptídeo em interagir com membranas. As vinte estruturas mais estáveis foram alinhadas do resíduo Ser-4 até a extremidade amidada, gerando um conjunto de estruturas cujo RMS calculado foi de 1,33 Å.

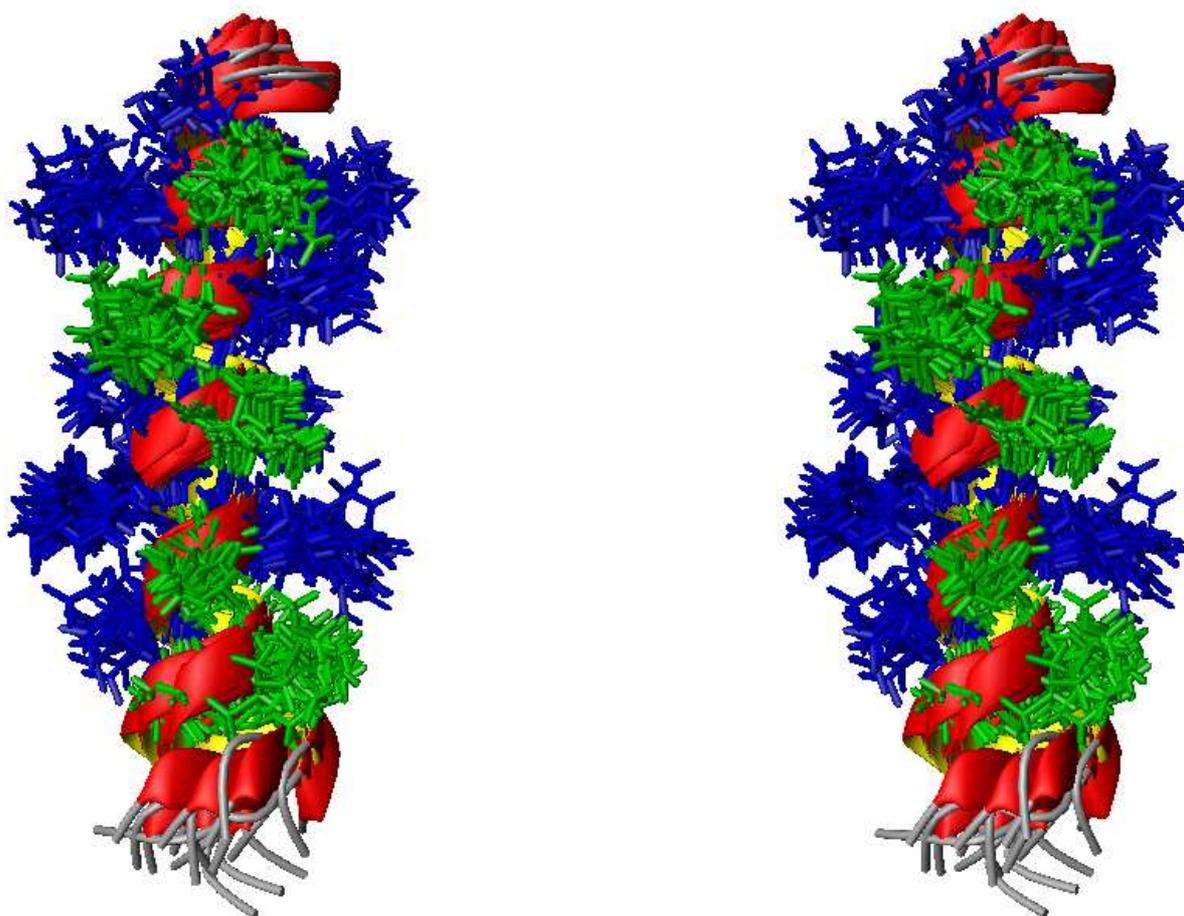


Figura 3.32. Conjunto das vinte estruturas mais estáveis resultantes do cálculo de dinâmica molecular para a Cadeia 2, com o alinhamento das estruturas na região Ser4-Val25.

3.5. ANÁLISE CONFORMACIONAL POR METODOLOGIAS TEÓRICAS

Nesta seção será apresentado o artigo intitulado “Análise Conformacional por Cálculos Teóricos da Distinctina, Peptídeo Antimicrobiano Isolado de Anuros da Espécie *Phyllomedusa distincta*”, submetido à revista Química Nova em fevereiro de 2008.

**ANÁLISE CONFORMACIONAL POR CÁLCULOS TEÓRICOS DA
DISTINCTINA, PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO ISOLADO DE ANUROS
DA ESPÉCIE *Phyllomedusa distincta***

**Victor Hugo de Oliveira Munhoz, Antônio Flávio de Carvalho Alcântara e Dorila Piló
Veloso***

Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte –
MG, Brasil

CONFORMATIONAL ANALYSIS BY THEORETICAL CALCULATIONS OF DISTINCTIN,
ANTIMICROBIAL PEPTIDE ISOLATED FROM *Phyllomedusa distincta*.

Various studies demonstrate that different frog species produce distinct classes of biologically active peptides. These peptides can act as alternative agents against pathogenic bacteria and fungi, by membrane permeability. Although studies have recently demonstrated that this process is utterly related to the secondary structure adopted by the peptide (in this case, the α -helix structure) when in contact with the bacterial membrane, the detailed mechanism is still unknown. In this work, we describe a conformational analysis of distinctin, an heterodimeric peptide isolated from the skin of *Phyllomedusa distincta*, an anuran found on the Brazilian Atlantic Forest. The study yielded stable geometry in which is perceivable the high content of α -helix secondary structure in both chains 1 and 2 of distinctin and the strong interaction among them.

Keywords: *Phyllomedusa distincta*; antimicrobial peptide; distinctin; conformational analysis.

INTRODUÇÃO

Peptídeos biologicamente ativos são encontrados em diferentes espécies de anuros¹, atuando como agentes alternativos contra bactérias patogênicas e fungos, por permeabilização da membrana bacteriana^{2,3}. O processo inicia-se basicamente com o peptídeo desestruturado em solução que adota uma estrutura α -helicoidal, com seus resíduos catiônicos atraídos eletrostaticamente à membrana⁴. O mecanismo detalhado dessas permeabilizações por peptídeos antimicrobianos (AMP) é ainda pouco conhecido^{5,6}. No entanto, tem sido proposto que o peptídeo na forma α -helicoidal mantém suas regiões hidrofílicas em contato com os grupos hidrofílicos da membrana lipídica para formar poros. Uma outra proposta sugere interações de sítios hidrofóbicos do peptídeo com regiões hidrofóbicas localizadas na parte central da membrana. Neste último caso, as formas α -helicoidais não são requeridas para as interações do peptídeo com a membrana⁷⁻¹⁰. Assim sendo, o balanço hidrofóbico-hidrofílico de um peptídeo torna-se um fator determinante para compreender as interações lipídeo – peptídeo e, por extensão, interações peptídeo – membrana bacteriana¹¹⁻¹⁴.

Diferentes metodologias têm sido empregadas para a análise conformacional de peptídeos,^{15,16} a qual tem sido uma estratégia muito importante na busca de informações sobre as atividades biológicas que os envolvem, uma vez que muitas destas estão relacionadas a processos de permeabilização de membranas. Os métodos experimentais, principalmente Dicroísmo Circular, difração de raios-X e RMN, têm sido eficientemente para este fim. No entanto, o uso desses experimentos pode ser limitado por requerer materiais na forma de monocristais, como no caso da difração de raios-X, ou em solução com solvente apropriado, ou em meio sólido como no caso da RMN. Para todas essas análises, é necessário um alto grau de pureza e às vezes quantidades

relativamente grandes de peptídeo. Isso pode restringir o trabalho, uma vez que, normalmente, peptídeos antimicrobianos ocorrem na natureza em micro-quantidades e, por outro lado, o custo para sintetizá-los é significativamente alto. Como alternativa, e, em muitos casos, como uma técnica complementar, uma ferramenta muito utilizada tem sido a busca em bancos de dados de seqüências peptídicas homólogas que apresentam propriedades químicas conhecidas. Essa ferramenta tem sido muito utilizada, pois peptídeos com seqüências semelhantes possuem, em alguma extensão, estruturas secundárias também semelhantes entre si. As estruturas secundárias podem ser previstas ainda por metodologias estatísticas¹⁷⁻¹⁹. Essas ferramentas podem ser acessadas pelos bancos de dados *Expert Protein Analysis System (ExPASy)*^{20,21}, *Basic Local Alignment Search Tool (Blast)*^{22,23}, *Network Protein Sequence Analysis (NPSA)*^{24,25} e *MetaServer*²⁶.

A literatura descreve também o emprego de metodologias teóricas na análise conformacional de peptídeos²⁷. Cálculos teóricos de otimização de geometria em nível de Mecânica Molecular (MM) são os mais empregados normalmente devido à simplicidade de operação e de recursos computacionais²⁸⁻³⁰. Os cálculos semi-empíricos (AM1, PM3 e MNDO) e *ab initio* (HF e DFT) têm sido relativamente pouco explorados por requerer maiores recursos computacionais, apesar de fornecerem normalmente resultados mais próximos aos experimentais¹⁶.

A distinctina (**1**, Figura 1) é um peptídeo isolado das glândulas da pele de *Phyllomedusa distincta*, anuro natural da Mata Atlântica Brasileira. Esse peptídeo apresenta atividade contra bactérias *Gram*-positivas e negativas e sua estrutura heterodimérica é constituída por cadeias de 22 e 25 resíduos de aminoácidos, com ligação dissulfídica entre seus resíduos de cisteína³¹. Análises por CD e IV de **1** indicaram um alto conteúdo de folhas β -pregueadas em solução aquosa³¹. Por sua vez, as análises por RMN em 2D (TOCSY e NOESY) de **1** em meio aquoso indicaram a ocorrência de várias regiões com estruturas α -helicoidais em ambas as cadeias³².

