



**Universidade de Brasília - UnB**

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - IB

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR - CEL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA  
MOLECULAR

# **INTERAÇÕES MOLECULARES DE PEPTÍDEOS COM MEMBRANAS FOSFOLIPÍDICAS**

**Cristiano Guimarães do Amaral Pinheiro**

**Orientadora: Dra. Sonia Maria de Freitas**

**Co-Orientador: Dr. Werner Treptow**

Dissertação de Mestrado submetida  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Molecular da Universidade  
de Brasília como parte integrante dos  
requisitos para a obtenção do título  
de Mestre em Biologia Molecular.

**Brasília - Fevereiro de 2009**

## **Banca Examinadora**

**Dr<sup>a</sup> Sonia Maria de Freitas (orientadora)**

Laboratório de Biofísica Molecular

Departamento de Biologia Celular

Universidade de Brasília – UnB

**Dr<sup>a</sup> Elaine Rose Maia (examinadora)**

Instituto de Química

Universidade de Brasília – UnB

**Dr Luciano Paulino da Silva (examinador)**

Pesquisador da EMBRAPA/CENARGEM

**Dr Fernando Fortes de Valencia (suplente)**

Laboratório de Biofísica Molecular

Departamento de Biologia Celular

Universidade de Brasília - UnB

## **AGRADECIMENTOS**

À minha mãe, dona Ana Maria Guimarães Amaral, que muito me ajudou nesse início de árdua caminhada pela ciência no Brasil. Muito obrigado pela atenção e, sobretudo pela compreensão durante os momentos difíceis ao longo, não só da pós-graduação, mas da vida.

À minha querida madrinha Carmem Guimarães Amaral pelo apoio emocional, carinho e acolhimento em todos os momentos que precisei.

À toda a minha família, tios, tias, primos e primas. Vocês realmente fazem a diferença.

À minha orientadora Dr<sup>a</sup> Sonia Maria de Freitas por toda a paciência e sabedoria em conduzir minha formação acadêmica. Nunca se furtou em abrir portas para seus alunos no progresso do conhecimento. Sua presença foi de singular importância para o meu amadurecimento científico e também de vida. Obrigado pela consideração, didática e o carinho em conduzir suas orientações.

O meu Co-Orientador Werner Treptow que soube conduzir com muita sabedoria meu aprendizado ao longo do mestrado. Obrigado a você pela paciência em me mostrar os vários caminhos do conhecimento científico e todas as portas que ele pode nos abrir.

Ao amigo Adelson Joel da Silva pelas conversas sobre a vida, a ciência e nosso laboratório. Agradeço a você por toda a consideração e pela amizade.

A todos os colegas do laboratório: Larissa, Muriele, Éverton, Sandrielle, Alice, Rozeni, Gisele, Viviane, Thiago, Luana e todos os outros que fazem parte do Laboratório de Biofísica Molecular.

Ao meu amigo Pedro Assumpção que durante anos proporcionou ótimos momentos de companhia e conversa. Por todo apoio e atenção, muito obrigado.

Ao meu amigo Antônio Luiz que sempre me incentivou a permanecer na pesquisa e a sempre querer mais da ciência. Valeu “Tonhão”.

À minha querida amiga Camila Coelho por todo o carinho, atenção e por estar sempre com um ótimo astral e nos contagiando com esse bom humor. Por sempre me incentivar, muito obrigado.

Ao técnico responsável pelo Laboratório de Biofísica Molecular, senhor Francisco. Valeu “Chiquinho”.

Ao Dr João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa, que através de parceria com a Dr<sup>a</sup> Sonia Maria de Freitas, cedeu o uso do cluster do LNLS para a realização de parte das simulações apresentadas nesta dissertação.

À Dr<sup>a</sup> Elaine Rose Maia (Instituto de Química da Universidade de Brasília), Dr Luciano Paulino da Silva (EMBRAPA/CENARGEM) e ao Dr Fernando Fortes de Valencia (Laboratório de Biofísica Molecular da Universidade de Brasília) por aceitarem gentil e prontamente o convite de participarem da Banca Examinadora desta defesa de dissertação de mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília pela excelente qualidade do programa na avaliação do CAPES.

Ao CNPq pelo suporte financeiro na forma de bolsa de estudo.

A todos os demais colegas e amigos que direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação, muito obrigado.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	01
ABSTRACT .....	02
LISTA DE EQUAÇÕES.....	03
LISTA DE FIGURAS.....	08
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>1.1 Inserção de Peptídeos na Membrana Celular</b>	
1.1.1 Aspectos Gerais e Importância .....	12
1.1.2 Caracterização Estrutural do Processo de Inserção de Peptídeos em Membranas .....	13
1.1.3 Energética da Interação Peptídeo e Membrana .....	19
1.1.4 Fronteira do Conhecimento .....	22
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>25</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
<b>4.1 Arcabouço Teórico</b>	
4.1.1 Simulação de Dinâmica Molecular .....	29
4.1.1.1 Aproximações e Convenções .....	29
4.1.1.2 Função de Energia Potencial .....	31
4.1.1.3 Equações do Movimento .....	34
4.1.1.4 Integradores do Movimento .....	35
4.1.1.5 Amostragem Estatística .....	36
4.1.1.6 Simulações à Temperatura e Pressão Constantes .....	37
4.1.1.7 Cálculo do Perfil de Energia Livre .....	38

<b>4.2 Protocolos das Simulações</b>	
<b>4.2.1 Simulações Utilizando o NAMD</b> .....	40
4.2.1.1 Sistema Macromolecular .....	40
4.2.1.2 Dinâmica Molecular .....	41
4.2.1.3 Perfil de Energia Livre pelo Método <i>Adaptive Biasing Force (abf)</i> .....	42
<b>4.2.2 Simulações Utilizando Gromacs</b> .....	43
4.2.2.1 Sistema Macromolecular .....	43
4.2.2.2 Dinâmica Molecular .....	44
4.2.2.3 Códigos Implementados e Programas Utilizados .....	45
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	46
<b>5.1 Energética da Interação peptídeo/membrana: Campo de Força     CHARMM e Método ABF</b> .....	47
<b>5.2 Nova Estratégia para Estudar a Inserção de     Peptídeos: Campo de Força GROMOS</b> .....	49
5.2.1 Simulação da Membrana .....	49
5.2.2 Estrutura e Energética da Inserção dos Peptídeos .....	52
<b>6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b> .....	64
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	66

## **RESUMO**

A inserção de peptídeos na membrana plasmática é um dos principais paradigmas do processo geral de interação entre a célula e o ambiente. O entendimento físico-químico desse processo, sobretudo nos aspectos estruturais e energéticos da matéria, no nível das interações atômicas, é de particular interesse para novas aplicações na medicina e farmacologia. Podemos destacar o desenho racional de peptídeos antibacterianos, que por meio de interações com a membrana causam lise celular e conseqüente morte desses microorganismos. Além disso, a compreensão do processo de inserção peptídica é de igual interesse para o desenvolvimento de novos produtos voltados para o tratamento clínico de doenças humanas, como o Mal de Alzheimer relacionado à inserção e agregação de placas peptídicas na membrana. Dada à relevância biológica da inserção peptídica, o estudo desse processo têm sido de interesse científico e tecnológico para diversos grupos de pesquisa no mundo, entretanto, a sua completa descrição microscópica permanece ainda não elucidada. Nesse contexto atual, como um esforço adicional, esse trabalho visa caracterizar as propriedades microscópicas dirigentes do fenômeno de inserção de peptídeos utilizando simulações computacionais de Dinâmica Molecular, conjugadas a métodos de cálculo de energia livre. Um tempo total de simulação de 1,2 microsegundos foi requerido para estudar a partição de dois peptídeos com natureza físico-química distintas, isto é, um hidrofóbico e o outro hidrofílico carregado. O estudo revela uma estabilidade energética global para o peptídeo hidrofílico estruturalmente associado à região interfacial água/membrana, e inclusão do hidrofóbico no centro da bicamada. Em ambos os casos, o passo limitante para o processo de inserção é a transposição peptídica através da região polar do lipídio. Via manipulações biotecnológicas, essa informação é de especial valor para a maior estabilização de moléculas no interior da membrana, aumento da velocidade de inserção ou estabilização de agregados na superfície celular. Finalmente, a metodologia aqui desenvolvida permitirá estudar uma série de outras moléculas que se particionem e efetivamente atravessem diferentes modelos de membranas, contribuindo para o entendimento geral sobre o transporte de peptídeos pela membrana.

## **ABSTRACT**

Peptide insertion through the plasmatic membrane is a major paradigm for the cellular-environment communications. At the level of atomic interactions, the structural and energetic knowledge about this process is of particular interest for novel applications in the fields of medicine and pharmacology. We can highlight the rational design of antimicrobial peptides that induce the microorganism death by causing cellular lysis and further developments applied to human dysfunctions, such as the Alzheimer's disease related to peptide insertion and aggregation on the membrane surface. Given the broad biological significance of peptide insertion through membranes, this process has been of scientific and technological interests for several worldwide research groups, its complete microscopic description remains however to be clarified. Here, as an additional effort, the present contribution aims to the characterization of major microscopic properties controlling the process of peptide insertion, using advanced methods of free-energy Molecular Dynamics simulations. A total simulation time of 1.2 microseconds was required to study the membrane partition of two peptides with distinct physical and chemical properties, *e.g.*, one hydrophobic and the other hydrophilic (charged). The study reveals a global energy minimum for the hydrophilic peptide adsorbed on the water-membrane interface, and the burying of the hydrophobic one in the lipid-bilayer main core. For both peptides, the rate-limiting step for molecule partition is the displacement across the lipid headgroups. By means of biotechnological manipulations, these findings are worth to enhance the stability of molecules in the bilayer-tail region, to speed up the insertion process or even to stabilize peptide aggregate forms on the membrane surface. Finally, the methodology herein developed allows one to study another set of molecules that interacts or permeates different lipid bilayer models, contributing therefore to a general understanding concerning the transport of peptides across membranes.



## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1, Variação de Energia Livre:  $\Delta E = -RT \ln(K_{eq})$ , onde  $R$  é a constante dos gases,  $T$  a temperatura absoluta em graus Kelvin (K) e  $K_{eq}$  uma constante de equilíbrio para constantes de velocidade de um dado processo de reação.....**20**

Equação 2, Limite de uma média temporal:  $\lim_{t \rightarrow \infty} \bar{A}_t = \langle A \rangle$ , onde  $\bar{A}_t$  corresponde a uma média temporal qualquer e  $\langle A \rangle$  à média termodinâmica.....**29**

Equação 3, Energia Potencial de um sistema de N partículas:

$$U(\mathbf{r}^N) = \sum_i v_1(\mathbf{r}_i) + \sum_i \sum_{j>i} v_2(\mathbf{r}_i, \mathbf{r}_j) +$$

onde  $v_1(\mathbf{r}_i), v_2(\mathbf{r}_i, \mathbf{r}_j) \dots$  representa o potencial intramolecular, o potencial entre pares atômicos e assim sucessivamente.....**32**

Equação 4, Potencial Efetivo:  $U(\mathbf{r}^N) \cong \sum_i v_1(\mathbf{r}_i) + \sum_i \sum_{j>i} v_2^{efetivo}(\mathbf{r}_{ij})$ .....**32**

Equação 5, Campo de força AMBER, *Assisted model building with energy refinement* (Cornell et al, 1995).....**32**

$$U(\mathbf{r}) = \sum_{\text{ligação}} k_r (r - r_o)^2 + \sum_{\text{ângulo}} k_\theta (\theta - \theta_o)^2 + \sum_{\text{diédro}} \sum_n \frac{U_n}{2} \cdot [1 + \cos(n\phi - \gamma)]$$

$$+ \frac{1}{k_{vdW}^{1-4}} \cdot \sum_{\substack{i<j \\ \{i,j\} \in 1-4}} \left[ \left( \frac{R_{ij}^*}{r_{ij}} \right)^{12} \cdot 2 \left( \frac{R_{ij}^*}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{1}{K_{Coulomb}^{1-4}} \cdot \sum_{\substack{i<j \\ \{i,j\} \in 1-4}} \frac{q_i q_j}{4\pi \epsilon_o \epsilon_1 r_{ij}}$$

$$+ \sum_{\substack{i<j \\ \{i,j\} > 1-4}} \left[ \left( \frac{R_{ij}^*}{r_{ij}} \right)^{12} \cdot 2 \left( \frac{R_{ij}^*}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_{\substack{i<j \\ \{i,j\} > 1-4}} \frac{q_i q_j}{4\pi \epsilon_o \epsilon_1 r_{ij}}$$

onde os três primeiros termos da soma referem-se às interações ligadas entre átomos e os últimos às interações não-ligadas (van der Waals e Coulomb respectivamente).....**32**

Equação 6, parâmetros de van der Waals:  $\varepsilon_{ij} = \sqrt{\varepsilon_i \varepsilon_j}$  e  $R_{ij}^* = R_i^* + R_j^*$  ....**33**

Equação 7, equações de Newton para uma partícula i:

$$m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i(t)}{dt^2} = \mathbf{f}_i(t) \text{ e } \mathbf{f}_i(t) = - \frac{\partial U(\mathbf{r}^N)}{\partial \mathbf{r}_i(t)}$$

onde  $U(\mathbf{r}^N)$  é a energia potencial do sistema que depende apenas das coordenadas cartesianas das partículas  $\{\mathbf{r}_{ij}\}$  .....**34**

Equação 8, integrador do tipo simplético (Martyna *et al*, 1996 e Tuckerman *et al*, 2000):

$$\lim_{n \rightarrow \infty} \left( \frac{1}{n} \right) \sum_{k=1}^n \left| \frac{E(k\delta t) - E(0)}{E(0)} \right| \leq \varepsilon MD$$

onde n é o numero de passos de integração durante a simulação,  $E(0) \equiv H(\mathbf{r}^N, \mathbf{p}^N, 0)$  é a energia do sistema equilibrada,  $\varepsilon MD$  é o limite superior para a conservação da energia, viz.  $10^{-4}$ .....**35**

Equação 9, Integradores do movimento (variação da posição da partícula):

$$\mathbf{r}_i(t + \delta t) = 2\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_i(t - \delta t) + \mathbf{a}_i(t)\delta t^2 \text{ .....} \mathbf{36}$$

Equação 10, Integradores do movimento (variação da velocidade da partícula):

$$\mathbf{v}_i(t) = \frac{\mathbf{r}_i(t+\delta t) - \mathbf{r}_i(t-\delta t)}{2\delta t} \text{ .....} \mathbf{36}$$

Equação 11, Acoplamento fraco da temperatura:  $\frac{dT_k(t)}{dt} = \frac{T - T_k(t)}{\tau_T}$  onde

$\tau_T$  representa o tempo de relaxamento associado às flutuações da temperatura.....**37**

Equação 12, variação da energia cinética:  $\Delta K = \frac{1}{2} (\chi^2 - 1) N k_B T_k(t)$ , onde  $\chi$  é um fator re-escalonamento das velocidades.....**37**

Equação 13, fator de re-escalonamento das velocidades:

$$\chi = \left[ 1 + \frac{\delta t}{\tau_T} \left( \frac{T}{T_k(t)} - 1 \right) \right]^{\frac{1}{2}} \dots\dots\dots**37**$$

Equação 14, acoplamento da pressão:  $\frac{dP}{dt} = \frac{P_0 - P}{\tau_p}$  onde  $\tau_p$  representa o

tempo de relaxamento associado às flutuações da pressão.....**38**

Equação 15, relaxamento de primeira ordem da pressão em relação à  $P_0$ :

$$\mu = \delta_{ij} - \frac{\Delta t}{3 \tau_p} \beta_{ij} \{ P_{0ij} - P_{ij}(t) \}$$

onde i e j equivalem às dimensões cartesianas do sistema,  $P_{0ij}$  a pressão de referência e  $P_{ij}(t)$  a pressão medida a cada instante. O fator  $\beta$  corresponde à compressibilidade isotérmica do sistema.....**38**

Equação 16, variação de energia livre:  $A(z) = A(0) - \frac{1}{\beta} \ln P(z)$ , onde

$\beta = k_B T$  é o fator temperatura, definido pela constante de Boltzmann  $k_B$  e a temperatura  $T$ ,  $P(z)$  é a densidade de probabilidade canônica de se encontrar o sistema no estado  $z$  e  $A(0)$  é uma constante .....**38**

Equação 17, probabilidade de densidade canônica:  $P(z) = \frac{\sum_i^n e^{-\beta U_i(z)}}{S}$  onde sendo  $e^{-\beta \cdot U_i(z)}$  o peso de Boltzmann para qualquer microestado do sistema, no estado  $z$ , com energia potencial  $U_i(z)$  e  $S$  indica a função de partição.....**38**

Equação 18, função de partição:  $S = \sum_N \sum_i^n e^{-\beta U_i(N)}$  .....**39**

Equação 19, derivada total da energia livre na direção  $z$ :

$$\frac{dA(z)}{dz} = \left\langle \frac{\partial U(\mathbf{r}^N)}{\partial z} - \frac{1}{\beta} \frac{\partial \ln|J|}{\partial z} \right\rangle_z = -\langle F_z \rangle_z$$

onde  $-\langle F_z \rangle_z$  é a força média coletada a uma dada posição da coordenada de reação durante a simulação de dinâmica molecular, e  $|J|$  um termo explícito do Jacobiano, para a transformação inversa de coordenadas generalizadas para cartesianas.....**39**

Equação 20, esquema da integração termodinâmica:

$$\frac{dA(z)}{dz} = \left\langle \frac{\partial U(\mathbf{r}^N)}{\partial z} \right\rangle_z \dots\dots\dots**39**$$

Equação 21, *Adaptive Biasing Force (ABF)*:  $\mathbf{F}^{ABF} = \nabla_{\mathbf{r}} A = -\langle F_z \rangle_z \nabla_{\mathbf{r}} z$

onde uma força iterativa,  $\mathbf{F}^{ABF}$ , que permite ao sistema sobrepor barreiras de energia livre durante a simulação;  $\nabla_{\mathbf{r}} A$  é o gradiente da estimativa mais atual da energia livre em relação às coordenadas cartesianas,  $\mathbf{r}^N$  .....**40**

Equação 22, variação de energia livre entre dois estados  $z$ :

$$\Delta A = A(z_2) - A(z_1) = -\frac{1}{\beta} \ln \sum_i^n \frac{e^{-\beta U_i(z_2)}}{e^{-\beta U_i(z_1)}}$$

para entendimento dos termos dessa equação ver legenda de equações 16 e 17.....**58**

Equação 23, RMSD entre duas moléculas protéicas:

$$rmsd(A, B, t) = \sum_{i=1}^N \frac{\|A_i - B_i\|}{N}$$

onde  $A$  e  $B$  são conformações das proteína nos instantes  $t1 = 0$  e  $t2 = t$ , respectivamente, e  $i$  é o índice de cada átomo dessas moléculas, sendo  $\|A_i - B_i\|$  a norma entre os vetores  $A_i$  e  $B_i$  .....**60**

Equação 24, norma entre dois vetores:

$$\|A_i - B_i\| = \sqrt{(A_{ix} - B_{ix})^2 + (A_{iy} - B_{iy})^2 + (A_{iz} - B_{iz})^2}$$

onde, de forma generalizada,  $N_{kl}$  é uma coordenada cartesiana  $l$  de um átomo  $k$  para uma dada conformação  $N$  .....**60**

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Modelo simplificado de uma membrana em formato de bicamada lipídica. As esferas em cinza representam os grupos carregados, enquanto que os bastões em amarelo representam o núcleo hidrofóbico. (Modificada de Lehninger Princípios de Bioquímica, pág 304).....12

**Figura 2.** Modelo para três mecanismos de inserção de peptídeos antimicrobianos  $\alpha$ -helicoidais em função da temperatura. Peptídeos que seguem esse modelo de inserção adotam o estado “I” quando os fosfolípidios estão abaixo da temperatura de transição. O estado “T” é atingido para a fase líquida-cristalina da membrana enquanto que o estado “S” é característico de elevadas temperaturas (Adaptado de Afonin *et al*, 2008; DOI: 10.1021/ja803156d).....18

**Figura 3.** Perfil hipotético da variação de energia livre para a inserção de peptídeos na membrana. A curva está dividida em 4 regiões: (i) região de mínimo local de energia referente à adsorção do peptídeo em água (azul); (ii) barreira de energia na região de interface (violeta); (iii) mínimo global de energia, i.e, região preferencial de interação entre o peptídeo e a membrana; (iv) barreira de energia limitante para a permeação da molécula protéica até o centro das caudas hidrofóbicas (quadro em cinza).....20

**Figura 4.** Estrutura tridimensional dos peptídeos utilizados nas simulações. Os resíduos estão coloridos de acordo com a polaridade e natureza química: Azul: carregado positivamente; Verde: polares; Brancos: hidrofóbicos; Amarelo: ligação dissulfeto. Note a estrutura cíclica em forma de um anel de ambos os peptídeos. A: peptídeo hidrofílico e carregado, Pep-1. B: peptídeo hidrofóbico, Pep-2.....24

**Figura 5:** Cella de simulação. Representação bidimensional da cela de simulação em condições periódicas de contorno. Nesta representação, quando uma molécula  $i$  avança os limites da cela central (a) suas imagens no espaço periódico se movimentam de maneira similar. A região delimitada entre as celas e, f, a e d, ilustra a aproximação da imagem mínima.....30

**Figura 6:** Interações intermoleculares são truncadas considerando-se uma distância ou *cut-off*. Uma distância arbitrária correspondendo ao raio de uma esfera ( $R_{cut}$ ) é considerada para truncar as interações da partícula  $i$  com partículas vizinhas na aproximação da imagem mínima. Uma esfera de raio ( $R_{pair}$ ) maior que  $R_{cut}$  também é considerada para construir uma lista de partículas vizinhas a  $i$ . Esta lista é atualizada periodicamente durante a simulação.....31

**Figura 7.** Figura 7: Ilustração dos vários termos considerados na função empírica de energia potencial. As contribuições **a-j** representam os movimentos torsionais do campo de força, dentre as quais, as representações **d-j** correspondem aos termos cruzados. Na letra **k**, as interações de van der Waals e as eletrostáticas são ilustradas para átomos não ligados quimicamente e as interações intra e intermoleculares são mostradas (Retirado da Tese de Treptow W, 2003).....**34**

**Figura 8.** Figura 8. Estrutura geral de um fosfolipídio. (A) Representação esquemática das regiões da molécula por polaridade. (B) Representação do lipídio onde os átomos de hidrogênio (branco), carbono (verde), oxigênio (vermelho), nitrogênio (azul) e fósforo (violeta) estão evidenciados. Em caixa estão os grupos químicos constituintes do fosfolipídio. O conjunto Colina + Fosfatidil é conhecido como cabeça polar.....**46**

**Figura 9.** Figura 9. Esquerda: Potencial de Força Média para a inserção do Pep-1 calculado por dinâmica molecular via NAMD com método *ABF* implementado. Direita: Número de pontos (*full samples*, vide metodologia) para estimativa da força média ao longo da coordenada de reação. Note que, mesmo suficientemente amostrada ( $\approx 7,5 \times 10^5$  pontos), não há a convergência do PMF para um mínimo de adsorção do Pep-1 na região referente à interface água/cabeça polar (-30 Å a -20 Å da coordenada de reação). Os gráficos foram construídos utilizando-se o programa Grace (vide metodologia 4.2.2.3).....**47**

**Figura 10.** Simulação de um sistema de bicamada lipídica em um regime *NPT* ( $n^\circ$  de partículas, pressão e temperatura constantes). Esquerda: Propriedades macroscópicas do sistema; variação total da energia (verde), pressão (azul) e temperatura (vermelho). A linha tracejada indica o valor médio dessas grandezas. Direita: representação atomística da bicamada lipídica, reproduzindo as condições periódicas de contorno (sigla em inglês *PBC*) usadas na simulação. O retângulo ao centro indica os limites da cela de simulação. Os *plots* foram construídos utilizando-se o programa Grace e a imagem da membrana com o VMD (vide metodologia 4.2.2.3).....**50**

**Figura 11.** Característica microscópica da membrana após relaxamento de 20ns.  
 A: Eixo transmembrana (*Z*) VS distribuição da densidade eletrônica ( $\rho$ ) para cada região da membrana. A coloração empregada no painel A está em conformidade com os grupos evidenciados no painel B. Notar a depressão de ( $\rho$ ) nas caudas hidrofóbicas do lipídio e os picos nas regiões de interface. B: Representação dos átomos constituintes do sistema evidenciados por cores: Vermelho = moléculas de água (bastão) e oxigênios do grupamento Fosfatidil (esferas *VW*); Azul escuro = nitrogênio do grupamento Colina (esferas *VW*); Amarelo = fósforo do grupo Fosfatidil (esferas *VW*); Azul piscina = cadeias alifáticas dos fosfolipídios (bastão). C: Área por fosfolipídio calculada teoricamente. Linha tracejada em vermelho indica a convergência para um valor  $\approx 53 \text{ \AA}^2$ . Os gráficos foram construídos utilizando-se o programa Grace e a imagem da membrana com o VMD (vide metodologia 4.2.2.3).....**52**

**Figura 12.** Estratégia para investigar a inserção dos peptídeos. Para cada peptídeo, quatro simulações independentes foram realizadas com a molécula inicialmente posicionada nas regiões (1) à (4) do sistema.....53

**Figura 13.** Painéis superiores: Estados resultantes das 4 simulações independentes do Pep-1, referente à posição relativa do peptídeo na direção do eixo transmembrânico *z*, ao término de 100ns de simulação. Todas as trajetórias atingiram estados metaestáveis durante os 50ns finais de simulação (retângulos tracejados e com o estado *z* em negrito). Painéis inferiores: O peptídeo, a água, e os grupos constituintes da membrana estão representados por cores (esferas *VW*): Amarelo = Pep-1; Azul = água; Violeta = Cabeça Polar; Laranja = Glicerol; Cinza = Caudas Hidrofóbicas. **1:** Simulação em que o peptídeo parte da água e se adsorve na interface água/cabeça polar (*A/CP*). **2:** Peptídeo posicionado inicialmente na região das águas e Cabeças Polares, e se adsorvendo posteriormente à interface cabeça polar/cauda hidrofóbica (*CP/CH*); **3:** Peptídeo partindo da interface *CP/CH* e permanecendo estável nessa região. **4:** Peptídeo inicialmente posicionado no centro hidrofóbico da membrana e atingindo a interface *CP/CH*. A caixa de simulação está representada como um retângulo no centro da figura. A estrutura lamelar do sistema é mantida pelo *PBC*. Os *plots* foram construídos com o programa Grace e as figuras com o VMD (vide metodologia 4.2.2.3).....54

**Figura 14.** Painéis superiores: Estados resultantes das 4 simulações independentes do Pep-2, referente à posição relativa do peptídeo na direção do eixo transmembrânico *z*, ao término de 100ns de simulação. Todas as trajetórias atingiram estados metaestáveis durante os 50ns finais de simulação (retângulos tracejados e com o estado *z* em negrito). Painéis inferiores: O peptídeo, a água, e os grupos constituintes da membrana estão representados por cores (esferas *VW*): Amarelo = Pep-2; Azul = água; Violeta = Cabeça Polar; Laranja = Glicerol; Cinza = Caudas Hidrofóbicas. **1:** Simulação em que o peptídeo parte da água e se adsorve na interface água/cabeça polar (*A/CP*). **2:** Peptídeo posicionado inicialmente na região das águas e Cabeças Polares, e se adsorvendo posteriormente à interface cabeça polar/cauda hidrofóbica (*CP/CH*); **3:** Peptídeo partindo da interface *CP/CH* e permanecendo estável nessa região. **4:** Peptídeo inicialmente posicionado no centro hidrofóbico da membrana e atingindo a interface *CP/CH*. A caixa de simulação está representada como um retângulo no centro da figura. A estrutura lamelar do sistema é mantida pelo *PBC*. Os *plots* foram construídos com o programa Grace e as figuras com o VMD (vide metodologia 4.2.2.3).....55