Neste trabalho, nós descrevemos a análise conformacional de **1** por três métodos: a partir de informações de homólogos em bancos de dados, por metodologias estatísticas também em bancos de dados e por metodologias teóricas em nível de mecânica molecular (MMFF94) e semi-empírico (PM3). O procedimento foi baseado inicialmente na análise estrutural das cadeias tratadas isoladamente (Cadeia 1 e Cadeia 2) para, depois, realizar a análise de **1**.

PARTE EXPERIMENTAL

As consultas a seqüências homólogas foram realizadas para as duas cadeias isoladas empregando o banco de dados MetaServer. As homologias de 100% são as próprias seqüências peptídicas estudadas e, por sua vez, as homologias de 0% são aquelas com nenhuma identidade com a seqüência estudada.

As previsões de estruturas secundárias por metodologias estatísticas foram realizadas pela consulta ao banco de dados NPSA para as duas cadeias isoladas²⁴. As metodologias de previsão empregadas foram DPM³³, GOR1³⁴, GOR2³⁵, GOR4³⁶, HNNC³⁷, PHD³⁸, SIMPA96³⁹, SOPM⁴⁰, SOPMA⁴¹ e *Secondary Consensus*⁴². Outra previsão de estruturas secundárias foi realizada pelo banco de dados ExPASy, utilizando-se os métodos de Chou & Fasman⁴³, Deleage & Roux³³, Levitt⁴⁴ e de previsão da natureza das β -folhas (paralelas ou antiparalelas)⁴⁵. Estas metodologias são mais confiáveis, pois se baseiam no alinhamento de várias seqüências peptídicas.

Para cadeias pequenas, com menos de 90 resíduos, a metodologia de previsão mais indicada é a PHD^{38,46}. Essa metodologia baseia-se em um tratamento estatístico não-linear, por meio de um sistema de redes neurais, prevendo qual a conformação mais provável por comparações entre

seqüências homólogas. Essas previsões são resultantes apenas da sua estrutura primária e consideram implicitamente o efeito do solvente como meio, uma vez que advêm de dados experimentais. O método PHD é o mais indicado para servir de comparação na modelagem molecular das cadeias por apresentar maior exatidão em previsões de estruturas secundárias.

As regiões de hidrofília de **1** foram investigadas para cada cadeia tratada isoladamente, empregando as metodologias segundo OMH⁴⁷, Kyte & Doolittle⁴⁸, Abraham & Leo⁴⁹, Bull & Beese⁵⁰, Guy⁵¹, Miyazawa⁵², Roseman⁵³, Welling⁵⁴, Parker (HPLC)⁵⁵, Cowan (HPLC pH 7,5 e 3,4)⁵⁶, Wilson (HPLC)⁵⁷, Chothia⁵⁸, Eisenberg⁵⁹, Hopps & Woods⁶⁰, Manavalan⁶¹, Black⁶², Fauchere⁶³, Janin⁶⁴, Rao & Argos⁶⁵, Wolkenden⁶⁶, Mobilidade de Rf⁶⁷ e Rose⁶⁸. As regiões de mínimo de hidrofília foram consideradas como aquelas regiões hidrofóbicas. Esses métodos baseiam-se normalmente na partição de aminoácidos ou seus análogos entre água e um solvente menos polar, bem como em análises estatísticas da distribuição de resíduos de aminoácidos em proteínas solúveis de estrutura conhecida. Alguns métodos consideram também a influência da estrutura secundária sobre a hidrofobia de certas regiões, uma vez que formas helicoidais em especial têm uma certa polarização devido às interações intramoleculares do tipo ligação hidrogênio.

Os estudos teóricos foram realizados empregando o pacote computacional SPARTAN⁶⁹ para cálculos em nível de mecânica molecular MMFF94⁷⁰⁻⁷⁶. O pacote computacional GAUSSIAN⁷⁷ foi empregado para cálculos em nível semi-empírico PM3⁷⁸. Geometrias otimizadas em nível MMFF94 foram utilizadas como modelo inicial para os cálculos de otimização da geometria da Cadeia 1 e Cadeia 2 em nível PM3. Em todos os casos, os cálculos foram realizados para estruturas não ionizadas em suas extremidades e no estado gasoso, sem considerar interações intermoleculares.

A análise conformacional da Cadeia 1 foi realizada por cálculos de otimização de geometria (MMFF94 e PM3) de fragmentos dessa cadeia, em etapas sucessivas de adições de aminoácidos na extremidade *N*-terminal de sua seqüência peptídica e re-otimizações de geometria. A busca conformacional foi realizada pela alteração manual (não sistemática) dos ângulos diedros das ligações das cadeias principais e laterais do esqueleto peptídico. Assim, na análise conformacional da Cadeia 1 foram sendo adicionados os resíduos no sentido da extremidade *N*-terminal (resíduo de ácido glutâmico) para a extremidade *C*-terminal (resíduo de isoleucina) e fazendo-se a rotação das ligações das cadeias principal e lateral a cada adição de resíduo.

Por esse procedimento, após otimização de geometria do primeiro resíduo, foi adicionado o segundo resíduo, conforme seqüência peptídica dada na Figura 1, e feita a minimização de energia desse fragmento contendo apenas dois resíduos. A geometria otimizada desse fragmento com menor energia foi utilizada para a adição do terceiro resíduo de aminoácido da seqüência da Cadeia 1 e posterior otimização de geometria. Esse procedimento foi repetido até otimização de geometria completa da Cadeia 1. Procedimento idêntico foi empregado para a análise conformacional da Cadeia 2.

Para otimização de geometria de **1**, as geometrias otimizadas de ambas as cadeias foram ligadas pelos resíduos de cisteína e, depois, re-otimizada em níveis MMFF94 e PM3. As análises da estabilidade de formas α -helicoidal e folhas β na estrutura de **1** foram realizadas considerando ambas as cadeias totalmente nessas duas formas de estrutura secundária.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resultados das consultas em bancos de dados

A busca por homólogos foi realizada empregando o banco de dados MetaServer. Esse banco de dados fornece informações obtidas pelo emprego de diferentes técnicas de alinhamento dos resíduos, permitindo a comparação e procura por estruturas recorrentes entre os resultados gerados. Pelas limitações dos programas de busca em bancos de dados não foi considerada a estrutura dimérica de **1**, realizando a busca apenas para as cadeias quando tratadas isoladamente. Ambas as cadeias apresentam 100% de homologia com seqüências depositadas no banco de dados, indicando alta concentração de formas α -helicoidais pelas análises por RMN em solução³².

A consulta ao banco de dados NPSA mostraram que todos os métodos indicam uma região α -helicoidal entre os resíduos A11 e L16 da Cadeia 1. Exceto os métodos DPM e GOR4, os demais métodos indicam ainda uma expansão da forma α -hélice, incluindo os resíduos F9 e T10. Nas regiões E1 – P6 e K18 – I22 da Cadeia 1, os métodos indicam estruturas secundárias randômicas e formas indefinidas, respectivamente. No caso da Cadeia 2, a consulta ao banco de dados NPSA mostraram que todos os métodos indicam região α -helicoidal entre os resíduos E8 e R18. No entanto, as previsões da estrutura secundária em ambas as extremidades diferem consideravelmente entre as metodologias empregadas.

A consulta ao banco de dados ExpASy para a Cadeia 1 mostrou que todos os métodos indicaram região α -helicoidal principalmente entre T10 e L15. As regiões α -helicoidais podem ser encontradas também em E1 – R3 e L16 – K20 L, porém em proporções relativamente menores. Na região entre F9 e L15 há probabilidade de ocorrer também a forma folha β , com predominância da natureza antiparalela. Além disso, na região entre E4 e G8 há uma alta probabilidade de ocorrer a

forma dobra β . No caso da Cadeia 2, o banco de dados ExPASy mostra que todos os métodos indicaram uma região α -helicoidal entre I7 e L20, região de folha β entre N1 e L6 (com predominância de natureza antiparalela) e região dobra β entre K19 e C23.

De um modo geral, os resultados obtidos a partir do banco de dados ExPASy foram condizentes com a previsão fornecida pelo banco de dados NPSA. Na Cadeia 1, observa-se um conteúdo significativo de α -hélices. Na região contendo os resíduos de prolina e glicina, observa-se uma quebra dessa estrutura secundária, conforme o esperado, dado ao impedimento desses resíduos à adoção da forma helicoidal. Na Cadeia 2, observa-se um conteúdo ainda maior de formas helicoidais, em conformidade com o previsto pelas metodologias anteriores. As previsões específicas de β -folhas indicaram uma preferência em se adotar folhas β -pregueadas antiparalelas. No entanto, de acordo com as previsões realizadas para as cadeias separadas, as formas em folhas β -pregueadas não se encontram presentes nas estruturas.

A previsão de sítios hidrofílicos nas duas cadeias foi realizada por consultas ao banco de dados ExPASy, empregando 23 metodologias diferentes. Para a Cadeia 1, em 52,2% dos resultados, o sítio mais hidrofílico localiza-se no resíduo R3, seguido pelo resíduo L16, presente em 30,4% dos resultados. Ainda na Cadeia 1, os resultados mostraram um mínimo de hidrofília (máximo de hidrofobia) no resíduo A11 (78,3% dos resultados) e no resíduo P7 (13,0%). No caso da Cadeia 2, observa-se que 43,5% dos resultados indicaram o resíduo L20 como o mais hidrofílico, seguido dos resíduos L16 e K19, com 13,0%. Os máximos de hidrofobia foram encontrados nos resíduos G5 (50,0%) e S4 (39,3%). Como pode ser observado, as previsões de hidrofília e hidrofobia convergem para determinadas regiões de cada cadeia, apesar das diferenças de metodologias.

Um fato interessante é a presença de resíduos apolares como centros hidrofílicos (L20 da Cadeia 2 e L16 de ambas as cadeias). Isto pode ser devido às suas estruturas secundárias, tanto pela polarização inerente às formas α -helicoidais quanto pela possível adoção de conformações onde átomos de hidrogênio e oxigênio da ligação peptídica apresentam-se disponíveis para ligações de hidrogênio com as moléculas de água.

Resultados dos cálculos teóricos

A Figura 2 mostra a geometria otimizada em nível PM3 da Cadeia 1. A maior parte de sua estrutura secundária apresenta-se na forma α -helicoidal, principalmente as regiões que contêm os resíduos de lisina (K14, K18 e K20), leucina (L12 e L16) e isoleucina (I13 e I21)⁷⁹. A distorção torna-se mais acentuada na extremidade *N*-terminal contendo resíduos de prolina e glicina que desfavorecem normalmente a formação de α -hélices, e localizadas em P6, P7 e G8[ref]. A geometria otimizada em nível MMFF94 da Cadeia 1 apresenta-se semelhante à geometria mostrada na Figura 2. Entretanto, a região próxima ao resíduo de cisteína apresenta uma forma α -helicoidal mais distorcida em relação geometria otimizada em nível PM3.

Cálculos de otimização de geometria em nível PM3 da Cadeia 1 foram também feitos, partindo de estruturas totalmente na forma α -helicoidal e folhas β , não realizando variações de ângulos diedros ou de ligação para busca conformacional. A geometria otimizada partindo da estrutura totalmente na forma α -helicoidal ($\Delta H_f = -142,67$ kcal/mol) mostra-se menos distorcida, podendo ser observadas regiões de α -hélice, com exceção das regiões contendo resíduos que desfavorecem essa conformação. Pode-se observar, ainda, a maior semelhança dessa estrutura com as obtidas por meio de ferramentas de previsão de estrutura secundária. No entanto, essa estrutura

apresentou uma entalpia de formação maior ($\Delta H_f = -142,6744$ kcal/mol) do que aquela obtida pelo primeiro método empregado. Portanto, esses resultados mostram que a geometria obtida por cálculos sem considerar formas α -hélice como modelo de partida proporciona conformações de menores energias.

Os cálculos de otimização de geometria em nível PM3 da Cadeia 1 partindo da estrutura na forma totalmente folhas β não convergiram, indicando tratar-se de uma conformação pouco favorecida termodinamicamente ou estado de transição. Por sua vez, a geometria otimizada em nível MMFF94 partindo da estrutura totalmente folhas β mostrou-se em forma de fita altamente estirada, com acentuada torção da cadeia na região contendo os dois resíduos de prolina, conseqüência do impedimento estérico da cadeia em adquirir uma estrutura com formas β -pregueadas. Os cálculos mostraram uma energia maior ($\Delta H_{\text{formação}} = -99,75$ kcal/mol) em relação a geometria dada na Figura 2 ou partindo da forma totalmente α -helicoidal.

A geometria otimizada em nível PM3 da Cadeia 2 (Figura 3) mostra predominância da forma α -helicoidal, com uma acentuada distorção próxima aos resíduos L16 – K19. A geometria otimizada em nível MMFF94 ($\Delta H_f = -266,30$ kcal/mol) mostra-se semelhante a geometria otimizada em nível PM3, porém apresentando a região próxima à extremidade *N*-terminal com forma α -helicoidal menos explícita. Nesta região estão presentes resíduos de leucina, valina e serina, que favorecem formas α -helicoidal.

Os cálculos de otimização de geometria da Cadeia 2 partindo da geometria na forma totalmente α -helicoidal foram realizadas em níveis MMFF94 ($\Delta H_f = -244,19$ kcal/mol) e PM3. A geometria otimizada em nível MMFF94 manteve-se totalmente na forma α -helicoidal. Porém, a

geometria otimizada em nível PM3 apresentou desestruturas nas extremidades (N1 – L6 e R18 – N22), sugerindo que essas regiões as formas α -helicoidal apresentam-se menos favorecidas.

Os cálculos de otimização de geometria em nível PM3 da Cadeia 2 partindo da estrutura na forma totalmente folhas β não convergiram, indicando tratar-se de uma conformação pouco favorecida termodinamicamente ou estado de transição. De fato, os cálculos MMFF94 resultaram em uma estrutura linear com suaves dobramentos ao longo da seqüência peptídica, com energia relativamente muito alta ($\Delta H_f = -164,94$ kcal/mol).

A Figura 5 mostra a geometria otimizada em nível PM3 da distinctina **1**. A geometria otimizada ($\Delta H_f = -479,16$ kcal/mol) apresenta-se essencialmente randômica, com algumas regiões que podem ser classificadas como α -hélice distorcida. A geometria otimizada em nível MMFF94 difere apenas pela região α -helicoidal da Cadeia 2 ser menos evidente.

A geometria otimizada de **1** a partir das estruturas totalmente α -helicoidal em nível MMFF94 ($\Delta H_f = -422,38$ kcal/mol) apresenta-se em sua maior parte formas α -helicoidais distorcidas, exceto nas regiões próximas às extremidades e aos resíduos de prolina e glicina da Cadeia 1, em que predominaram estruturas randômicas. Por sua vez, os cálculos de otimização de geometria em nível PM3 de **1** partindo da estrutura na forma totalmente α -helicoidal não convergiram.

As geometrias otimizadas de **1** a partir das estruturas totalmente folha β -pregueada em nível MMFF94 ($\Delta H_f = -342,54$ kcal/mol) e PM3 apresentam-se muito semelhantes tanto entre si quanto em relação às geometrias de partida. Ambas as geometrias apresentam uma pequena região próximas aos resíduos de cisteína com forma do tipo folha β -pregueada paralela.

CONCLUSÕES

Nos modelos construídos para as cadeias 1 e 2 da distinctina, pode-se perceber uma tendência das suas respectivas seqüências de aminoácidos de adotarem a forma helicoidal. As geometrias otimizadas por PM3 apresentam uma distorção menor da forma helicoidal. Induzindo-se as cadeias a adotarem essa conformação, obtiveram-se estruturas de maior energia, porém mais semelhantes às previstas por consulta aos bancos de dados. Isso mostra que a adoção de estruturas terciárias e quaternárias ricas em formas helicoidais pelas cadeias seria menos favorável em relação às estruturas ricas em formas randômicas, nas condições estudadas. Assim, geometrias otimizadas restringindo formas α -hélice fornecem energias maiores em relação àquelas geradas com alterações dos ângulos diedros das ligações da cadeia tanto polipeptídica quanto lateral. Porém, as primeiras são mais similares às geometrias fornecidas pelas consultas a bancos de dados.

A restrição a formas do tipo β -pregueada como geometria de partida para análise conformacional mostrou que essa estrutura secundária é menos favorecida que as formas helicoidais e randômicas. Por esses resultados, pôde-se concluir que as interações do tipo ligação de hidrogênio resultariam em geometrias na forma helicoidal, com interações intra-cadeias, mais estáveis do que as geometrias na forma β -pregueada, com interações inter-cadeias.

O estudo de previsão de sítios hidrofílicos para as duas cadeias forneceu informações sobre os resíduos que apresentam maiores ou menores interações com moléculas de água quando a distinctina se encontra em meio aquoso. Essas previsões fornecem ainda dados que podem ser úteis, por exemplo, no estudo da interação desse polipeptídeo com membranas celulares e no mecanismo de ação sobre bactérias patogênicas.

A busca conformacional (MMFF94 e PM3) de **1** realizada pela otimização de geometria em etapas recursivas de adição de resíduos da seqüência da Cadeia 1 e, depois, da Cadeia 2, mostrou-se adequada, pois a geometria otimizada de **1** apresentou: (a) muitas regiões de α -hélice; e (b) ligações de hidrogênio entre cadeias laterais de suas cadeias polipeptídicas, que resultam em formas folhas β -pregueadas. Os cálculos realizados no estado gasoso são concordantes com as análises por CD, RMN e IV realizados em meio aquoso⁸, indicando que a metodologia teórica utilizada mostra-se apropriada à análise de **1**, podendo, portanto, ser empregada convenientemente no estudo de suas propriedades.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, FAPEMIG e CAPES pelas bolsas e apoios financeiros concedidos.

REFERÊNCIAS

1. Zasloff, M.; *Nature* **2002**, *415*, 389.
2. Rinadi, A. C.; *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 799.
3. Csordas, A.; Michl, H.; *Montsh. Chem.* **1970**, *101*, 182.
4. Bechinger, B.; *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, *1462*, 157.
5. Shai, Y.; *Biopolymers* **2002**, *6*, 236.
6. Bechinger, B.; *Crit. Rev. Plant Sciences* **2004**, *23*, 1.
7. Brogden, K. A.; *Nature Reviews Microbiology* **2005**, *3*, 238.
8. Oren, Z.; Shai, Y.; *Biopolymers* **1998**, *47*, 451.

9. Matsuzaki, K.; Murase, O.; Fujii, N.; Miyajima K.; *Biochemistry* **1996**, *35*, 11361.
10. Shai, Y.; *Biochimica et Biophysica Acta* **1999**, *1462*, 55.
11. Rao, A. G.; *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, *361*, 127.
12. Toke, O.; *Peptide Science* **2005**, *80*, 717.
13. Kitamura, A.; Kiyota, T.; Tomohiro, M.; Umeda, A.; Lee, S. Inoue, T.; Sugihara, G.; *Biophys. J.* **1999**, *76*, 1457.
14. Verly, R. M.; Rodrigues, M. A.; Daghasanli, K. R. P.; Denadai, A. M. L.; Cuccovia, I. M.; Bloch Jr., C.; Frezard, F. J. G.; Santoro, M. M.; Piló-Veloso, D. Bemquerer, M. P.; *PEPTIDES*, **2008**, *29*, 15.
15. Spartan 2004 Windows Tutorial and User's Guide Wavefunction, Inc., Portland, 2003.
16. Tsai, C. S.; *An Introduction to Computational Biochemistry*, New York: Wiley-Liss Inc. 2002.
17. Ostberg, N.; Kaznessis, Y. *Peptides* **2005**, *26*, 197.
18. Apatoff, A.; Kim, E; Kliger, Y. *PLoS ONE*, **2006**, *1*, e113.
19. Schwede, T.; Kopp, J.; Guex, N.; Peitsch, M. *Nuc. Ac. Res.* **2003**, *31*, 3381.
20. <http://us.expasy.org> acessada em 30/01/08
21. Gasteiger, E.; Gattiker, A.; Hoogland, C.; Ivanyi, I; Appel, R. D.; Bairoch, A. *Nuc. Ac. Res.* **2003**, *31*, 3784.
22. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> acessada em 30/01/08
23. McGinnis, S.; Madden, T. L. *Nuc. Ac. Res.* **2004**, *32*, W20.
24. <http://npsa-pbil.ibcp.fr> acessada em 30/01/08
25. Combet, C.; Blanchet, C.; Geourjon, C.; Deléage, G. *Trends Biochem. Sci.* **2000**, *25*, 147.
26. <https://genesilico.pl/meta2/> acessada em 30/01/08
27. Schueler-Furman, O.; Wang, C.; Bradley, P.; Misura, K.; Baker, D. *Science* **2005**, *310*, 638.