**Figura 15.** Esquerda: Representação atomística geral do mínimo de energia para o Pep-2 (visão do centro da membrana para o teto polar). Os resíduos estão coloridos segundo a polaridade (esferas *VW*): Polares = Verde e azul claro; Hidrofóbicos = Brancos. A coloração das moléculas de água e dos grupos da membrana está de acordo com as barras dos histogramas do quadrante direito da figura. Direita: Número médio de ligações de hidrogênio, por resíduo dos peptídeos calculado a partir dos estados metaestáveis (50 ns finais de simulação). As barras estão coloridas de acordo com os grupos do sistema: Azul escuro =



água; Violeta = Fosfatidil; Laranja = Glicerol. Os números sublinhados à direita indicam as quatro simulações independentes (1-4) para ambos os Pep-1 e Pep-2. Imagem renderizada com o programa VMD e *plots* construídos com o Grace (vide metodologia 4.2.2.3).....56

**Figura 16.** Energia potencial ( $U$ ) do sistema em função da posição transmembrânica  $z$  dos peptídeos. O valor da coordenada  $z$  decresce da região da água ( $z = 25 \text{ \AA}$ ) para o centro da bicamada lipídica ( $z=0 \text{ \AA}$ ). As curvas são ajustes ponderados para as energias dos estados metaestáveis amostrados (quadrados). Gráficos construídos com o programa Grace (vide metodologia 4.2.2.3).....57

**Figura 17.** Ilustração da dependência do peso de Boltzmann com a energia potencial dos microestados  $U_i$  de um dado estado  $z$  do sistema. Note que, o peso de Boltzmann é significativamente maior para os microestados de mínimos de energias. Gráfico construído com o Grace (vide metodologia 4.2.2.3).....58

**Figura 18.** Análise estrutural dos peptídeos Pep-1 e Pep-2 em água. (A) Estrutura final do Pep-1 obtida após 1.5 ns de simulação. A estrutura do Pep-2 foi semelhante à observada em (A). Os aminoácidos estão coloridos pela polaridade (carregados = azul; polares = verde; apolares = branco) e as moléculas de água representadas em vermelho. (B) e (C) RMSD para os Pep-1 e Pep-2, respectivamente. Note que a estrutura dos peptídeos, em forma de anel, é estabilizada ao longo da simulação pela ligação dissulfeto entre as Cisteínas 1 e 9. A imagem do peptídeo foi renderizada com o programa VMD, e os gráficos construídos com o Grace (vide metodologia 4.2.2.3).....61

**Figura 19.** Perfil de energia livre para o processo de inserção de ambos os peptídeos em um modelo de bicamada lipídica neutra (POPC). A energia livre foi calculada segundo a equação 22, utilizando as curvas de energia potencial ajustadas na figura 16. Note que para o Pep-1 a barreira de energia para cruzar a interface polar da membrana é consideravelmente maior em relação ao Pep-2 (linhas tracejadas em vermelho). Os gráficos foram construídos com o programa Grace (vide metodologia 4.2.2.3).....62

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. INSERÇÃO DE PEPTÍDEOS NA MEMBRANA CELULAR

### 1.1.1. ASPECTOS GERAIS E IMPORTÂNCIA

A inserção de peptídeos na membrana plasmática (Figura 1) está envolvida em reações bioquímicas essenciais para o funcionamento celular (Nelson e Cox, 2002). Doenças em humanos, além de uma grande variedade de processos de interesse farmacológico como a ação de toxinas, atividade microbiana, e infecção viral (Bachar *et al*, 2000; Adams 2004; Leontiadou *et al*, 2006; Yeh *et al*, 2008), estão relacionados à inserção de peptídeos na membrana.

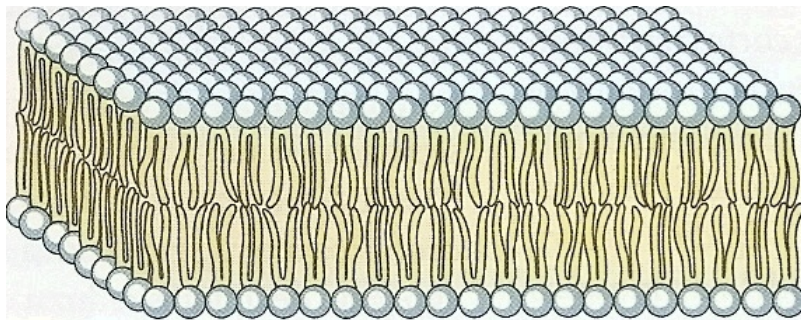


Figura 1. Modelo simplificado de uma membrana em formato de bicamada lipídica. As esferas em cinza representam os grupos carregados, enquanto que os bastões em amarelo representam o núcleo hidrofóbico. (Modificada de Lehninger Princípios de Bioquímica, pág 304).

Sabe-se que algumas placas peptídicas  $\beta$ -amilóides, características da doença de Alzheimer, ao se intercalarem na membrana, são capazes de modular o transporte transmembrânico de íons por alterar a capacitância e a heterogeneidade dos fosfolípidios locais, modificando o ambiente físico-químico de interações entre proteínas e membrana o que pode gerar um quadro clínico grave (Valincius *et al*, 2008). Essas placas peptídicas afetam diferentes tecidos e esses oligômeros podem se translocar mais facilmente através da membrana,

apesar de ainda não se saber corretamente qual o mecanismo dessa interação no nível molecular e conseqüentemente todas as implicações fisiológicas oriundas desse fenômeno.

Além disso, há atualmente um grande interesse no desenho racional de peptídeos sintéticos, capazes de transpassar a barreira lipídica, que atuem na prevenção e tratamento de várias doenças como: degeneração macular, proteção de fotorreceptores da retina, neurite ótica, inibição da angiogênese, ação direta em alguns tipos de tumores (mama, próstata, melanoma, pulmão, rim e trato intestinal), diminuição da migração de células metastáticas, prevenção e controle de tumores secundários, dano na medula espinhal e algumas doenças neurodegenerativas como Doença de Alzheimer, Mal de Parkinson, esclerose múltipla entre outras (Mckerracher e Munzer, 2008).

A interação entre peptídeos e membrana celular é, portanto, um dos principais temas de estudo da biofísica estrutural, com grande impacto científico e tecnológico. O entendimento desses processos, no nível atômico, promoverá avanços em diferentes setores da ciência fundamental e aplicada, permitindo especialmente a busca por novos fármacos ou produtos biotecnológicos fundamentais para uso terapêutico na medicina e na farmacologia.

#### 1.1.2.1. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO PROCESSO DE INSERÇÃO DE PEPTÍDEOS EM MEMBRANAS

Considerando um sistema molecular composto de peptídeos, água e membrana lipídica, a completa caracterização da inserção peptídica pela membrana requer elucidar aspectos estruturais do sistema em seus diversos estados microscópicos, visando quantificar a estabilidade energética dos mesmos no nível das interações atômicas. A estabilidade energética refere-se aqui à energia livre de diferentes estados do sistema e de seus processos de reação.

Nos últimos anos houve uma considerável aquisição de conhecimento em termos de metodologia para se acessar estruturas de proteínas e peptídeos interagindo com membranas. Alguns métodos experimentais contribuíram com

estruturas de adsorção e inserção de peptídeos de diversas naturezas químicas e estruturais (Sanderson 2004). Algumas dessas metodologias são amplamente utilizadas na atual biofísica estrutural, em particular para o estudo das interações de peptídeos e membranas, tais como: microscopia de força atômica (sigla em inglês *AFM*), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), dicroísmo circular, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (sigla em inglês *FTIR*), fluorescência estática e fluorescência resolvida no tempo, ressonância plasmônica de superfície, do inglês *SPR* (Arrondo e Goni, 1999; Ladokhin, 1999; Wimley e White, 1999; Vogt *et al*, 2000; Rusu *et al*, 2004; Ruan *et al*, 2004; Seelig, 2004; Sanderson, 2004; Lakowicz, 2006; Shintou *et al*, 2007; Bürck *et al*, 2008; Cheng *et al*, 2009). Dentre todas essas técnicas mencionadas as que mais se destacam para caracterizar e quantificar a interação entre peptídeos e membranas são *AFM*, fluorescência e *RMN*. A primeira é capaz de gerar imagens com resolução de até 5Å, permitindo a observação de mudanças na topologia e no volume de vesículas lipídicas devido à ação de uma solução de peptídeos de interesse, além de poder quantificar a intensidade da força que a macromolécula protéica exerce sobre a membrana (Frederix *et al*, 2003). A técnica de fluorescência, principalmente a espectroscopia de Fluorescência por transferência de Energia Ressonante (FRET, do inglês *Fluorescence Resonance Energy Transfer*), é utilizada para determinação da distância de inclusão ou enterramento, em angstroms, dos peptídeos fluorescentes em relação ao centro da bicamada das vesículas assimétricas. O fenômeno de FRET descreve o mecanismo de transferência de energia entre dois cromóforos. Um dado cromóforo doador no seu estado excitado pode transferir parte de sua energia por uma maneira não radioativa pelo mecanismo de acoplamento de dipolos com seu cromóforo aceptor, quando suficientemente próximos (distância entre 10 nm a 50 nm). Devido a uma relação intrínseca entre a eficiência dessa transferência de energia e o apagamento de fluorescência do cromóforo doador pode-se calcular a distância entre os cromóforos (Raio de Förster,  $R_0$ ). Com esses dados é possível determinar a topologia de sondas fluorescentes particionada na membrana.

A RMN pode ser utilizada para a elucidação da estrutura tridimensional de um peptídeo em solução, que é uma vantagem sobre a cristalografia de raios-X, onde a estrutura é determinada a partir de um cristal. Além disso, a técnica de

RMN pode gerar dados sobre a orientação de peptídeos em relação ao eixo normal, isto é, a direção transmembrânica de membranas possibilitando avaliar a influência de diferentes configurações do lipídio e da molécula protéica no processo geral de inserção e permeação pela bicamada (Sanderson, 2004).

Recentemente Nanga e colaboradores, em 2008, resolveram por RMN a estrutura de dois peptídeos amilóides, alfa helicoidais de 19 resíduos de extensão, hIAPP (humano) e IAPP de camundongo, em que a forma humana do peptídeo é relacionada à formação de agregados em placas o que leva à morte das células  $\beta$  do pâncreas causando a doença humana, diabetes tipo II. Pelo estudo pode-se concluir que a forma IAPP do camundongo diferia em apenas um único resíduo da hIAPP e que essa pequena mutação na seqüência primária resultava em um menor toxicidade dos peptídeos. Para mimetizar o efeito de ataque à membrana celular bem como mapear a diferença da conformação e orientação dos peptídeos em relação à interface lipídica, os experimentos foram realizados em micelas de dodecilmfosfolina (sigla em inglês *DPC*). A acidificação do meio disparava a mudança de orientação do peptídeo hIAPP da forma adsorvida na interface da micela para a direção transmembrânica, enquanto o mesmo não foi observado para o IAPP. Essa característica de reorientação está relacionada à toxicidade do peptídeo amilóide humano.

Outro estudo de RMN mostrou uma maior estruturação de um peptídeo helicoidal com mutação de leucina para fenilalanina, quando inserido no núcleo hidrofóbico de uma membrana de DMPC (1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfolina). Nesse caso, o aumento das interações hidrofóbicas para resíduos apolares quando inseridos na região de caudas hidrofóbicas é crucial para a inserção de peptídeos em membranas (Mishra *et al*, 2008).

O decapeptídeo gramicidina S, que é uma folha  $\beta$  simétrica que notadamente se ancora paralelo ao teto polar da membrana para baixas razões molar peptídeo/ lipídio, é um antibiótico em potencial que vem sendo estudado nos últimos anos (Afonin *et al*, 2008). A partir de estudos de RNM foi comprovado que a gramicidina S pode adotar um alinhamento transmembrânico para altas concentrações de peptídeo, estabilizado por ligações hidrogênio, o que reforça a idéia de que o efeito cooperativo de peptídeos contribui para maior taxa de inserção e partição dessas moléculas pela membrana plasmática (Leontiadou *et al*, 2006; Babakhani *et al*, 2008).

Entretanto, apesar dos últimos avanços obtidos pela metodologia experimental, ainda assim, somente um número limitado de estruturas de proteínas que interagem com membranas foi determinado experimentalmente (White, 2004). Há na atualidade somente 0,7% de estruturas de proteínas de membranas resolvidas em relação às estruturas de proteínas solúveis. Esse dado reforça claramente o grande desafio da biofísica estrutural na atualidade nessa linha de pesquisa (Kandt *et al*, 2007). Outro ponto de fundamental importância, que torna esse campo de estudo de interações moleculares entre peptídeos e membranas ainda mais desafiador, é a caracterização experimental e a quantificação de parâmetros estruturais dos estados físicos de membranas, tanto na fase gel como líquida. Além disso, membranas celulares são estruturas bastante heterogêneas e complexas em sua constituição, seja na variedade de fosfolipídios ou na quantidade de outras moléculas biológicas aderidas a ela (Sanderson, 2004). O tamanho da cadeia alifática e a presença de colesterol favorecem a estabilidade da membrana, i.e, altera a fluidez do sistema e, portanto, a dinâmica e a energética da interação de proteínas e peptídeos com os fosfolipídios. Outra característica peculiar das membranas é a natureza anfipática da região de interface entre os grupos polares e as caudas hidrofóbicas. Essa região é favorável à hidratação e, portanto, serve como ponto de ancoragem para moléculas de interesse com potencial para particionar nessa interface.

Neste ambiente é que muitas das questões levantadas atualmente por experimentalistas não podem ser respondidas estruturalmente do ponto de vista atômico. Até então, a dinâmica molecular (DM) é o único método que permite estudar além da estrutura, a dinâmica de sistemas moleculares em escala atômica/molecular. Esse método teórico tem sido aplicado com sucesso para o estudo de sistemas macromoleculares complexos como proteínas, DNA, RNA e membranas fosfolipídicas (Treptow *et al*, 2006; Pei *et al*, 2008). Alguns trabalhos já caracterizaram a interação atomística de diferentes peptídeos, isto é, de natureza estrutural e eletrostática distintas, com bicamadas lipídicas (Bernèche *et al*, 1998; Mihailescu *et al*, 2000; Lee *et al*, 2005; Lensink *et al*, 2005; Ym *et al*, 2005). Nesta linha já se tem trabalhos que simulam diferentes modelos de membrana com distintas constituições fosfolipídicas (Im *et al*, 2005 e Lopez *et al*, 2006).