28. Ponder, J. W.; Case, D. A. *Adv. Prot. Chem.* **2003**, *65*, 27.
29. Weber, I. T.; Harrison, W. R. *Protein Engineering* **1996**, *9*, 679.
30. Lomize, A. L.; Flippen-Anderson, J. L.; George, C.; Mosberg, H. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1.
31. Batista, C.V.F., Scaloni, A., Riegden, D.J., Lindomar, R.S., Romero, A.R., Dukor, R., Ceben, A., Talamo, F., Bloch Jr.; *C. FEBS Letter* **2001**, *494*, 85.
32. Raimondo, D., Andreotti, G., Saint, N., Amodeo, P., Renzone G., Sanseverino, M., Zocchi, I., Molle, G., Motta, A., Scaloni, A.; *PNAS* **2005**, *102*, 6309.
33. Deleage, G.; Roux, B.; *Protein Eng.* **1987**, *1*, 289.
34. Garnier, J.; Osguthorpe, D. J.; Robson, B.; *J. Mol. Biol.* **1978**, *120*, 97
35. Garnier, J.; Robson, B.; *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation*; Fasman, G. D. (Ed.), Plenum Press: New York., ano , Vol. 11, p. 417.
36. Garnier, J.; Gibrat, J-F.; Robson, B.; *Methods in Enzymology.* **1996**, *266*, 540.
37. Guerneur, Y.; Combinaison de classifieurs statistiques, Application a la prediction de structure secondaire des proteins; 1997,Thèse de Doctorat de l'Université de Paris 6. Paris.
38. Rost, B.; Sander, C.; *J. Mol. Biol.* **1993**, *232*, 584.
39. Levin, J. M.; Robson, B.; Garnier, J.; *FEBS Letters* **1986**, *205*, 303.
40. Geourjon, C.; Deleage, G.; *Protein Eng.* **1994**, *7*, 157.
41. Geourjon, C.; Deleage, G.; *Comput. Appl Biosci.* **1994**, *11*, 681.
42. Deleage, G.; Blanchet, C.; Geourjon, C.; *Biochimie* **1997**, *79*, 681.
43. Chou, P. Y.; Fasman, G. D.; *Adv. Enzym.* **1978**, *47*, 45.
44. Levitt, M.; *Biochemistry.* **1978**, *17*, 4277.
45. Lifson, S.; Sander C.; *Nature* **1979**, *282*, 109.

46. King, R. D., Sternberg, M. J; *Protein Sci.* **1996**, *5*, 2298.
47. Sweet, R. M.; Eisenberg D.; *J. Mol. Biol.* **1983**, *171*, 479.
48. Kyte, J.; Doolittle, R. F.; *J Mol Biol.* **1982** *157*,:105
49. Abraham, D. J.; Leo, A. J.; *Proteins: Structure, Function and Genetics* **1987**, *2*, 1302.
50. Bull, H.B.; Breese, K.; *Arch. Biochem. Biophys.* **1974**, *161*, 665.
51. Guy, H. R.; *Biophys. J.* **1985**, *47*, 61.
52. Miyazawa, S.; Jernigen, R. L.; *Macromolecules* **1985**, *18*, 534
53. Roseman, M. A.; *J. Mol. Biol.* **1988**, *200*, 513.
54. Welling, G. W.; Weijer, W. J.; Van der Zee, R.; Welling-Wester, S.; *FEBS Lett.* **1985**, *188*, 215.
55. Parker, J. M. R.; Guo, D.; Hodges, R. S.; *Biochemistry* **1986**, *25*, 5425.
56. Cowan, R.; Whittaker, R. G.; *Peptide Research* **1990**, *3*, 75.
57. Wilson, K. J.; Honegger, A.; Stotzel, R. P.; Hughes, G. J.; *Biochem. J.* **1981**, *199*, 31.
58. Chothia, C.; *J. Mol. Biol.* **1976**, *105*, 1.
59. Eisenberg, D.; Schwarz, E.; Komarony, M; Wall, R.; *J. Mol. Biol.* **1984**, *179*, 125.
60. Hopp, T. P.; Woods, K. R.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1981**, *78*, 3824.
61. Manavalan, P.; Ponnuswamy, P. K.; *Nature* **1978**, *275*, 673.
62. Black, S. D.; Mould, D. R.; *Anal. Biochem.* **1991**, *193*, 72.
63. Fauchere, J. -L.; Pliska, V. E.; *Eur. J. Med. Chem.* **1983**, *18*, 369.
64. Janin, J.; *Nature* **1979**, *277*, 491.
65. Rao, M. J. K.; Argos, P.; *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *869*, 197.
66. Wolfenden R.V.; Andersson L.; Cullis P.M.; Southgate C.C.F.; *Biochemistry* **1981**, *20*, 849.
67. Aboderin, A. A.; *Int. J. Biochem.* **1971**, *2*, 537.

68. Rose, G. D.; Geselowitz, A. R.; Lesser, G. J.; Lee, R. H.; Zehfus, M. H.; *Science* **1985**, *229*, 834.
69. Spartan 2002: Wavefunction, Inc., Irvine CA & Schrödinger, Inc., Portland, 1999.
70. Halgren, T. A.; *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 490.
71. Halgren, T. A.; *J. Comput. Chem.*; **1996**, *17*, 520.
72. Halgren, T. A.; *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 553.
73. Halgren, T. A.; *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 616.
74. Halgren, T. A., Nachbar, R. B.; *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 587.
75. Halgren, T. A.; *J. Comput. Chem.* **1999**, *20*, 720.
76. Halgren, T. A.; *J. Comput. Chem.* **1999**, *20*, 730.
77. Gaussian **2003**, Revision B.04: Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, Jr., J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.;

Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.;

Gonzalez, C.; Pople, J. A.; Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 2003.

78. Stewart, J. J. P.; *J. Comp. Chem.* **1989**, *10*, 209.

79. Csordes, F. S.; Bright, J. N.; Samson, S. P.; *J. Mol. Biol.* **2002**, *323*, 951.



1

Figura 1. Estrutura primária da distinctina (1), com indicação da ligação dissulfeto entre os resíduos de cisteína da Cadeia 1 e Cadeia 2.

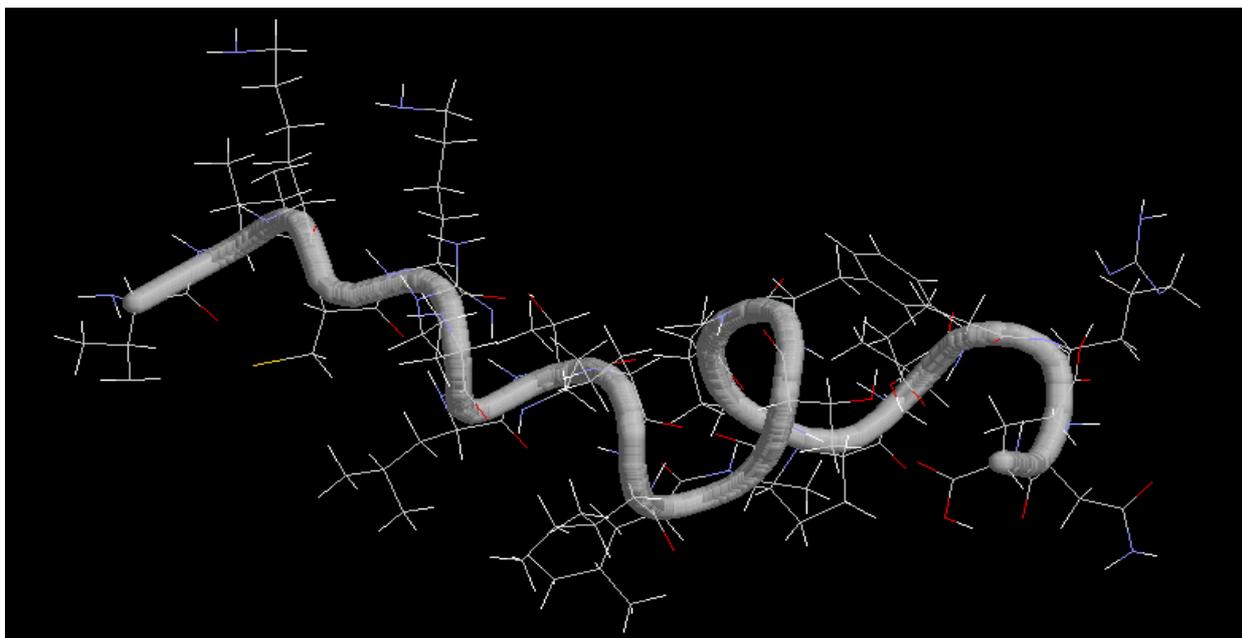


Figura 2. Geometria otimizada em nível PM3 da cadeia 1 da distinctina, cálculos considerando estrutura no estado gasoso, sem interações intermoleculares e extremidades não-ionizadas.

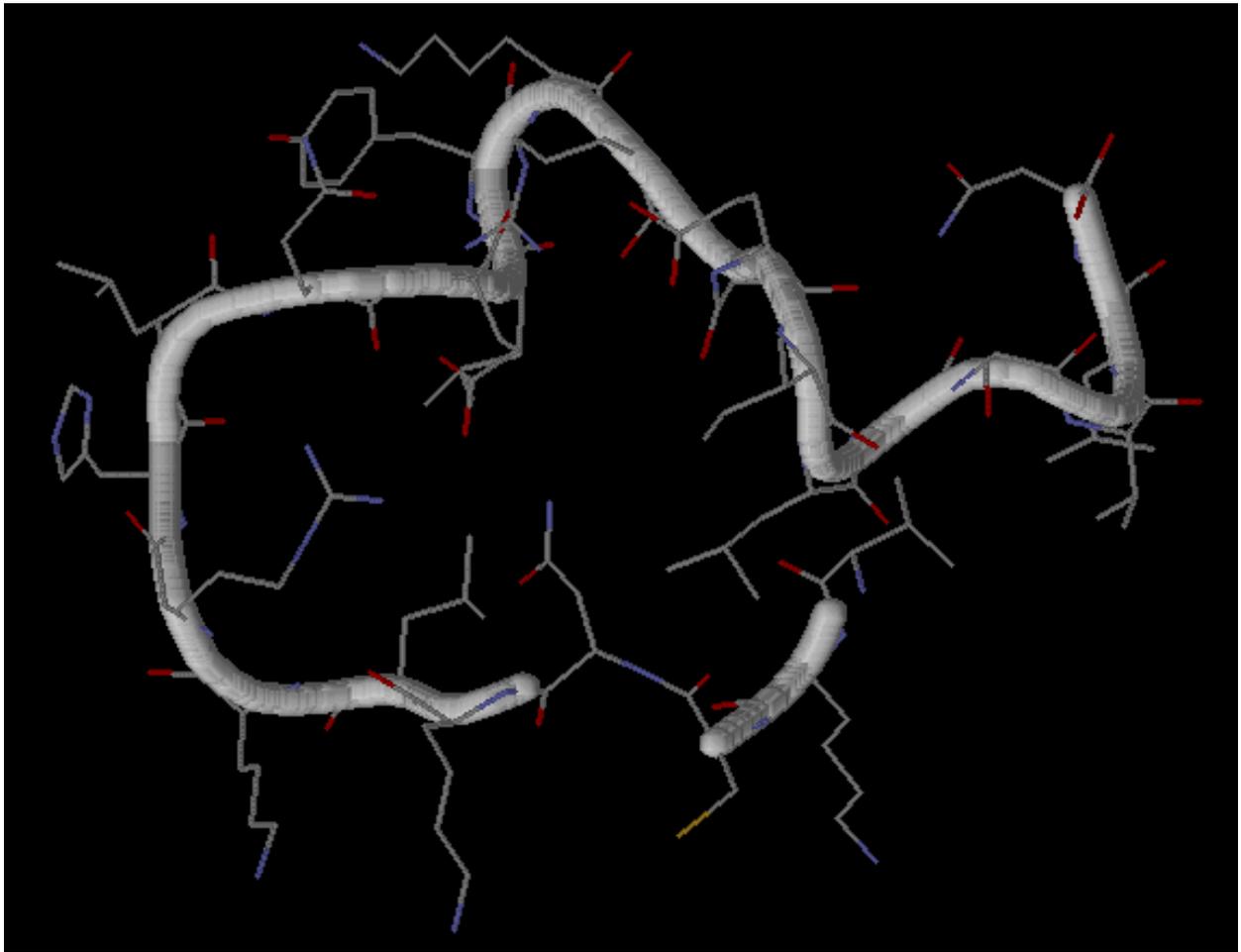


Figura 3. Geometria otimizada em nível PM3 da Cadeia 2 da distinctina, cálculos considerando estrutura no estado gasoso, sem interações intermoleculares e extremidades não-ionizadas.

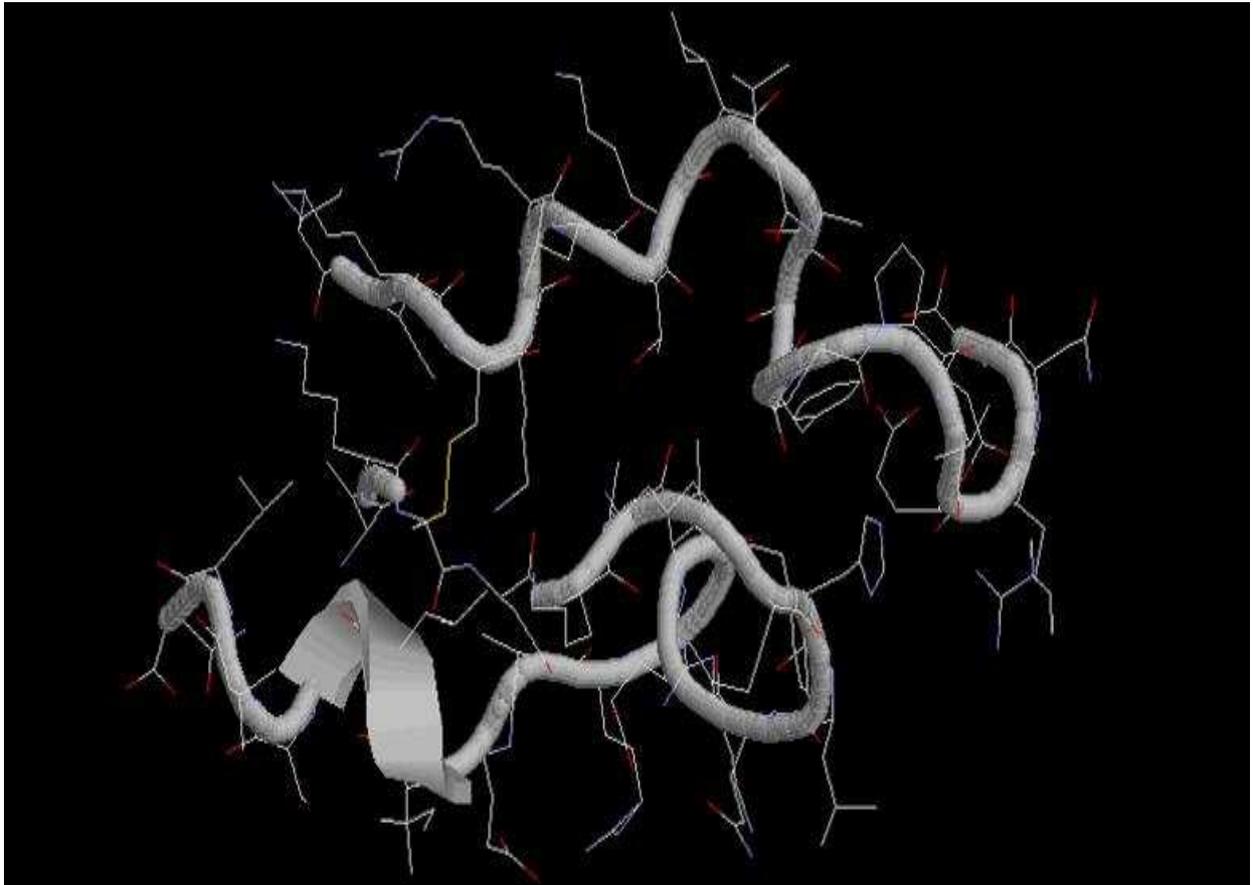


Figura 4. Geometria otimizada em nível PM3 da distinctina, cálculos considerando estrutura no estado gasoso, sem interações intermoleculares e extremidades não-ionizadas.

CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível obter os monômeros (Cadeia 1 e Cadeia 2) do peptídeo antimicrobiano distinctina através da síntese química em fase sólida segundo a estratégia Fmoc. A metodologia utilizada para a síntese mostrou-se eficiente, obtendo-se rendimentos expressivos dos monômeros brutos (95% e 91% para as Cadeias 1 e 2, respectivamente). A purificação por CLAE mostrou-se também adequada, sendo possível obter peptídeos puros e com picos bem resolvidos nos cromatogramas. Devido ao estudo prévio de amostras da Cadeia 1, foi possível caracterizar o monômero sintético somente por técnicas analíticas de CLAE, por meio de comparação entre tempos de retenção e perfil cromatográfico. As amostras sintetizadas de forma automatizada e a Cadeia 2 foram caracterizadas por espectrometria de massas, utilizando-se a técnica MALDI/TOF, que se mostrou bastante adequada, sendo possível identificar os sinais do ionograma correspondentes às massas calculadas dos monômeros.

O estudo estrutural dos monômeros iniciou-se com estudos de dicroísmo circular de ambas as cadeias, utilizando-se soluções em que se variava a concentração de TFE na solução tampão fosfato pH 8. Para ambas as cadeias, percebeu-se uma estruturação α -hélice que aumentava proporcionalmente à concentração de TFE na solução. Entretanto, a Cadeia 1 apresentou menor estruturação que a Cadeia 2, devido à presença de uma região rica em prolina em sua seqüência, o que desestabiliza este tipo de estrutura secundária. Esse estudo preliminar por dicroísmo circular permitiu escolher uma concentração de TFE adequada para os experimentos de RMN e também auxiliou a busca de correlações nos mapas de contornos NOESY, uma vez que se sabia de antemão a estrutura secundária preferencialmente adotada por ambas as cadeias.

Os estudos por RMN foram coerentes com os resultados obtidos por dicroísmo circular, sendo que ambas as cadeias apresentaram alto conteúdo de formas α -helicoidais. Além disso, foi possível elucidar vários aspectos das estruturas terciárias desses peptídeos, em especial da Cadeia 1, em que se observou uma dobra pronunciada e bem definida na cadeia principal, devido à região de alta flexibilidade, que compreende os resíduos Pro6, Pro7 e Gly8. A Cadeia 2, por sua vez, apresentou uma estrutura α -hélice em toda a sua extensão. Em ambos os casos, observou-se uma forte anfipaticidade, que é uma propriedade característica de peptídeos com tendência a interagir com membranas bacterianas.