Há notadamente uma maior quantidade de trabalhos experimentais e teóricos que buscam elucidar via caracterização estrutural os possíveis mecanismos de interação de peptídeos com formato helicoidal em bicamadas lipídicas. A importância desses estudos deve-se principalmente ao fato dessa estrutura secundária estar relacionada à função antibacteriana e à inserção de capsídeos virais em células hospedeiras. Algumas sequências de peptídeos chamadas de CPP (do inglês *cell penetrating peptides*) que apresentam domínios de transdução peptídica (sigla em Inglês PTD), notadamente conseguem se translocar pela membrana das células, tanto *in vitro* como *in vivo*, devido ao alto conteúdo de resíduos carregados positivamente como Arginina e Lisina (Lindsay *et al*, 2002). Essa propriedade torna esse grupo específico de moléculas alvo de vários estudos visando a caracterização de um mecanismo de ação em membranas, principalmente aquelas com característica negativa, como é o caso do revestimento celular das bactérias.

Há basicamente 3 modelos gerais para o mecanismo de formação de poros em modelos de membrana para células procarióticas em função da ação de peptídeos antimicrobianos (Sanderson, 2004): o modelo carpete que preconiza que os peptídeos positivos se aderem paralelamente à lamela externa da bicamada causando uma desorganização nos fosfolípidios, produzindo sensível curvatura na membrana o que leva à sua perturbação; o modelo de formação dos poros toroidais em que há claramente a formação de um poro com características diferentes de canais convencionais, formados por longas hélices transmembrana. Nesse caso, ocorre um efeito cooperativo entre as moléculas protéicas de forma que a cada peptídeo que se adere e posteriormente se insere na membrana torna-se mais fácil acessar o centro hidrofóbico da membrana. Há relatos de que esses poros causem um influxo de uma quantidade de água para o interior da célula da ordem do que ocorre pelo mecanismo das aquaporinas (Leontiadou *et al*, 2006); finalmente há o modelo de formação de poro em barril em que os peptídeos que se inserem no cerne hidrofóbico começam a agregar lateralmente um no outro formando uma passagem através da membrana.

Em trabalho publicado recentemente por Afonin e colaboradores, 2008, foi mostrado que o alinhamento de um peptídeo antimicrobiano  $\alpha$ -helicoidal PGLa, ao longo do plano paralelo à membrana, depende acentuadamente da temperatura e do estado de fluidez do lipídio e da concentração do peptídeo.

Este, por sua vez, pode adotar três estados dependentes da temperatura que são: Estado-S, paralelo à superfície da membrana, Estado-T, que é inserido obliquamente, e Estado-I, inserido perpendicular ao plano da superfície da membrana (figura 2).

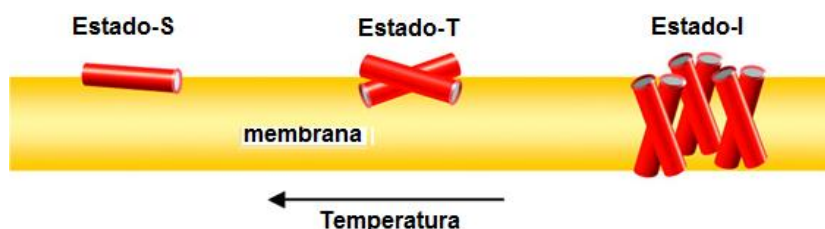


Figura 2. Modelo para três mecanismos de inserção de peptídeos antimicrobianos  $\alpha$ -helicoidais em função da temperatura. Peptídeos que seguem esse modelo de inserção adotam o estado “I” quando os fosfolípidios estão abaixo da temperatura de transição. O estado “T” é atingido para a fase líquida-cristalina da membrana enquanto que o estado “S” é característico de elevadas temperaturas (Adaptado de Afonin *et al*, 2008; DOI: 10.1021/ja803156d).

O modelo de agregação no estado “I”, formando um poro ou canal, está de acordo com a idéia de auto-associação de peptídeos helicoidais quando inseridos no cerne hidrofóbico da membrana, o que já foi mostrado como energeticamente favorável por Babakhani *et al*, 2008.

Basicamente há duas vertentes atuais de simulação por DM que abordam o mecanismo de inserção e transporte de peptídeos, para o caso helicoidal. Na primeira delas o sistema parte de uma molécula não estruturada, posicionada no solvente, para uma forma em hélice na região de interface. Essa etapa de estruturação evitaria o alto custo energético necessário para solvatar a estrutura e favorecer as ligações hidrogênio intrínsecas da cadeia principal. A outra vertente suporta que o peptídeo formará uma hélice somente quando estiver enterrado no centro hidrofóbico da membrana. Esse último argumento é fundamentado por resultados de simulações (Sugita *et al*, 1999 e Neymeier *et al*, 2005), não sendo observado o dobramento em hélices dos peptídeos nas regiões de interface.

Entretanto, novos experimentos mostram que pode ainda haver mais mecanismos ou mesmo etapas ainda não completamente entendidas de como ocorre a partição dessas macromoléculas protéicas ao longo da cadeia lipídica



(Yeh *et al*, 2008). Outro ponto importante é que existem diversas outras conformações de peptídeos que também apresentam a propriedade de se translocar pela membrana, além de características físico-químicas diferentes das moléculas anfipáticas, como é o caso de peptídeos hidrofóbicos (Babakhani *et al*, 2008). Em ambos os casos, o comportamento dos peptídeos ao longo do processo de inserção parece depender diretamente da sequência de aminoácidos. Dessa forma, para se elaborar e propor um mecanismo geral de transporte não assistido de peptídeos, é necessário analisar como peptídeos de diferentes conformações, carregados ou neutros, se adsorvem, particionam e efetivamente atravessam diferentes modelos de membranas.

### 1.1.3 ENERGÉTICA DA INTERAÇÃO PEPTÍDEO E MEMBRANA

Conhecendo-se as posições atômicas do sistema em seus diferentes estados microscópicos, a energia associada a cada um desses estados pode ser quantificada, permitindo reconstruir o potencial de força média (PMF). O PMF é um perfil de energia livre parametrizado por uma coordenada geral de reação (CR), figura 3. Essa coordenada corresponde a um parâmetro interno ao sistema utilizado para descrever os estados do mesmo durante o processo de interesse. Para o caso da inserção peptídica pela membrana, a coordenada de reação é simplesmente a posição relativa da molécula na direção transmembrânica.

A partir do PMF, podemos quantificar as grandezas cinéticas e termodinâmicas envolvidas na transformação do sistema. A primeira está envolvida com a altura das barreiras de ativação, que gera informação sobre as taxas cinéticas para inserção e permeação de moléculas pela membrana. Já a grandeza termodinâmica está relacionada com os mínimos de energia da função e, portanto, às regiões de maior estabilidade do sistema. Sendo assim, a partir dessas grandezas pode-se derivar uma série de propriedades importantes para caracterização do sistema em estudo como constantes de adsorção e ligação, além da taxa de difusão, ou solubilidade.

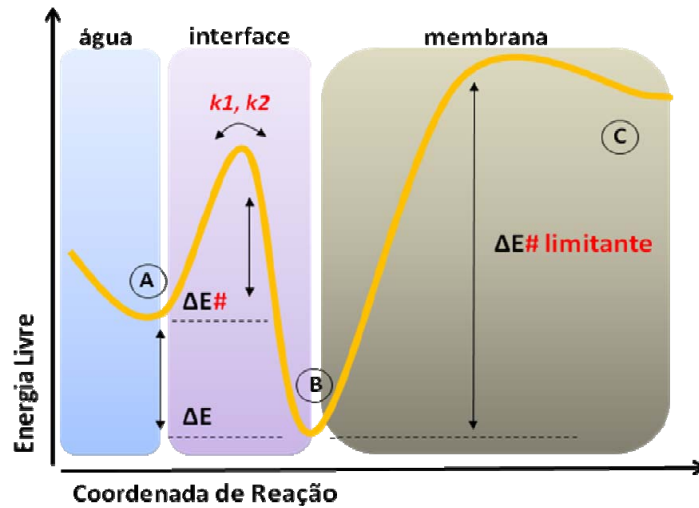
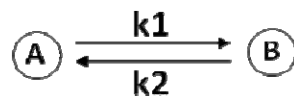


Figura 3. Perfil hipotético da variação de energia livre para a inserção de peptídeos na membrana. A curva está dividida em 4 regiões: (i) região de mínimo local de energia referente à adsorção do peptídeo em água (azul); (ii) barreira de energia na região de interface (violeta); (iii) mínimo global de energia, i.e, região preferencial de interação entre o peptídeo e a membrana; (iv) barreira de energia limitante para a permeação da molécula protéica até o centro das caudas hidrofóbicas (quadro em cinza).

Sabe-se que a altura da barreira de energia livre ( $\Delta E$ ) entre dois estados quaisquer (A e B) é proporcional às constantes de velocidades ( $k_1$ ,  $k_2$ ) da reação:



Da relação entre  $k_1$  e  $k_2$ , podemos definir uma constante de equilíbrio  $Keq \equiv k_1 / k_2$  para quantificar a diferença de energia livre entre os estados A e B:

$$\Delta E = -RT \ln(Keq) \quad (1)$$

Em um processo onde  $k_1 > k_2$ , a variação  $\Delta E = E(A) - E(B)$  é negativa, implicando no deslocamento do equilíbrio da

reação no sentido de formação do estado B. Nesse caso, dizemos que o estado B é relativamente mais estável que o estado A. Note que, de forma geral, a equação (1) é obtida a partir da profundidade dos mínimos de energia no PMF, permitindo quantificar a estabilidade energética de um estado qualquer ao longo da coordenada de reação.

Vale ressaltar que o PMF nos permite não apenas localizar as barreiras de energia ao longo da coordenada de reação, mas igualmente determinar a transformação limitante (C), isto é, a mais lenta, para o caso de processos reativos envolvendo transições múltiplas. Para a inserção de peptídeos na membrana, espera-se que a magnitude e localização dessas barreiras de energia livre, especialmente para a barreira limitante do processo de permeação, sejam influenciadas pelas características físico-químicas da molécula permeante (hidrofilicidade, hidrofobicidade e carga elétrica) e dos fosfolipídios constituintes da membrana, i.e, a carga dos grupos polares e grau de saturação das cadeias hidrofóbicas. Além disso, espera-se uma grande dependência do PMF com outros fatores, tais como, a topologia e concentração da molécula permeante, o estado físico da membrana em fase líquida ou gel, bem como, concentração, pH e temperatura.

Experimentalmente é possível se medir parâmetros termodinâmicos ( $\Delta G$ ,  $\Delta H$  e  $\Delta S$ ) da interação proteína/membrana ou peptídeo/membrana por métodos diretos como a microcalorimetria de titulação isotérmica (sigla em inglês *ITC*), calorimetria de varredura diferencial (Kundu and Kishore, 2005) ou métodos indiretos, como a determinação das constantes aparentes de equilíbrio de um estado não ligado para o estado ligado, utilizando métodos espectroscópicos, como a fluorescência, dicroísmo circular e espalhamento de luz dinâmico (White e Wimley, 1998; Bong *et al*, 2000; Zhelev *et al*, 2001; McGregor *et al*, 2003). O método direto ITC tem sido o mais utilizado experimentalmente para o cálculo desses parâmetros termodinâmicos. Além disso, essa técnica permite quantificar a influência da hidratação dos grupos polares dos fosfolipídios e da molécula protéica, o que possibilita o entendimento geral sobre a energética do processo (Sanderson, 2004).

Em 2008, Andrushchenko e colaboradores, investigaram a termodinâmica da interação entre 5 peptídeos antimicrobianos da família das catelicidinas com diferentes modelos de membranas. Para isso construíram dois grupos de

lipossomos LUVs (sigla em inglês *Large Unilamellar Vesicles*) sendo um tipo de vesícula com características de membrana de bactérias, isto é, carga residual negativa e o outro semelhante ao de eucariotos cujas membranas são neutras (McElhaney, 1986). Além disso, nesse trabalho foi calculada a energia de interação entre os peptídeos antimicrobianos com extrato real de membrana de *E. coli*, pela primeira vez até então descrita na literatura (Andrushchenko *et al*, 2008).

Já o Potencial de Força Média, PMF, pode ser rigorosamente calculado por métodos avançados de dinâmica molecular para cálculos de energia livre como o *Umbrella Sampling* (Torrie *et al*, 1974 e 1977) e o *Adaptive Biasing Force* (Hénin *et al*, 2004). A precisão para o cálculo da energia livre segundo esses métodos teóricos é extremamente significativa, quando comparada aos métodos experimentais. O método de ITC permite quantificar somente a variação total de energia de ligação de um peptídeo à membrana ( $\Delta E$  da Figura 2), não sendo possível conhecer precisamente a localização das barreiras de energia ao longo de uma coordenada de reação. Essa elevada resolução espacial do perfil de energia livre proporcionada pelo método teórico é capaz de descrever a variação de energia livre para cada incremento da coordenada de reação, ou deslocamento da molécula ao longo do eixo transmembrânico, do processo de interesse. Entretanto, para o caso do transporte peptídico através de uma membrana de qualquer composição lipídica, o cálculo do PMF não é uma tarefa trivial. Sob o ponto de vista teórico, a principal limitação é o elevado custo computacional em termos de tempo de simulação necessário para a completa amostragem estatística dos diferentes estados microscópicos do sistema, o que demanda a criação de estratégias de simulação, nos dias atuais, para se estudar o mecanismo de inserção peptídica.

#### 1.1.4. FRONTEIRA DO CONHECIMENTO

Informações estruturais e energéticas sobre o modo de inserção de peptídeos na membrana são raras na literatura. Até o momento, de acordo com as fontes utilizadas para pesquisa em bancos de dados pertinentes aos trabalhos científicos dessa natureza, somente três publicações com a descrição

do perfil de energia livre do processo de adsorção de peptídeos em membranas foram encontradas (Babakhani *et al*, 2008; Vivcharuk *et al*, 2008; Yeh *et al*, 2008).