O estudo teórico dos monômeros da distinctina mostrou resultados interessantes, evidenciando a tendência desses monômeros em adotar formas α -helicoidais, mesmo sem considerar o efeito do solvente. Os métodos de previsão de estrutura secundária e de minimização de energia a partir de uma estrutura inicial totalmente α -hélice apresentaram certa similaridade com os resultados obtidos por RMN, em especial na identificação de regiões que adotam preferencialmente essa estrutura secundária. Tais resultados mostraram

que a metodologia teórica adotada é coerente com os resultados experimentais, mostrando a viabilidade de se utilizar técnicas computacionais para estudar e prever propriedades dos monômeros estudados.

No futuro, pretende-se realizar estudos por calorimetria de titulação isotérmica e espalhamento de luz dinâmico com ambos os monômeros para averiguar a tendência de interação com membranas, bem como estudos com a distinctina para elucidar aspectos de sua atividade e interação com membranas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen, F. H.; Kennard, O.; Taylor, R.; **1983**. Systematic Analysis of Structural Data as a Research Technique in Organic Chemistry. *Acc. Chem. Res.* 16, 146.
- Arseniev, A. S.; Kondakov, V. I.; Maiorov, V. N.; Bystrov, V. F.; **1984**. NMR solution spatial structure of 'short' scorpion insectotoxin I₅A. *FEBS Lett.* 165, 57.
- Barsukov, I. L., Lian, L.-Y. **1993** *Structure determination from NMR data I. Analysis of NMR data*. In: Roberts, G. C. K. (Org.). *NMR of Macromolecules: A Practical Approach*. Oxford: IRL Press.
- Batista, C. V. F.; Rosendo da Silva, R.; Sebben, A.; Scaloni, A.; Ferrara, L.; Paiva, G. R.; Olamendi-Portugal, T.; Possani, L. D.; Bloch, C.; **1999**. Oxyopinins, Large Amphitathic Peptides Isolated from the Venom of the Wolf Spider *Oxyopes kitabensis* with Cytolytic Properties and Positive Insecticidal Cooperativity with Spider Neurotoxins. *Peptides*. 20, 679.
- Batista, C. V. F.; Scaloni, A.; Rigden, D. J.; Silva, L. R.; Romero, A. R.; Dukor, R.; Sebben, A.; Tálamo, F.; Bloch, C.; **2001**. A novel heterodimeric antimicrobial peptide from the tree-frog *Phyllomedusa distincta*, *FEBS Lett.*, 494, 85.
- Bechinger, B.; **1999**. The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta.* 1462, 157.
- Bendiak, B.; **2002**. Sensitive Through-Space Dipolar Correlations between Nuclei of Small Organic Molecules by Partial Alignment in a Deuterated Liquid Solvent. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 14862.
- Berman, H. M.; Bourne, P. E.; Westbrook, J.; Zardecki, C.; **2003**. *The Protein Data Bank* In: Chasman, D. I. (Org.); *Protein Structure: Determination, Analysis and Applications for Drug Discovery*, New York: M. Dekker, Inc.
- Bertini, I.; Cavallaro, G.; Luchinat, C.; Poli, I.; **2003**. A use of Ramachandran potentials in protein solution structure determinations. *J. Biomol. NMR.* 26, 355.

- Billeter, M.; Braun, W.; Wüthrich, K.; **1982**. Sequential resonance assignments in protein ^1H nuclear magnetic resonance. *Nature Struct. Biol.* 1, 584.
- Bierbaum, G.; Sahl, H.-G.; **1985**. Induction of autolysis of Staphylococci by the basic peptide antibiotics pep5 and nisin and their influence on the activity of autolytic enzymes. *Arch. Microbiol.* 141, 249.
- Blanco, F.; Rivas, G.; Servano, L.; **1994**. A short linear peptide that folds into a native stable. *Nature Struct. Biol.* 1, 584.
- Blumenthal, L. M.; **1953**. *Theory and Applications of Distance Geometry*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Boman, H. G.; **1995**. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immun.* 13, 61.
- Brahms, S.; Brahms, J.; **1980**. Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. *J. Mol. Biol.* 138, 149.
- Braun, W.; Bösch, C.; Brown, L. R.; Gō, N.; Wüthrich, K.; **1981**. Combined use of proton-proton overhauser enhancements and a distance geometry algorithm for determination of polypeptide conformations. Application to micelle-bound glucagons. *Biochim. Biophys. Acta.* 667, 377.
- Braun, W.; Gō, N.; **1985**. Calculation of protein conformations by proton-proton distance constraints. A new efficient algorithm. *J. Mol. Biol.*, 186, 611.
- Bruch, M. D.; Gierasch, L. M.; **1990**. Structures of wild-type and mutant signal sequences of *Escherichia coli* ribose binding protein. *J. Mol. Biol.* 265, 351.
- Brünger, A. T.; Clore, G. M.; Gronenborn, A. M.; Karplus, M.; **1986**. Three-dimensional structure of proteins determined by molecular dynamics with interproton distance restraints: application to crambin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83, 3801.
- Brünger, A. T.; Krukowski, A.; Erickson, J. W.; **1990**. Slow-cooling protocols for crystallographic refinement by simulated annealing. *Acta Cryst.* **A46**, 585.

- Brünger, A. T.; **1992a**. *X-PLOR, Version 3.1. A System for X-ray Crystallography and NMR*. New Haven: Yale University Press.
- Brünger, A. T.; **1992b**. Free R value: A novel statistical quantity for assessing the accuracy of structures. *Nature*. 335, 472.
- Brünger, A. T.; Adams, P. D.; Rice, L. M.; **1997**. New applications of simulated annealing in X-ray crystallography and solution NMR. *Structure*. 5, 325.
- Brünger, A. T.; Adams, P. D.; Rice, L. M.; **1998**. Recent developments for the efficient crystallographic refinement of macromolecular structures. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8, 606.
- Brüschweiler, R.; **1992**. Normal modes and NMR order parameters in Proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 5341.
- Cai, M.; Huang, Y.; Liu, J.; Krishnamoorthi, R.; **1995**. Solution conformations of proline rings in proteins studied by NMR spectroscopy. *J. Biomol. NMR*. 6, 123.
- Cantor, C. R.; Timasheff, S. N.; **1982**. in *Optical Spectroscopy of Proteins*. 3rd Ed. Vol. 5. (Neurath, H.; Hill R. L.; Eds.) New York: Academic Press.
- Case, D. A.; **1981**. *Encyclopaedia of Computational Chemistry, Vol. 3*. New York: Wiley.
- Case, D. A.; **2000**. Interpretation of chemical shifts and coupling constants in macromolecules. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 10, 197.
- Cavanagh, J.; Fairbrother, W. J.; III, A. G. P.; Skelton, N. J.; France, M.; **2006**. *Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice*. Oxford: Elsevier Academic Press.
- Chan, W. C.; White, P. D.; **2000**. *Fmoc solid phase peptide synthesis. A practical approach*. Oxford: Oxford University Press.
- Clarke, J., Itzhaki, L. S.; **1998**. Hydrogen exchange and protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8, 112.

- Clore, G. M.; Nilges, M.; Sukumaran, D. K.; Brünger, A. T.; Karplus, M.; Gronenborn, A. M.; **1986**. The three-dimensional structure of aI-purothionin in solution: combined use of nuclear magnetic resonance, distance geometry and restrained molecular dynamics. *EMBO J.* 5, 2729.
- Clore, G. M.; Gronenborn, A. M.; **1991**. 2-Dimensional, 3-Dimensional and 4-Dimensional NMR Methods for Obtaining Larger and More Precise 3D Structure. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 20, 29.
- Clore, G. M.; Starich, M. R.; Bewley, C. A.; Cai, M.; Kuszewski, J.; **1999**. Impact of Residual Dipolar Couplings on the Accuracy of NMR Structures Determined from a Minimal Number of NOE Restraints. *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 6513.
- Cordier, F.; Grzesiek, S.; Temperature-dependence of protein hydrogen bonding properties as studied by high-resolution NMR. **2002**. *J. Mol. Biol.*, 317, 739.
- Cornilescu, G.; Marquardt, J. L.; Ottiger, M.; Bax, A.; **1998**. Validation of protein structure from anisotropic carbonyl chemical shifts in a dilute liquid crystalline phase. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 6836.
- Cornilescu, G.; Ramirez, B. E.; Frank, M. K.; Clore, G. M.; Gronenborn, A. M.; Bax, A.; **1999**. Correlation between $^3J(\text{N-C}')$ and hydrogen bond length in protein. *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 6275.
- Crippen, G. M.; **1977**. A novel approach to the calculation of conformation: Distance geometry. *J. Comp. Phys.* 26, 449.
- Crippen, G.; Havel, T. F.; **1978**. Stable calculation of coordinates from distance information. *Acta Cryst.* A34, 282.
- Csordes, F. S.; Bright, J. N.; Sansom, M. S. P.; **2002**. Proline-induced distortions of transmembrane helices. *J. Mol. Biol.* 323, 951.
- Delaglio, F. S.; Grzesiek, G. W.; Vuister, G.; **1995**. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. NMR.* 6, 277.
- Engh, R. A.; Huber, R.; **1991**. Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta Cryst.* A47, 392.

Evans, J. N. S.; *Biomolecular NMR Spectroscopy* **1995**, Oxford: Oxford University Press.

Freudenberger, J. C.; Spitteller, P.; Bauer, R.; Kessler, H.; Luy, B.; **2004**. Stretched Poly(dimethylsiloxane) Gels as NMR Alignment Media for Apolar and Weakly Polar Organic Solvents: An Ideal Tool for Measuring RDCs at Low Molecular Concentrations *J. Am. Chem. Soc.* 126, 14690.

Freudenberger, J. C.; Knör, S.; Kobzar, K.; Heckmann, D.; Paululat, T.; Kessler, H.; Luy, B.; **2005**. Stretched poly(vinyl acetate) gels as NMR alignment media for the measurement of residual dipolar couplings in polar organic solvents. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44, 423.

Furrer, J.; John, M.; Kessler, H.; Luy, B.; **2007**. *J*-Spectroscopy in the presence of residual dipolar couplings: determination of one-bond coupling constants and scalable resolution. *J. Biomol. NMR* 37, 231.

Gessell, J.; Zasloff, M.; Opella, S. J.; **1997**. The structural and functional diversity of naturally occurring antimicrobial peptides. *J. Biomol. NMR.* 9,127.

Ginzinger, S. W.; Gerick, F.; Coles, M.; Heun, V.; **2007**. CheckShift: automatic correction of inconsistent chemical shift referencing. *J. Biomol. NMR.* 39, 223.

Goodman, M.; Naider, F.; Toniolo, C.; **1971**. Circular dichroism studies of isoleucine oligopeptides in solution. *Biopolymers.* 10, 1719.

Griesinger, C.; Sørensen, O. W.; Ernst, R. R. ; **1985**. Two-dimensional correlation of connected NMR transitions. *J. Am. Chem. Soc.* 107, 6394.

Güntert, P.; Braun, W.; Billeter, M.; Wüthrich, K.; **1989**. Automated stereospecific ¹H assignments and their impact on the precision of protein structure determinations in solution. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 3997.

Güntert, P.; Braun, W.; Wüthrich, K.; **1991**. Efficient computation of three-dimensional protein structures in solution from nuclear magnetic resonance data in solution using a novel strategy for the structure calculation with the programs DIANA, CALIBA, HABAS and GLOMSA. *J. Mol. Biol.*, 217, 517.

- Güntert, P.; Mumenthaler, C.; Wüthrich, K.; **1997**. Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the program DYANA. *J. Mol. Biol.* 273, 283.
- Güntert, P.; **1998**. Structure calculation of biological macromolecules from NMR data. *Quart. Rev. Biophys.* 31, 145.
- Havel, T. F.; Kuntz, I. D.; Crippen, G. M.; **1983**. The theory and practice of distance geometry. *Bull. Math. Biol.* 45, 665.
- Havel, T. F.; Wüthrich, K.; **1984**. A distance geometry program for determining the structures of small proteins and other macromolecules from nuclear magnetic resonance measurements of intramolecular ^1H - ^1H proximities in solution. *Bull. Math. Biol.* 46, 673.
- Havel, T. F.; **1990**. The sampling properties of some distance geometry algorithms applied to unconstrained polypeptide chains: a study of 1830 independently computed conformations. *Biopolymers.* 29, 1565.
- Hansen, M. R.; Mueller, L.; Pardi, A.; **1998**. Tunable alignment of macromolecules by filamentous phage yields dipolar couplings interactions. *Nat. Struct. Biol.*, 5, 1065.
- Heikkinen, S.; Aitio, H.; Permi, P.; Folmer, R.; **1999**. J-Multiplied HSQC (MJ-HSQC): A new method for measuring $^3J(\text{HN-H}\alpha)$ couplings in ^{15}N -labeled proteins. *J. Mag. Res.*, 137, 243.
- Hendrickson, W. A.; **1981**. *Biomolecular Structure, Conformation, Function and Evolution, Volume 1: Diffraction and Related Studies*. Oxford: Pergamon.
- Hooft, R. W.; Sander, C.; Vriend, G.; **1997**. Objectively judging the quality of a protein structure from a Ramachandran plot, *Comp. Appl. Biosci.* 13, 425.
- Huang, E. S.; Samudrala, R.; Ponder, J. W.; *Ab Initio* fold prediction of small helical proteins using distance geometry and knowledge-based scoring functions. *J. Mol. Biol.* 290, 267.
- Jacobson, B.; Anderson, W. A.; Arnold, J. T.; **1954**. A Proton Magnetic Resonance Study of the Hydration of Deoxyribonucleic Acid *Nature.* 173, 772.

- Johnson, B. A.; Blevins, R. A.; **1994**. A program for the visualization and analysis of NMR datasets. *J. Biomol. NMR.* 4, 603.
- Kaptein, R.; Zuiderweg, E. R.; Scheek, R. M.; Boelens R.; van Gunsteren, W. F.; **1985**. A protein structure from nuclear magnetic resonance data. lac repressor headpiece. *J. Mol. Biol.* 182, 179.
- Karplus, M.; **1963**. Vicinal proton coupling in nuclear magnetic resonance. *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 2870.
- Kemmink, J.; Scheek, R. M.; **1995**. Dynamic modelling of a helical peptide in solution using NMR data: Multiple conformations and multi-spin effects *J. Biomol. NMR*, 5, 33.
- Kline, A. D.; Braun, W.; Wüthrich, K.; **1986**. Studies by ¹H nuclear magnetic resonance and distance geometry of the solution conformation of the α -amylase inhibitor Tendamistat. *J. Mol. Biol.* 189, 377.
- Kline, A. D.; Braun, W.; Wüthrich, K.; **1988**. Determination of the complete three-dimensional structure of the α -amylase inhibitor tendamistat in aqueous solution by nuclear magnetic resonance and distance geometry. *J. Mol. Biol.* 204, 675.
- Konrat, R.; Tollinger, M.; Kontaxis, G.; Kräutler, B.; **1999**. NMR techniques to study hydrogen bonding in aqueous solution. *Monatshefte für Chemie*, 130, 961.
- Koradi, R.; Billeter, M.; Wüthrich, K.; **1996**. MOLMOL: A program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graph.* 14, 51.
- Kragol, G.; Lovas, S.; Varadi, G.; Condie, B. A.; Hoffman, R.; Otvos, Jr., L.; **2001**, The antibacterial peptide pyrrolicin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochemistry.* 40, 3016.
- Kumar, A.; Ernst, R. R.; Wüthrich, K.; **1980**. A two-dimensional nuclear Overhauser enhancement (2D NOE) experiment for the elucidation of complete proton-proton cross-relaxation networks in biological macromolecules. *Biophys. Res. Comm.*, 95, 1.

- Kuszewski, J.; Gronenborn, A. M.; Clore, G. M.; **1996**. Improving the quality of NMR and crystallographic protein structures by means of a conformational database derived from structure databases. *Protein Sci.* 5, 1067.
- Kuszewski, J.; Gronenborn, A. M.; Clore, G. M.; **1997**. Improvements and extensions in the conformational database potential for the refinement of NMR and X-ray structures of proteins and nucleic acids. *J. Mag. Res.* 125, 171.
- Kuszewski, J.; Clore, G. M.; **2000**. Sources of and solutions to problems in the refinement of protein NMR structures against torsion angle potentials of mean force. *J. Mag. Res.* 146, 249.
- Kuszewski, J.; Schwieters, C.; Clore, G. M.; **2001**. Improving the accuracy of NMR structures of DNA by means of a database potential of mean force base-base positional interactions. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 3903.
- Linge, J. P.; Habeck, M.; Rieping, W.; Nilges, M.; **2003**. ARIA: automated NOE assignment and NMR structure calculation. *Bioinformatics.* 19, 315.
- Lipsitz, R. S.; Tjandra, N.; **2004**. Residual dipolar couplings in NMR structure analysis. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 33, 387.
- Lu, H.; Marti, T.; Booth, P. J.; **2001**. Proline residues in transmembrane α helices affect the folding of bacteriorhodopsin. *J. Mol. Biol.* 308, 437.
- Macura, S.; Ernst, R. R.; **1980**. Elucidation of cross-relaxation in liquids by a 2D NMR spectroscopy. *Mol. Phys.*, 41, 95
- Marion, D.; Zasloff, M.; Bax, A.; **1988**. A two-dimensional NMR study of the antimicrobial peptide magainin2. *FEBS Lett.* 227, 21.
- Matsuzaki, K.; **1999**. Why and how are peptide-lipid interactions utilized on self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1462, 1.

- Metzler, W. J.; Hare, D. R.; Pardi, A.; **1989**. Limited sampling of conformational space by the distance geometry algorithm: implications for structures generated from NMR data. *Biochemistry*. 28, 7045.
- Mujeeb, A.; Ulyanov, N. B.; Billeci, T. M.; Farr-Jones, S.; James, T. L.; **1999**. *Conformational Ensemble Calculations: Analysis of Protein and Nucleic Acid NMR Data*. In: Krishna, N. R.; Berliner, L. J. (Org.). *Biological Magnetic Resonance, Vol. 17: Structure Computation and Dynamics in Protein NMR*, New York: Kluwer Academics/Plenum Publishers.
- Nardi, F.; Kemmink, J.; Sattler, M.; Wade, R. C.; **2000**. The *cis*proline(*i*–1)-aromatic(*i*) interaction: Folding of the Ala-*cis*Pro-Tyr peptide characterized by NMR and theoretical approaches. *J. Biomol. NMR*. 17, 63.
- Neal, S.; Nip, A. M.; Zhang, H.; Wishart, D. S.; **2003**. Rapid and accurate calculation of protein ¹H, ¹³C and ¹⁵N chemical shifts. *J. Biomol. NMR*. 26, 215.
- Nelson, D. L.; Cox, M. M.; **2002**. *Lehninger Princípios de Bioquímica*; 3^a ed.; São Paulo: Sarvier,
- Neri, D.; Otting, G.; Senn, H.; Wüthrich, K.; **1990**. New nuclear magnetic resonance experiment for measurements of the vicinal coupling constants ³J_{H_Nα} in proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 3663.
- Nilges, M.; Clore, G. M.; Gronenborn, A. M.; **1988**. Determination of three-dimensional structures of proteins from interproton distance data by dynamical simulated annealing from a random array of atoms: Circumventing problems associated with folding. *FEBS Lett*. 239, 129.
- Orzáez, M.; Salgado, J.; Giménez-Giner, A.; Pérez-Payá, E.; Mingarro, I.; **2004**. Influence of proline residues intransmembrane helix packing. *J. Mol. Biol*. 335, 631.
- Nilges, M.; **2001**. *Applications of Molecular Modeling in NMR Structure Determination*. In: Becker, O. M. et al. (Org). *Computational Biochemistry and Biophysics.*, New York: M. Dekker, Inc.
- Ösabay, K.; Case, D. A.; Analysis of proton chemical shifts in regular secondary structure of proteins. *J. Biomol. NMR*. 4, 215.
- Ottiger, M.; Zerbe, O.; Güntert, P.; Wüthrich, K.; **1997**. The NMR solution conformation of unligated human Cyclophilin A. *J. Mol. Biol*. 272, 64.