Vivcharuk e colaboradores, 2008, calcularam o PMF para a interação, restrito somente adsorção do peptídeo sem penetração na membrana, de um peptídeo catiônico com propriedades antimicrobianas, derivado de lactoferrina bovina com uma bicamada lipídica de POPC. O processo de adsorção desse peptídeo é espontâneo, indicado pelo valor estimado para a energia livre desse processo de -1,05 kcal/mol. Yeh e colaboradores, 2008, simularam por dinâmica molecular e utilizando o método *umbrella-sampling* calcularam a distribuição de probabilidade e preferência conformacional de um peptídeo do vírus influenza na superfície, na interface e no interior de um modelo de membrana. O PMF calculado para esse processo mostrou uma barreira energética largamente entalpia para a inserção do peptídeo em conformação não helicoidal na membrana. Em contraste, o mínimo de energia global para a adsorção do peptídeo nesse modelo correspondeu à região interna da membrana, favorecida pela conformação helicoidal e pela entropia do sistema.

Babakhani e colaboradores utilizando dinâmica molecular e o método *umbrella-sampling* calcularam o PMF para a inserção de um hexapeptídeo com a membrana dimeristoilfosfatidilcolina (DMPC). Dois mínimos de energia na interface solvente cabeça polar e região hidrofóbica–hidrofílica, voltados para o glicerol, foram encontrados. A energética desse processo sugere que a agregação e a organização supramolecular desses peptídeos na membrana iniciam imediatamente quando o peptídeo faz contato com a membrana na região solvente-cabeça polar do fosfolípido.

Apesar das interações eletrostáticas entre peptídeos e membranas já terem sido estudadas, ainda pouco se sabe sobre a influência direta do conteúdo de cargas e/ou hidrofobicidade no tráfego e no modo de inserção desses peptídeos pela membrana. O transporte de peptídeos carregados e hidrofóbicos em membranas neutras é importante para estudar a influência das interações eletrostáticas na partição. Dessa forma, no presente trabalho, foi investigada a partição de duas moléculas protéicas distintas por um modelo de membrana plasmática via simulações atomísticas de Dinâmica Molecular. Cada peptídeo é composto de 9 resíduos de aminoácidos, sendo que uma molécula tem caráter

hidrofílico mais acentuado (CTKSIPPQC), com um resíduo de lisina carregado positivamente, e a outra mais hidrofóbica (CTFSIPAQC), devido aos resíduos de alanina e fenilalanina. Ambos os peptídeos aqui empregados têm aproximadamente a mesma massa molecular ( $\approx 1$  kDa), uma estrutura em forma de um anel, unido por uma ligação dissulfeto, devido às primeiras e últimas cisteínas da sequências citadas acima. Esses peptídeos descritos serão aqui nomeados como Pep-1 (carregado) e Pep-2 (hidrofóbico), figura 4.

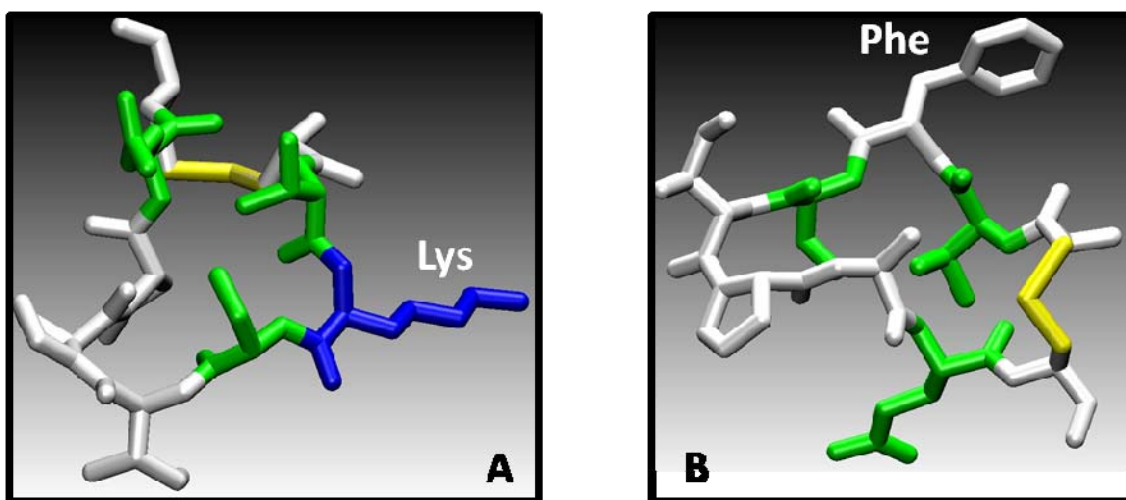


Figura 4. Estrutura tridimensional dos peptídeos utilizados nas simulações. Os resíduos estão coloridos de acordo com a polaridade e natureza química: Azul: carregado positivamente; Verde: polares; Brancos: hidrofóbicos; Amarelo: ligação dissulfeto. Note a estrutura cíclica em forma de um anel de ambos os peptídeos. A: peptídeo hidrofílico e carregado, Pep-1. B: peptídeo hidrofóbico, Pep-2.

Diante do panorama atual de poucos estudos sobre a inserção de peptídeos em membranas, o presente trabalho representa, portanto, um esforço adicional no contexto mundial da ciência para uma caracterização estrutural e energética do processo de partição de moléculas protéicas, bem como a sua dependência das propriedades físico químicas do sistema.

## 2. JUSTIFICATIVA

Interações específicas entre peptídeos e a membrana plasmática estão relacionadas a vários processos celulares, como a ação de toxinas, atividade antimicrobiana, infecção viral (Bachar *et al*, 2000; Adams 2004; Leontiadou *et al*, 2006; Yeh *et al*, 2008), além de doenças como Mal de Alzheimer (Valincius *et al*, 2008), Mal de Parkinson e Esclerose Múltipla (Patente; Mckerracher e Munzer, 2008). A maioria das interações de peptídeos e membranas tem sido descrita por métodos experimentais, resultando em parâmetros estruturais e termodinâmicos que caracterizam os estados iniciais e finais desses processos. No entanto, a caracterização dos microestados que descrevem a dinâmica dos processos de interações entre peptídeos e membranas, no nível atômico, só é possível, atualmente, com a utilização de métodos teóricos como a simulação computacional. Considerando a dificuldade do desenvolvimento desse método, pela extensão do sistema a ser simulado e o custo computacional, poucos trabalhos sobre inserção e transporte de peptídeos com estrutura diferente de hélices tem sido descritos na literatura (Khurana *et al*, 2006). Por esses motivos de modo geral, ainda pouco se sabe como as proteínas ou peptídeos interagem no nível atômico com a bicamada lipídica, e como essas moléculas protéicas podem aderir, se inserir e posteriormente serem transportadas de modo não assistido através da membrana celular (Sugita Y, *Frontiers in Biosciences*, Janeiro de 2009).

No intuito de contribuir com a caracterização e descrição do processo de inserção peptídica, no nível atômico, o objetivo do presente trabalho foi investigar o mecanismo de inserção de dois peptídeos, com características físico-químicas distintas, em um modelo de membrana do tipo bicamada de fosfatidilcolina (*POPC*), utilizando simulação computacional de dinâmica molecular. Esse método teórico é a única metodologia capaz de informar a dinâmica do processo de inserção com resolução espacial no nível atômico das interações entre peptídeos e a bicamada lipídica, além de quantificar também a energia dos vários microestados presentes ao longo do processo de inserção. Neste trabalho, os peptídeos estudados apresentam uma forma tridimensional cíclica, em forma de um anel, e são distintos quanto às características físico-

químicas, sendo um deles hidrofílico e carregado positivamente e o outro hidrofóbico. Estudos da interação de peptídeos com membranas, com as características topológicas e físico-químicas supracitadas, são atualmente escassos na literatura (Babakhani *et al*, 2008) o que torna relevante a investigação aqui proposta.

Na última década foi notório o crescimento do número de trabalhos que caracterizaram, via simulação computacional, as propriedades físicas da interação de modelos de membrana e peptídeos, na maioria deles em forma helicoidal (Bernèche *et al*, 1998; Tarek *et al*, 2003; Leontiadou *et al*, 2006 e Hénin *et al*, 2008; Lee *et al*, 2005; Lensink *et al*, 2005 e Yeh *et al*, 2008) e com atividade antimicrobiana (Leontiadou *et al*, 2006 e Babakhani *et al*, 2008). Para esses peptídeos, que notadamente são anfipáticos e apresentam um eixo de simetria bem definido (Leontiadou *et al*, 2006), o estudo de adsorção e inserção na membrana é simplificado, do ponto de vista estatístico e computacional, em relação a outras topologias mais complexas como peptídeos cíclicos e/ou loops canônicos. Nesse caso específico, peptídeos ao formarem uma hélice diminuem consideravelmente a penalidade energética relacionada com a quebra de ligações não covalentes que ocorrem na interface polar da membrana. A estrutura helicoidal tende a esconder a cadeia principal do peptídeo, minimizando assim a quantidade excessiva de interações, o que acelera o processo de partição das referidas hélices (Babakhani *et al*, 2008). Além disso, o processo de partição desses peptídeos em membranas carregadas negativamente é também facilitado pela carga positiva predominante nestes peptídeos helicoidais e antimicrobianos (Leontiadou *et al*, 2006). Devido a essas características supracitadas, a etapa de inserção dessas moléculas é rápida, durante a simulação, o que pode facilitar o estudo de um mecanismo para esse conjunto particular de moléculas. Em 2006, Rezai e colaboradores, utilizando peptídeos cíclicos e com características hidrofóbicas, com extensão de 5 a 6 resíduos de aminoácidos, demonstraram que estas características dos peptídeos poderiam estar associadas a um maior coeficiente de difusão na superfície hidrofílica das membranas, estimado *in silico*, e que as características físico-químicas distintas dessas moléculas, carregadas ou não, poderiam influenciar nas taxas de inserção e transporte, o que corrobora com o estudo aqui apresentado.



Pela metodologia teórica aqui desenvolvida, foi possível caracterizar o conjunto de microestados preferenciais para a interação entre peptídeos cíclicos e a membrana composta de fosfolipídios do tipo *POPC*, bem como localizar os mínimos de energia para o processo de inserção desses peptídeos cíclicos no sistema água e bicamada lipídica. Além disso, esse estudo possibilitou estimar, de modo semi-quantitativo, as barreiras de energia livre do processo de inserção (Figura 2 da Introdução) e caracterizar, microscopicamente, para ambos os peptídeos cíclicos, qual região da membrana está relacionada à maior estabilidade no processo de interação e qual porção da bicamada lipídica representa a barreira limitante para o processo de inserção desses peptídeos.

Em um panorama mais amplo, a caracterização da interação dos peptídeos cíclicos com a bicamada lipídica contribuirá para a compreensão, de forma geral, do modo de inserção dessas moléculas nas membranas celulares. E, finalmente, o estudo aqui desenvolvido é importante para aplicações em sistemas envolvendo interações de peptídeos, de características físico-químicas e topologias distintas, com membranas de várias composições lipídicas, que visam o desenho racional de drogas para vários tipos de doenças, como as infecções virais e bacterianas, além de doenças neurodegenerativas, relacionadas à disfunção no processo de transporte de peptídeos em membranas.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Estudar a interação de peptídeos com uma membrana de bicamada lipídica, por método teórico (simulação computacional) visando compreender como essas moléculas protéicas podem particionar na membrana.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabilizar e validar energeticamente os modelos atomísticos de membranas disponíveis no Protein Data bank (PDB).
- Simular, por dinâmica molecular, a inserção de peptídeos cíclicos hidrofóbicos e hidrofílicos, e acompanhar as trajetórias desses peptídeos posicionados inicialmente em diferentes regiões da membrana.
- Caracterizar as interações moleculares entre peptídeos e a membrana, durante o processo de inserção.
- Propor um mecanismo para inserção peptídica na membrana a partir de parâmetros termodinâmicos, como a variação da energia livre desse processo.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. ARCABOUÇO TEÓRICO

#### 4.1.1. SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR

O princípio da dinâmica molecular (DM) é particularmente simples e consiste em gerar uma trajetória para um conjunto finito de partículas, por meio da integração numérica das equações clássicas do movimento. Isto permite, portanto, determinar as propriedades dinâmicas dos sistemas considerados. Para tal tarefa vários programas encontram-se hoje disponíveis (Brooks *et al*, 1983; Lindhal *et al*, 2001 e Bhandarkar *et al*, 2002).

Trajétórias, segundo uma visão clássica, são utilizadas para a determinação de propriedades termodinâmicas e dinâmicas do sistema na forma de médias temporais. Para um sistema ergódico, médias temporais coincidem com médias termodinâmicas que podem ser descritas de acordo com a equação:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \bar{A}_t = \langle A \rangle \quad (2)$$

onde,  $A$  é qualquer propriedade observável.  $\bar{A}_t$  representa a média temporal e  $\langle A \rangle$ , a média termodinâmica.

##### 4.1.1.1. APROXIMAÇÕES E CONVENÇÕES

Os sistemas químicos são inicialmente modelados como um conjunto finito de partículas confinado em uma cela ou caixa, normalmente ortorrômbica. Entretanto, para uma melhor correlação entre as propriedades microscópicas e macroscópicas, os efeitos de contorno do sistema precisam ser eliminados.

Para isso, condições periódicas de contorno (sigla em inglês *PBC*) são utilizadas, permitindo a replicação do sistema nas três direções do espaço (Figura 5).

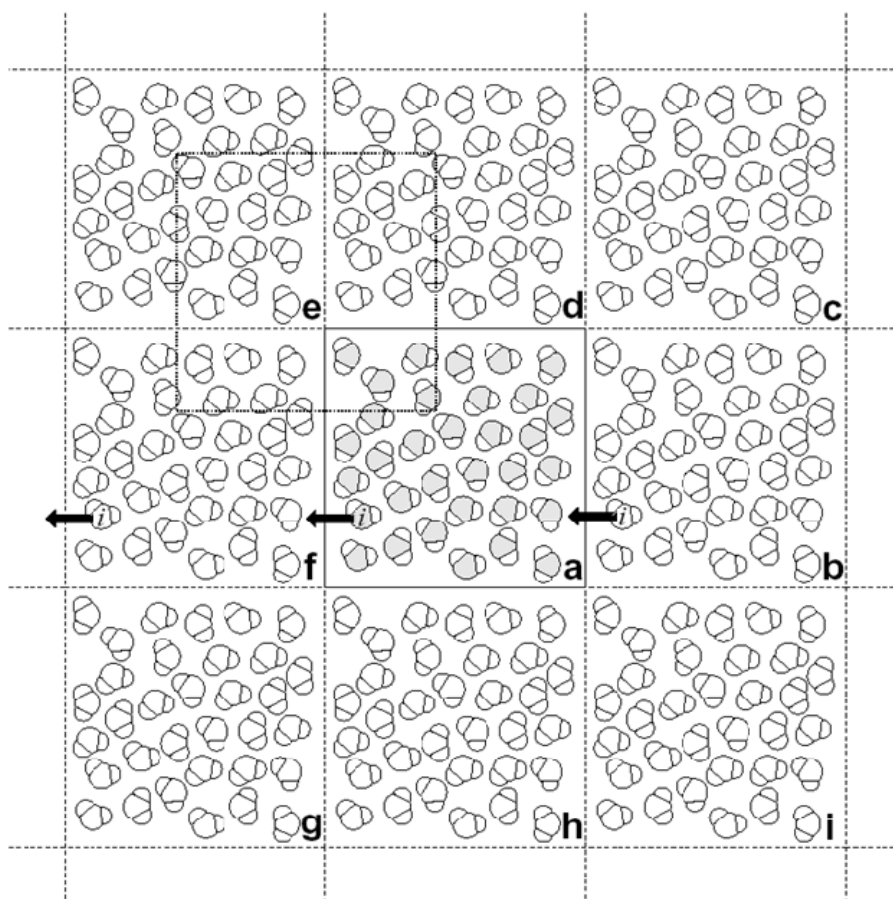


Figura 5: Cella de simulação. Representação bidimensional da cela de simulação em condições periódicas de contorno. Nesta representação, quando uma molécula  $i$  avança os limites da cela central (**a**) suas imagens no espaço periódico se movimentam de maneira similar. A região delimitada entre as celas **e**, **f**, **a** e **d**, ilustra a aproximação da imagem mínima (Retirado da Tese de Treptow W, 2003).

O caráter pseudo-infinito desta aproximação requer um tratamento especial das interações intermoleculares (Allen *et al*, 1989). Neste sentido, uma primeira aproximação, denominada de “imagem mínima”, baseia-se na suposição de que cada partícula  $i$  na cela central interage com a imagem mais próxima de todas as outras partículas  $j$ . Além disso, as interações podem ser truncadas considerando-se uma distância arbitrária ou raio de corte (sigla em inglês *cut-off*), normalmente menor ou igual à metade da menor dimensão da cela de simulação. Neste caso, interações além do *cut-off* são ignoradas (Figura 6).

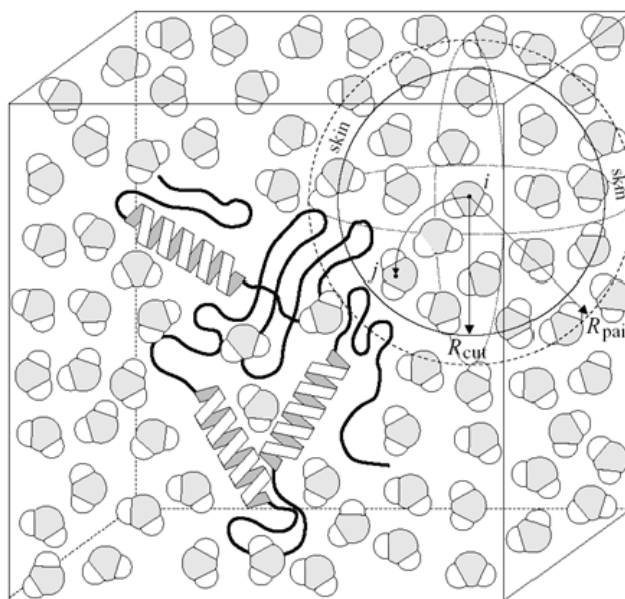


Figura 6: Interações intermoleculares são truncadas considerando-se uma distância ou *cut-off*. Uma distância arbitrária correspondendo ao raio de uma esfera ( $R_{cut}$ ) é considerada para truncar as interações da partícula  $i$  com partículas vizinhas na aproximação da imagem mínima. Uma esfera de raio ( $R_{pair}$ ) maior que  $R_{cut}$  também é considerada para construir uma lista de partículas vizinhas a  $i$ . Esta lista é atualizada periodicamente durante a simulação (Retirado da Tese de Treptow W, 2003).

#### 4.1.1.2. FUNÇÃO DE ENERGIA POTENCIAL

A energia potencial é a principal função de todo cálculo de mecânica molecular. Esta função deve ser capaz de reproduzir as interações inter e intramoleculares. Para isso, a função de energia potencial é associada a diversos parâmetros moleculares do sistema. Tais parâmetros são atualmente obtidos a partir de cálculos sofisticados de mecânica quântica, utilizando moléculas elementares como modelos de estruturas moleculares mais complexas, como exemplo os biopolímeros. Este conjunto descritivo dos sistemas moleculares (*função de energia potencial + parâmetros moleculares*) é denominado campo de força (MacKerell *et al*, 1998). Neste contexto, a função que descreve a energia potencial do sistema composto de  $N$  partículas pode ser escrito em termos de um somatório:

$$U(\mathbf{r}^N) = \sum_i v_1(\mathbf{r}_i) + \sum_i \sum_{j>i} v_2(\mathbf{r}_i, \mathbf{r}_j) + \sum_i \sum_{j>i} \sum_{k>j>i} v_3(\mathbf{r}_i, \mathbf{r}_j, \mathbf{r}_k) + \dots \quad (3)$$

onde  $v_1(\mathbf{r}_i), v_2(\mathbf{r}_i, \mathbf{r}_j), \dots$  representa o potencial intramolecular, o potencial de interação entre pares atômicos, etc.

A função  $U(\mathbf{r}^N)$  é, portanto, característica de um problema de múltiplos corpos. Em algumas aproximações, a função é considerada até o segundo termo do somatório. Neste caso, as interações entre pares atômicos e outros efeitos, por exemplo, interações intermoleculares, são tratadas em um único potencial efetivo (equação 4).

$$U(\mathbf{r}^N) \cong \sum_i v_1(\mathbf{r}_i) + \sum_i \sum_{j>i} v_2^{\text{efetivo}}(\mathbf{r}_{ij}) \quad (4)$$

Esta aproximação é usada em muitos campos de força comerciais, em particular aqueles dedicados ao estudo de sistemas macromoleculares. Entre as várias funções de energia implementadas até então, uma descrição simplificada do sistema é oferecida na função do campo de força AMBER, *Assisted Model Building with Energy Refinement* (Cornell et al, 1995), segundo a equação 5 mostrada abaixo:

$$\begin{aligned} U(\mathbf{r}) = & \sum_{\text{ligação}} k_r (r - r_o)^2 + \sum_{\text{ângulo}} k_\theta (\theta - \theta_o)^2 + \\ & + \sum_{\text{diédro}} \sum_n \frac{U_n}{2} [1 + \cos(n\varphi - \gamma)] + \\ & + \frac{1}{k_{vdW}^{1-4}} \cdot \sum_{\substack{i<j \\ \{i,j\} \in 1-4}} \left[ \left( \frac{R_{ij}^*}{r_{ij}} \right)^{12} \cdot 2 \left( \frac{R_{ij}^*}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{1}{K_{Coulomb}^{1-4}} \cdot \sum_{\substack{i<j \\ \{i,j\} \in 1-4}} \frac{q_i q_j}{4\pi \epsilon_o \epsilon_1 r_{ij}} + \quad (5) \\ & + \sum_{\substack{i<j \\ \{i,j\} > 1-4}} \left[ \left( \frac{R_{ij}^*}{r_{ij}} \right)^{12} \cdot 2 \left( \frac{R_{ij}^*}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_{\substack{i<j \\ \{i,j\} > 1-4}} \frac{q_i q_j}{4\pi \epsilon_o \epsilon_1 r_{ij}} \end{aligned}$$

onde,  $k_r$  e  $r_0$  correspondem a constante de força da ligação química e a posição de equilíbrio da mesma;  $k_\theta$  e  $\theta_0$  correspondem a constante de força do ângulo de valência e seu valor de equilíbrio;  $\frac{U_n}{2}$ ,  $n$  e  $\gamma$  são a barreira torsional, sua periodicidade e fase;  $\epsilon_1$  e  $\epsilon_0$  são as permissividades dielétrica relativa e em vácuo, respectivamente;  $q_i$  é a carga elétrica parcial originada no átomo  $i$ ; finalmente,  $R_{ij}^*$  e  $\epsilon_{ij}$  correspondem aos parâmetros de van der Waals para os pares atômicos  $\{ij\}$ , obtidos da combinação das regras de Lorentz-Berthelot (equação 6).

$$\begin{cases} \epsilon_{ij} = \sqrt{\epsilon_i \epsilon_j} \\ R_{ij}^* = R_i^* + R_j^* \end{cases} \quad (6)$$

Ambos os componentes, o eletrostático e o de van der Waals, são considerados na parametrização dos termos torsionais. Entretanto, em alguns campos de força tais componentes são distinguidos entre interações onde os átomos estão conectados exatamente por 3 ligações químicas, os chamados termos 1-4 (Figura 7). Esta distinção aparece na equação (5), onde os termos 1-4 são redimensionados pelos fatores  $\frac{1}{k_{vdW}^{1-4}}$  e  $\frac{1}{k_{Coulomb}^{1-4}}$ .

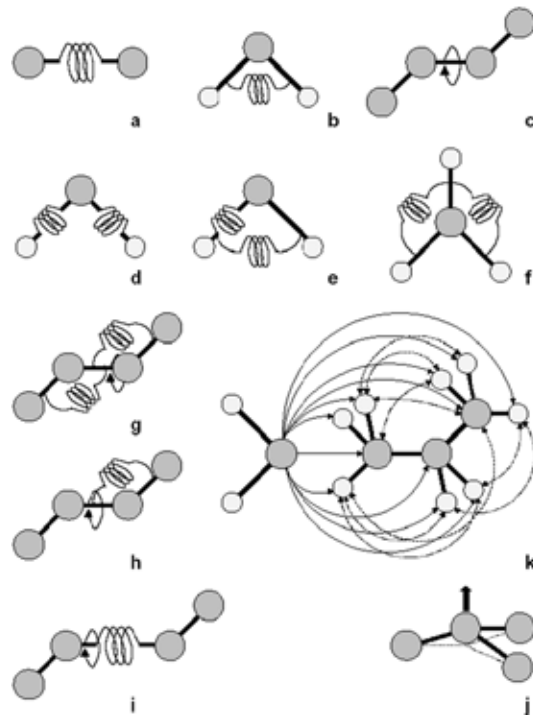


Figura 7: Ilustração dos vários termos considerados na função empírica de energia potencial. As contribuições **a-j** representam os movimentos torsionais do campo de força, dentre as quais, as representações **d-j** correspondem aos termos cruzados. Na letra **k**, as interações de van der Waals e as eletrostáticas são ilustradas para átomos não ligados quimicamente e as interações intra e intermoleculares são mostradas (Retirado da Tese de Treptow W, 2003).

#### 4.1.1.3. EQUAÇÕES DO MOVIMENTO

Na dinâmica molecular clássica (van Gunsteren *et al*, 1990), a trajetória do sistema é gerada pela integração das equações de Newton para cada partícula  $i$ :

$$\begin{cases} m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i(t)}{dt^2} = \mathbf{f}_i(t) \\ \mathbf{f}_i(t) = - \frac{\partial U(\mathbf{r}^N)}{\partial \mathbf{r}_i(t)} \end{cases} \quad (7)$$

onde,  $U(\mathbf{r}^N)$  é a energia potencial do sistema que depende apenas das coordenadas cartesianas das partículas  $\{\mathbf{r}_i\}$ . As equações (7) são integradas



numericamente utilizando-se um tempo de integração infinitesimal,  $\delta t$ , para assegurar a conservação da energia total do sistema – *viz* tipicamente da ordem de 1 a 2 fs.

Trajétórias exatas não são geradas durante longos períodos de tempo, considerando-se que as equações de Newton são resolvidas numericamente com um tempo de integração finito. A exatidão das soluções do movimento não é, entretanto, tão importante para assegurar a correta reprodução das propriedades termodinâmicas e dinâmicas do sistema. Para isso, o que realmente importa é o comportamento estatístico da trajetória. A reprodução correta das propriedades do sistema só é satisfeita se a propagação do movimento é feita por um integrador do tipo simplético (Martyna *et al*, 1996 e Tuckerman *et al*, 2000). Um propagador deste tipo conserva a métrica invariante do espaço de fase,  $\Gamma$ . Deste modo, o erro associado a este propagador é convergente:

$$\lim_{n \rightarrow \infty} \left( \frac{1}{n} \right) \sum_{k=1}^n \left| \frac{E(k\delta t) - E(0)}{E(0)} \right| \leq \varepsilon_{MD} \quad (8)$$

$n$  é o número de passos de integração durante a simulação,  $E(0) \equiv H(r^N, p^N, 0)$  é a energia inicial do sistema equilibrado,  $\varepsilon_{MD}$  é o limite superior para conservação da energia, *viz.*  $10^{-4}$ . A integração das equações de movimento não conduz, portanto, a um crescimento errático do erro associado à conservação da energia, o que, caso acontecesse, afetaria significativamente o comportamento estatístico da simulação em longos períodos de tempo.

#### 4.1.1.4. INTEGRADORES DO MOVIMENTO

Muitos métodos de integração do movimento, equação (9), têm sido desenvolvidos. O princípio de tais métodos pode ser ilustrado por dois algoritmos bastante conhecidos e utilizados até então em simulação. O primeiro deles, e talvez o mais simples, é denominado de algoritmo Verlet. Este

algoritmo baseia-se nos três termos,  $\{\mathbf{r}_i(t), \mathbf{r}_i(t - \delta t), \mathbf{a}_i(t)\}$ , onde  $\mathbf{a}_i(t) = \ddot{\mathbf{r}}_i(t) = \mathbf{f}_i(t)/m_i$  e na aceleração da partícula  $i$ . A variação da posição da partícula pode então ser escrita como:

$$\mathbf{r}_i(t + \delta t) = 2\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i(t - \delta t) + \mathbf{a}_i(t)\delta t^2 \quad (9)$$

com um erro embutido de  $O(\delta t^4)$ . Esta equação é derivada da combinação da expansão de Taylor nas posições  $t - \delta t$  e  $t + \delta t$ . Embora a velocidade seja dispensável para determinação da trajetória, ela é requerida para o cálculo da energia cinética  $K(\mathbf{p})$  e da energia total  $E = H(\mathbf{r}^N, \mathbf{p}^N)$ . Neste esquema, a velocidade é dada por:

$$\mathbf{v}_i(t) = \frac{\mathbf{r}_i(t + \delta t) - \mathbf{r}_i(t - \delta t)}{2\delta t} \quad (10)$$

com um erro associado de  $O(\delta t^2)$ .