- Ottiger, M.; Delaglio, F.; Bax, A.; **1998**. Measurement of J and dipolar couplings from simplified two-dimensional NMR spectra. *J. Magn. Reson.*, 131, 373.
- Pal, D.; Chakrabarti, P.; **1999**. *Cis* peptide bonds in proteins: Residues involved, their conformations, interactions and locations. *J. Mol. Biol.* 294, 271.
- Pastore, A.; Saudek, V.; **1990**. The relationship between chemical shift and secondary structure in proteins. *J. Mag. Res.* 90, 165.
- Pfeiffer, S.; Karimi-Nejad, Y.; Rüterjans, H.; **1997**. Limits of NMR Structure Determination using Variable Target Function Calculations: Ribonuclease T₁, a Case Study. *J. Mol. Biol.* **266**, 400.
- Pflugrath, J.; Wiegand, E.; Huber, R.; Vértesy, L.; **1986**. Crystal structure determination, refinement, and the molecular model of the α -amylase inhibitor Hoe-467A. *J. Mol. Biol.* 189, 383.
- Powers, N.; Jensen, H.; **2006**. Chemically accurate protein structures: Validation of protein NMR structures by comparison of measured and predicted pK_a values. *J. Biomol. NMR.* 35, 39.
- Prestegard, J. H.; **2000**. NMR structure of biomolecules using field oriented media and residual dipolar couplings. *Quarterly Rev. Biophys.*, 33, 371.
- Prestegard, J. H.; Mayer, K. L.; Valafar, H.; Benison, G. C.; **2005**. Determination of protein backbone structures from residual dipolar couplings. *Methods Enzymol.*, 394, 175.
- Rundgren, H.; Mark, P.; Laaksonen, A.; **2007**. Molecular dynamics simulations of conserved Hox protein hexapeptides II. Folded structures in water solution. *J. Mol. Struct.* 805, 61.
- Quine, J. R.; Cross, T. A.; Chapman, M. S.; Bertram, R.; **2004** Mathematical aspects of protein structure determination with NMR orientational restraints. *Bull. Mathl. Biol.* 66, 1705.
- Raimondo, D.; Andreotti, G.; Saint, N.; Amodeo, P.; Renzone, G.; Sanseverino, M.; Zocchi, I.; Molle, G.; Motta, M.; Scaloni, A.; **2005**. A folding-dependent mechanism of antimicrobial peptide resistance to degradation unveiled by solution structure of distinctin. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 102, 6309.

- Ramachandran, G. N.; Ramakrishnan, C.; Sasisekharan, V.; **1963**. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J. Mol. Biol.* **7**, 95.
- Rule, G. S.; Hitchens, T. K.; **2006**. *Focus on Structural Biology, Vol. 5: Fundamentals of Protein NMR Spectroscopy*. Dordrecht: Springer.
- Saunders, M.; Wishnia, A.; Kirkwood, G.; **1957**. The Nuclear Magnetic Resonance of Ribonuclease I. *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 3289.
- Schwieters, C. D.; Kuszewski, J. J.; Tjandra, N.; Clore, G. M.; **2003**. The Xplor-NIH NMR Molecular Structure Determination Package. *J. Mag. Res.* **160**, 66.
- Schwieters, C. D.; Kuszewski, J. J.; Clore, G. M.; **2006**. Using Xplor-NIH for NMR molecular structure determination. *Progr. NMR Spectr.* **48**, 47.
- Sibley A. B.; Cosman, M.; Krishnan, V. V.; **2003**. An empirical correlation between secondary structure content and averaged chemical shifts in proteins. *Biophysical Journal*, **81**, 1223.
- Shai, Y. **1999**. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta.* **1462**, 55.
- Spitzfaden, C.; Braun, W.; Wider, G.; Widmer, H.; Wüthrich, K.; **1994**. Determination of NMR solution structure of the cyclophilin A-Cyclosporin A complex. *J. Biomol. NMR.* **4**, 463.
- Sprangers, R.; Bottomley, M. J.; Linge, J. P.; Schultz, J.; Nilges, M.; Sattler, M.; **2000**. Refinement of the protein backbone angle ψ in NMR structure calculations. *J. Biomol. NMR.* **16**, 47.
- Spronk, C. A. E. M.; Bovin, A. M. J. J.; Radha, P. K.; Melancini, G.; Boelens, R.; Kaptein, R.; **1999**. The solution structure of Lac repressor headpiece 62 complexed to a symmetrical *lac* operator. *Structure.* **7**, 1483.
- Spronk, C. A. E. M.; Linge, J. P.; Hilbers, C. W.; Vuister, G. W.; **2002**. Improving the quality of protein structures derived by NMR spectroscopy. *J. Biomol. NMR.* **22**, 281.

- Spronk, C. A. E. M.; Nabuurs, S. B.; Krieger, E.; Vriend, G.; Vuister, G. W.; **2004**. Validation of protein structures derived by NMR spectroscopy. *Progress Nuc. Mag. Res. Spec.* 45, 315.
- Sutcliffe, M. J.; **1993**. *Structure determination from NMR data II: Computational Approaches*. In: Roberts, G. C. K.; (Org.). *NMR of Macromolecules: A Practical Approach.*, Oxford: IRL Press.
- Szilágyi, L.; Samu, J.; Harsányi, I.; **1995**. Structure Elucidation of Two Acetylated Derivatives of Oligomycin A. *Sepctr. Lett.* 28, 699.
- Tjandra, N.; Bax, A.; **1997a**. Direct measurements of distances and angles in biomolecules by NMR dilute liquid crystalline medium. *Science*, 278, 1111.
- Tjandra, N., Bax, A.; **1997b**. Measurement of Dipolar Contributions to $^1J_{CH}$ Splittings from Magnetic-Field Dependence of J /Modulation in Two-Dimensional NMR Spectra *J. Magn. Reson.*, 124, 512.
- Troll, W.; Cannan, R. K.; **1953**. A modified photometric ninhydrin method for the analysis of amino and imino acids. *J. Biol. Chem.* 200, 803.
- Tsai, C. S.; **2002**. *An Introduction to Computational Biochemistry*. New York: Wiley-Liss.
- van Gunsteren, W. F.; Brunner, M.; Gros, P.; van Schaik, R. C.; Schiffer, C. A.; Torda, A. E.; **1994**. Accounting for molecular mobility in structure determination based on nuclear magnetic resonance spectroscopy and X-ray diffraction data. *Methods Enzymol.*, 261, 619.
- van Gunsteren, W. F.; **1998**. Validation of molecular dynamics simulation. *J. Chem. Phys.* 108, 6109.
- van Gunsteren, W. F.; Bonvin, A. M. J. J.; **1999**. Daura, X.; Smith, L. J.; *Biological Magnetic Resonance: Volume 17: Structure Computation and Dynamics in Protein NMR*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Vogt, T. B.; Bechinger, B.; Kinder, R.; Helmle, M.; Harzer, U.; Schinzel, S.; **1999**. Peptide structural analysis by solid-state NMR spectroscopy. *Biopolymers.* 51, 174.

- Wang, L.; Eghbalnia, H. R.; Markley, J. L.; **2007**. Nearest-neighbor effects on backbone alpha and beta carbon chemical shifts in proteins. *J. Biomol. NMR*. 39, 247.
- Wang, Y.; Wishart, D. S.; **2005**. A simple method to adjust inconsistently referenced ^{13}C and ^{15}N chemical shift assignments of proteins. *J. Biomol. NMR*. 31, 143.
- Westerhoff, H. V.; Juretic, D.; Hendler, R. W.; Zasloff, M.; **1989**. Magainins and the disruption of membrane-linked free-energy transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86, 6597.
- Williamson, M. P.; Havel, T. F.; Wüthrich, K.; **1985**. Solution conformation of proteinase inhibitor IIa from bull seminal plasma by ^1H nuclear magnetic resonance and distance geometry. *J. Mol. Biol.* 31, 1647.
- Williamson, M. P.; **1994**. The structure and function of proline-rich regions in proteins. *J. Biochem.* 297, 249.
- Wishart, D. S.; Sykes, B. D.; Richards, F. M.; **1992**. The chemical shift index: A fast, and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy. *Biochemistry*. 31, 1647.
- Wishart, D. S.; Nip, A. M.; **1998**. Protein chemical shift analysis: a practical guide. *Biochem. Cell Biol.* 76, 153.
- Wishart, D. S.; Case, D. A.; **2001**. Use of chemical shifts in macromolecular structure determination. *Methods Enzymol.* 338, 3.
- Wright, P. E.; **1989**. What can two-dimensional NMR tell us about proteins? *Trends Biochem. Sci.* 14, 255.
- Wüthrich, K.; **1986**. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. New York: Wiley.
- Wüthrich, K.; **1989**. The development of nuclear magnetic resonance spectroscopy as a technique for protein structure determination. *Acc. Chem. Res.* 22, 36.
- Xia, Y.; Kong, X.; Ip, N.; Zhu, G.; **2000**. A *J*-Multiplied HMQC (MJ-HMQC) experiment for measuring $^3J(\text{HN-H}\alpha)$ coupling constants. *J. Mag. Res.*, 146, 228.

- Yang, L.; Weiss, T. M.; Lehrer, R. I.; Huang, H. W.; **2000**. Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin. *Biophys. J.* 79, 2002.
- Yao, J.; Dyson, H. J.; Wright, P. E.; **1997**. Chemical shift dispersion and structure prediction in unfolded and partly folded proteins. *FEBS Lett.* 419, 285.
- Zasloff, M.; **2002**. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* 415, 389.
- Zhang, H.; Neal, S.; Wishart, D. S.; **2003**. RefDB: A database of uniformly referenced protein chemical shifts. *J. Biomol. NMR.* 25, 173.
- Zuiderweg, E. R. P.; Billeter, M.; Boelens, R.; Scheek, R. M.; Wüthrich, K.; Kaptein, R.; **1984**. *Spatial arrangement of the three α -helices in the solution structure of *E. coli lac* repressor DNA-binding domain.* *FEBS Lett.* 174, 243.