#### 4.1.1.5. AMOSTRAGEM ESTATÍSTICA

Durante a integração dos movimentos, a energia total do sistema deve ser conservada. No caso de volume constante, uma amostragem estatística micro-canônica é gerada pela simulação. Esta amostra  $(N, V, E)$  é normalmente denominada de Newtoniana em simulações de dinâmica. Em algumas situações é desejado, entretanto, que outras quantidades termodinâmicas, tais como temperatura e pressão, sejam independentes. Dessa forma, diferentes tipos de amostras termodinâmicas podem ser produzidos em dinâmica molecular.

#### 4.1.1.6 SIMULAÇÕES À TEMPERATURA E PRESSÃO CONSTANTES

Vários métodos para simulação isotérmica têm sido propostos. No método denominado de acoplamento fraco (Berendsen *et al*, 1984), a temperatura instantânea,  $T_K(t)$  é mantida relaxada em relação a uma temperatura de referência  $T$ :

$$\frac{dT_K(t)}{dt} = \frac{T - T_K(t)}{\tau_T} \quad (11)$$

onde,  $\tau_T$  representa precisamente o tempo de relaxação associado às flutuações da temperatura. Neste caso, a energia cinética é modificada por uma quantidade  $\Delta K$ , definida como:

$$\Delta K = \frac{1}{2}(\chi^2 - 1)Nk_B T_K(t) \quad (12)$$

para um tempo de integração  $\delta t$ , onde  $\chi$  é um fator de re-escalamento das velocidades (equação 13).

$$\chi = \left[ 1 + \frac{\delta t}{\tau_T} \left( \frac{T}{T_K(t)} - 1 \right) \right]^{1/2} \quad (13)$$

Seguindo à idéia do que ocorre com o controle da temperatura o sistema também pode ser acoplado por um banho de pressão (Lindhal *et al*, 2001). O algoritmo de Berendsen recalcula as coordenadas dos vetores da caixa a cada passo de integração a partir de uma matriz  $\mu$  o que equivale a um relaxamento cinético de primeira ordem da pressão em relação a um valor referência de pressão  $P_o$ :

$$\frac{dP}{dt} = \frac{P_0 - P}{\tau_p} \quad (14)$$

e a matriz  $\mu$  é dada por:

$$\mu_{ij} = \delta_{ij} - \frac{\Delta t}{3\tau_p} \beta_{ij} \{P_{0ij} - P_{ij}(t)\} \quad (15)$$

onde  $i$  e  $j$  equivalem às dimensões cartesianas do sistema,  $P_{0ij}$  a pressão de referência e  $P_{ij}(t)$  a pressão medida a cada instante. O fator  $\beta$  corresponde à compressibilidade isotérmica do sistema. Para a água a 1atm e 300K,  $\beta = 4,6 \times 10^{-5} \text{ Bar}^{-1}$ .

#### 4.1.1.7 CÁLCULO DO PERFIL DE ENERGIA LIVRE

Pela mecânica estatística, a energia livre  $A$  (Fliesbach 2000) de um dado estado do sistema, que para o caso da inserção peptídica é descrito pela posição relativa da molécula protéica em relação ao centro na direção transmembrânica  $z$  da membrana, é dada por:

$$A(z) = A(0) - \frac{1}{\beta} \ln P(z) \quad (16)$$

onde,  $\beta = k_B T$  é o fator temperatura, definido pela constante de Boltzmann  $k_B$  e a temperatura  $T$ ,  $P(z)$  é a densidade de probabilidade canônica de se encontrar o sistema no estado  $z$  e  $A(0)$  é uma constante. A densidade de probabilidade é assim definida:

$$P(z) = \frac{\sum_i^n e^{-\beta U_i(z)}}{S} \quad (17)$$

sendo  $e^{-\beta \cdot U_i(z)}$  o peso de Boltzmann para qualquer microestado do sistema, no estado  $z$ , com energia potencial  $U_i(z)$ . A função de partição  $S$  é escrita

como a soma dos pesos de Boltzmann para todos os estados  $N$  do sistema (equação 18).

$$S = \sum_N \sum_i^n e^{-\beta U_i(N)} \quad (18)$$

Note que, as equações 16 e 17, não podem ser aplicadas na prática para a estimativa a do perfil de energia livre. Essa limitação decorre do alto custo computacional envolvido na completa amostragem da energia potencial de todos os microestados para vários estados  $z$  de um sistema.

Para sobrepor essa limitação, métodos avançados de dinâmica molecular para cálculos de energia livre como o *Umbrella Sampling* (Torrie *et al*, 1974 e 1977) e o *Adaptive Biasing Force* (Hénin *et al*, 2004) são utilizados para potencializar a capacidade de amostragem do espaço configuracional de um sistema visando a otimização e a redução do custo computacional necessário para a estimativa de  $A(z)$ .

Em particular, o método *ABF*, do inglês *Adaptive-Biasing-Force* (Hénin *et al*, 2004), determina o perfil de energia ( $A$ ) através da coordenada de reação ( $z$ ) pela seguinte integração:

$$\frac{dA(z)}{dz} = \left\langle \frac{\partial U(\mathbf{r}^N)}{\partial z} - \frac{1}{\beta} \frac{\partial \ln |J|}{\partial z} \right\rangle_z = -\langle F_z \rangle_z \quad (19)$$

onde  $-\langle F_z \rangle_z$  é a força média coletada a uma dada posição da coordenada de reação durante a simulação de dinâmica molecular. Essa equação corresponde ao conhecido esquema de integração termodinâmica:

$$\frac{dA(z)}{dz} = \left\langle \frac{\partial U(\mathbf{r}^N)}{\partial z} \right\rangle_z \quad (20)$$

contendo um termo explícito do Jacobiano,  $|J|$ , para a transformação inversa de coordenadas generalizadas para cartesianas.

Uma estimativa precisa da energia livre demanda uma amostragem uniforme através da coordenada de reação, o que é difícil de conseguir quando se tem sistemas muito complexos, por meio de simulações de dinâmica molecular. Essa limitação pode ser vencida pela utilização da metodologia ABF que aplica uma força iterativa,  $\mathbf{F}^{ABF}$ , que permite ao sistema sobrepor barreiras de energia livre durante a simulação. A estimativa utiliza uma média das forças aferidas instantaneamente:

$$\mathbf{F}^{ABF} = \nabla_{\mathbf{r}} A = -\langle F_z \rangle_z \nabla_{\mathbf{r}} z \quad (21)$$

onde,  $\nabla_{\mathbf{r}} A$  é o gradiente da estimativa mais atual da energia livre em relação às coordenadas cartesianas,  $\mathbf{r}^N$ . Enquanto a estimativa de  $\langle F_z \rangle_z$  é aperfeiçoada durante a simulação, as forças se adaptam para sobrepor exatamente a barreira de energia livre, promovendo uma amostragem uniforme ao longo da coordenada de reação via difusão do sistema em uma superfície de energia plana.

## 4.2 PROTOCOLOS DAS SIMULAÇÕES

### 4.2.1 SIMULAÇÕES UTILIZANDO NAMD

#### 4.2.1.1 SISTEMA MACROMOLECULAR

Para ambos os peptídeos Pep-1 e 2, o sistema de simulação é constituído por um peptídeo posicionado inicialmente na vizinhança de uma e um modelo de bicamada lipídica completamente hidratado. O sistema contém 9591 moléculas de água, 64 fosfolipídios do tipo 1-Palmitoil-2-Oleoil-*sn*-Glicerol-3-Fosfatidilcolina (sigla em inglês *POPC*), com um número total de átomos igual a 15198. Ambos os sistemas são considerados em um pH = 7,0. A neutralidade elétrica do sistema Pep-1 foi assegurada pela adição de um íon cloro. O modelo de membrana foi construído e equilibrado pelo Dr. Werner

Treptow, professor da Universidade de Brasília, e cedido para o estudo aqui apresentado.

#### 4.2.1.2 DINÂMICA MOLECULAR

Os sistemas foram simulados considerando condições periódicas de contorno (sigla em inglês *PBC*), aplicadas nos eixos x, y, e z, em um *ensemble* NPT (número de partículas, temperatura e pressão constantes), utilizando o programa NAMD versão 2.6 (Kalé *et al*, 1999). A temperatura do sistema foi fixada em 300 K pelo algoritmo Nosé-Hoover (Hoover, 1985). As ligações químicas entre os hidrogênios e os demais átomos do sistema foram restringidas a seu valor de equilíbrio. As interações de longo alcance (eletrostáticas) foram computadas pelo algoritmo PME, do inglês *Particle Mesh Ewald* (Essman *et al*, 1995) com *cut-off* de 1,1 nm. O passo de integração foi de 1 fs.

Os parâmetros de energia potencial, como comprimento e ângulo das ligações covalentes, ângulos diedrais (ou de torção), interações não-covalentes (*van der Waals* e eletrostáticas), além das ligações de hidrogênio, foram computadas segundo o campo de força atomístico para proteínas e lipídios CHARMM27 (MacKerell Jr, 2004). O modelo que descreve as águas é o TIP3P (Jorgensen *et al*, 1983). Foi adotada uma representação de átomos unidos para as cadeias acila dos lipídios DOPC.

As simulações foram realizadas em quatro computadores, conectados em paralelo, com processadores *AMD Duo-Core* de 3.0 GHz, arquitetura 64 *bits* e 2 GB de memória *RAM*, via acesso remoto ao cluster do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). O rendimento médio para as simulações no NAMD foi de aproximadamente 1,2 ns/dia. O tempo de simulação para o protocolo otimizado, descrito acima, foi de 137ns. O tempo total de simulação para todos os sistemas foi de 372ns.

### 4.2.1.3 PERFIL DE ENERGIA LIVRE PELO MÉTODO *ADAPTIVE BIASING FORCE (ABF)*

A metodologia *ABF* é atualmente implementada apenas para o *NAMD*. A grande vantagem de utilizá-la é que, uma vez calibradas as variáveis do programa, o sistema pode varrer automaticamente toda a coordenada de reação de interesse. Além disso, o arquivo de saída (*output*) da dinâmica informa diretamente, para cada posição da coordenada de reação, os valores da energia livre e da força média e o número de pontos amostrados. A facilidade de se obter os resultados citados permite que o usuário controle satisfatoriamente a precisão do perfil de energia livre a ser aferido, uma vez que, para um maior número de amostragens, menor é a divergência da série de força média aferida e, portanto, maior a precisão da estimativa do perfil de energia livre (vide equação 21). Outra grande vantagem do *ABF* é poder levar o sistema a regiões da coordenada de reação que estejam ainda mal estimadas. O parâmetro *moveBoundary*, introduz um potencial de energia artificial em uma dada região da coordenada de reação de modo que o sistema fica restringido a amostrar pontos da força somente nas regiões delimitadas pelo “muro” de energia. Isso possibilita que diretamente se intensifique a amostragem de regiões específicas da coordenada de reação. Os parâmetros utilizados para o cálculo do PMF foram (*inputs*): coordenada de reação = *abscissa* (distância do centro de massa dos peptídeos e a membrana na direção *z* do sistema), *xiMin* = -35 Å e *xiMax* = 0 Å (limites inferior e superior da coordenada de reação), *dxi* = 0,1 Å (janela de acumulação da força instantânea), constante de força = 100 kcal/mol. Å, *full samples* =  $1 \times 10^4$ , e *moveBoundary*, quando utilizado =  $1,25 \times 10^5$ .



## 4.2.2 SIMULAÇÕES UTILIZANDO GROMACS v.3.3.3

### 4.2.2.1 SISTEMA MACROMOLECULAR

Novamente para ambos os peptídeos, o sistema de simulação é constituído pelo peptídeo mais um modelo de bicamada lipídica completamente hidratado (2460 moléculas de água), contendo 128 moléculas de fosfolípidios, do tipo *POPC*. O número total de átomos desse sistema é igual a 14035. Essa membrana foi construída pelo Dr. Peter Tieleman da Universidade de Calgary, no Canadá, e está disponível publicamente na sua página web (<http://moose.bio.ucalgary.ca>). Um pH = 7,0 foi considerado e a neutralidade elétrica do sistema Pep-1 assegurada pela adição de um íon cloro.

Aqui, quatro sistemas independentes para cada um dos peptídeos foram construídos contendo a molécula inicialmente posicionada em diferentes regiões transmembrânicas *z*. Essas configurações iniciais do sistema foram obtidas via manipulações fora do equilíbrio, em que uma aceleração foi aplicada ao peptídeo na direção *z*, de modo a posicioná-lo em diferentes localizações da membrana. Tal procedimento foi executado com tempos muito curtos de simulação, entre 2 e 6 ps, e acelerações da molécula proteica entre valores de 4,5 a 15,0 nm/ps<sup>2</sup>. Durante a etapa de aceleração dos peptídeos, tanto os lípidios quanto as águas foram restringidos a se movimentar apenas no eixo *z*, minimizando as perturbações introduzidas artificialmente no sistema. Para retornar os sistemas ao equilíbrio, foram executados passos seqüenciais de minimização de energia por mecânica molecular (MM), com as moléculas todas livres nos três eixos, e posterior dinâmica molecular com todas as moléculas livres nos eixos *X* e *Y*, mas bloqueadas no eixo *Z*. A razão desses procedimentos foi possibilitar que, uma vez o peptídeo na posição desejável em relação à membrana, os fosfolípidios e as águas pudessem se acomodar ao redor da molécula proteica.

Cada etapa de minimização de energia por MM foi constituída de um ciclo de minimização considerando os métodos *steepest descent* (com mínimo derivativo de convergência igual a 10 kJ/mol.nm e *step size* de 0.01 nm) e gradientes conjugados (com mínimo derivativo de convergência igual a

100 kJ/mol.nm e *step size* de 0.1 nm). Ao final de cada etapa de minimização de energia, i.e *steepest descent*+gradientes conjugados, era realizada uma dinâmica molecular de apenas 100 ps para equilibrar o sistema, e subseqüentemente um grupo molecular era liberado em todos os eixos, até todo o sistema estar corretamente equilibrado e completamente livre. Um total de 15 ciclos para cada sistema foi realizado até os sistemas ficarem corretamente estruturados e prontos para as simulações de dinâmica molecular.

#### 4.2.2.2 DINÂMICA MOLECULAR

Os sistemas são simulados em um *ensemble* NPT (número de partículas, pressão e temperatura constantes) com *PBC*, utilizando o programa GROMACS versão 3.3.3 (Lindhal *et al*, 2001). O termostato que controla a temperatura é descrito pelo algoritmo Berendsen, mantendo o sistema sob um banho de temperatura igual a 305 K com constante de relaxamento de temperatura igual a 0,1 ps. O modelo de controle de pressão utilizado no sistema foi o semi-isotrópico, mantendo a pressão em torno de uma média de 1atm. O passo de integração foi de 2 fs.

Os parâmetros de energia potencial, como comprimento e ângulo das ligações covalentes, ângulos diedrais (ou de torção), interações não-covalentes (*van der Waals* e eletrostáticas), além das ligações de hidrogênio, foram computadas segundo o campo de força para proteínas e lipídios GROMOS (Berendsen *et al*, 1995). As interações eletrostáticas foram computadas pelo algoritmo PME, com *cut-off* de 1,2 nm. As águas são descritas segundo o modelo SPC, do inglês *Simple Point Charge* (Kusalik *et al*, 1994). As ligações covalentes foram restringidas ao seu valor de equilíbrio pelo potencial harmônico descrito no algoritmo LINCS, do inglês *Linear Constraint Solver* (Hess *et al*, 1984).

As simulações seguindo o protocolo acima foram realizadas em dois computadores Intel *Core 2 Duo*, 3.0 GHz, arquitetura 64 *bits* e 3 GB de memória *RAM*, cujo rendimento médio foi de aproximadamente 4,0 ns/dia. O

tempo total de simulação para todos os sistemas rodados em GROMACS foi de 900ns.

#### 4.2.2.3 CÓDIGOS IMPLEMENTADOS E PROGRAMAS UTILIZADOS

Para a construção dos sistemas e análise dos resultados foram elaborados *scripts* em Bash e Tcl/Tk, Awk e linguagem de programação C, em ambiente Linux, sistema operacional *Opensuse* 11.0. As figuras resultantes das simulações foram renderizadas pelo programa VMD (*Visual Molecular Dynamics*) versão 1.8.6. O editor de imagens utilizado foi o XnView versão 1.70. Todos os gráficos foram construídos com o programa Grace (*Graphing, Advanced Computation and Exploration of data*) versão 5.1.21.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Membranas celulares são estruturas supramoleculares que revestem as células dos organismos vivos, servindo como uma barreira natural seletiva para o tráfego de moléculas através da bicamada, cujo componente mais abundante são os fosfolipídios (Alberts *et al*, 2002). Esses lipídios são anfipáticos, ou seja, apresentam uma característica química tanto polar quanto apolar (Figura 8), o que lhes confere a propriedade de formar diversas ultraestruturas quando dissolvidos em água, que podem variar de aglomerados de moléculas, até estruturas mais organizadas como micelas e bicamadas lipídicas. Portanto, bicamadas fosfolipídicas podem ser consideradas como um bom modelo de membranas celulares para se estudar o processo de inserção peptídica.

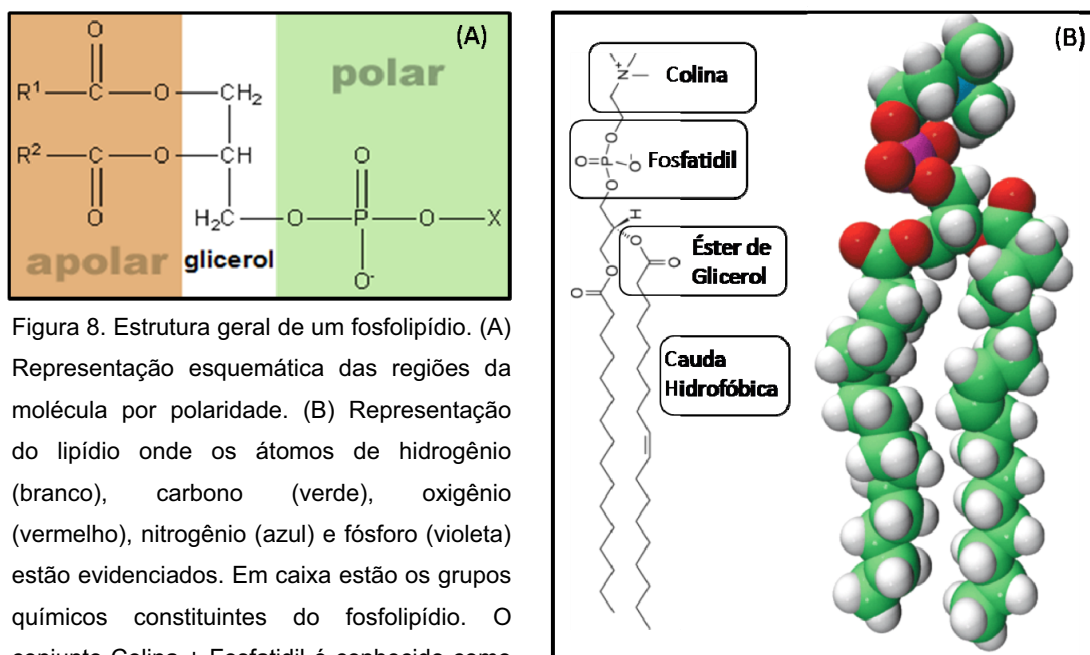


Figura 8. Estrutura geral de um fosfolipídio. (A) Representação esquemática das regiões da molécula por polaridade. (B) Representação do lipídio onde os átomos de hidrogênio (branco), carbono (verde), oxigênio (vermelho), nitrogênio (azul) e fósforo (violeta) estão evidenciados. Em caixa estão os grupos químicos constituintes do fosfolipídio. O conjunto Colina + Fosfatidil é conhecido como cabeça polar.

## 5.1 ENERGÉTICA DA INTERAÇÃO PEPTÍDEO/MEMBRANA: CAMPO DE FORÇA CHARMM E MÉTODO *ABF*

Em uma primeira tentativa de estimar o perfil de energia livre para a inserção dos peptídeos em uma bicamada lipídica e quantificar a barreira envolvida nesse processo, foi realizada uma simulação de dinâmica molecular. Nessa simulação o Pep-1 foi inicialmente posicionado na água (coordenada de reação -35 Å) e então aplicado o método *ABF* implementado no NAMD (vide metodologia 4.2.1.3). Pelo PMF assim calculado foi identificada uma barreira energética de  $\approx 15$  kcal/mol para a inserção peptídica, da água em direção ao centro da bicamada lipídica (Figura 9). Esse PMF foi obtido considerando uma amostragem de pelo menos 500 mil pontos para estimativa da força média ao longo da coordenada de reação, em um tempo total de 137ns de simulação.

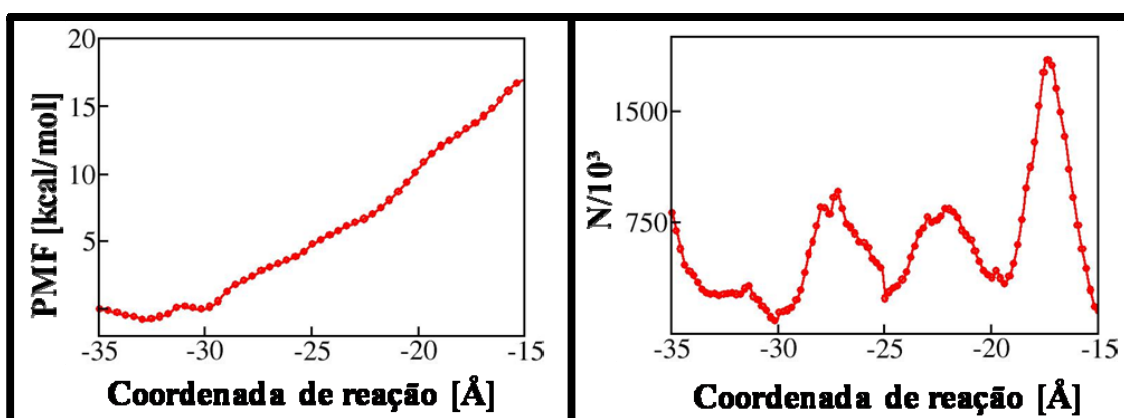


Figura 9. Esquerda: Potencial de Força Média para a inserção do Pep-1 calculado por dinâmica molecular via NAMD e o método *ABF* implementado. Direita: Número de pontos para estimativa da força média ao longo da coordenada de reação. Note que, não há a convergência do PMF para um mínimo de adsorção do Pep-1 na região referente à interface água/cabeça polar (-30 Å a -20 Å da coordenada de reação). Os gráficos foram construídos utilizando-se o programa Grace (vide metodologia 4.2.2.3).

O perfil de energia livre (PMF) aqui obtido é, entretanto, somente uma estimativa do limite superior da barreira de energia livre associada à inserção do peptídeo. Essa conclusão é baseada na ausência de mínimos de energia, ao longo da coordenada de reação, especialmente nas regiões de interface água/membrana e teto polar/cauda hidrofóbica dos fosfolipídios.

Existe uma fonte principal de erros sistemáticos que contribuíram para o comportamento não convergente do PMF aqui estimado. Erros sistemáticos ou *bias* se devem à influência de forças externas, ou seja, estão presentes no sistema, mas não podem ser excluídas ou controladas. Nesta simulação puderam ser identificadas duas fontes de *bias*: imperfeições do campo de força em representar os fosfolipídios na fase líquida e o tamanho da bicamada lipídica. Há uma falha no atual campo de força CHARMM que não permite uma representação satisfatória das moléculas de fosfolipídios na fase líquida (Hénin *et al*, 2008). Isso seria o mais apropriado para o estudo de inserção peptídica, pois se trata de uma tentativa de reproduzir o estado mosaico fluido da membrana. O modelo lipídico do campo de força CHARMM se comporta mais como uma fase gel com valor de área por fosfolipídio de  $\approx 10 \text{ \AA}^2$ . Esse valor é menor que aqueles estimados experimentalmente (Benz *et al*, 2005), o que influenciou na não convergência do PMF durante a simulação. Em um corte de membrana, ou *patch* lipídico, de dimensões reduzidas, a inserção de um peptídeo em uma das monocamadas da membrana é mecanicamente acoplada a um aumento da área por fosfolipídio da segunda monocamada. Nesse caso, existe uma penalidade energética adicional à barreira intrínseca de inserção do peptídeo, que seria consideravelmente minimizada em construções lipídicas de maior dimensão.

## 5.2 NOVA ESTRATÉGIA PARA ESTUDAR A INSERÇÃO DE PEPTÍDEOS: CAMPO DE FORÇA GROMOS

Dada a complexidade do sistema, o alto custo computacional requerido, e a identificação de fontes de erros significativas para a investigação do processo de inserção peptídica descritos acima, novos esforços foram requisitados para vencer os desafios metodológicos aqui encontrados. Dessa forma, uma nova estratégia foi desenvolvida considerando três pontos principais: i) simulações adicionais de dinâmica molecular utilizando o programa GROMACS (Lindhal *et al*, 2001) com o campo de força GROMOS (van Gunsteren, 1987), o que permitiu simular melhor a fase líquida de fosfolipídios (Hénin *et al*, 2008) com um menor custo computacional comparado com o NAMD/CHARMM; ii) a construção de sistemas moleculares maiores, contendo bicamadas lipídicas formadas por 128 moléculas; iii) e uma nova abordagem para estimar a energética de inserção peptídica.

### 5.2.1 SIMULAÇÃO DA MEMBRANA

Propriedades da membrana tais como a espessura da bicamada, perfis de espalhamento, densidade eletrônica de grupos da membrana, fatores de estrutura e área média por moléculas de lipídio, podem ser quantificadas teoricamente e também experimentalmente, permitindo rigorosa validação dos campos de força. Benz e colaboradores, em 2005, compararam a área por fosfolipídio de um modelo de membrana composto de fosfatidilcolina com dados experimentais obtidos por White e Wiener, 1995, validando o campo de força GROMOS para descrição correta de sistemas de bicamada lipídica em fase líquida.

Além disso, os lipídios descritos segundo o GROMOS são do tipo átomos unidos, em que cada carbono da cadeia alifática e seus hidrogênios associados são descritos como uma única partícula, mas que preservam as características de grupos metila, metileno e metino (Kandt *et al*, 2007). Quando hidrogênios são tratados explicitamente, como no caso do CHARMM, o número de átomos por lipídio pode até triplicar e o número de interações que a

membrana passa a realizar fica surpreendentemente grande, aumentando consideravelmente o tempo de simulação.

Considerando essas informações, foi utilizado um modelo de bicamada lipídica, completamente hidratado (2460 moléculas de água), contendo 128 moléculas de fosfolipídios, 1-Palmitoil-2-Oleoil-*sn*-Glicero-3-Fosfatidilcolina (sigla em inglês *POPC*). Esse sistema, contendo um número total de 14035 átomos, foi inicialmente simulado para a validação do protocolo de simulação de membranas utilizado nesse trabalho.

A figura 10 é referente à etapa de equilibração da bicamada lipídica durante 20 ns de simulação em um *ensemble* canônico NPT (Fließbach 2000) com condições periódicas de contorno. A temperatura e a pressão foram mantidas contantes em 305 K e 1 atm, respectivamente. Note que, a flutuação da energia mecânica do sistema é decorrente do acoplamento energético com o barostato e o termostato. Esta simulação mostra que o sistema de bicamada lipídica utilizado está em equilíbrio nas condições citadas.

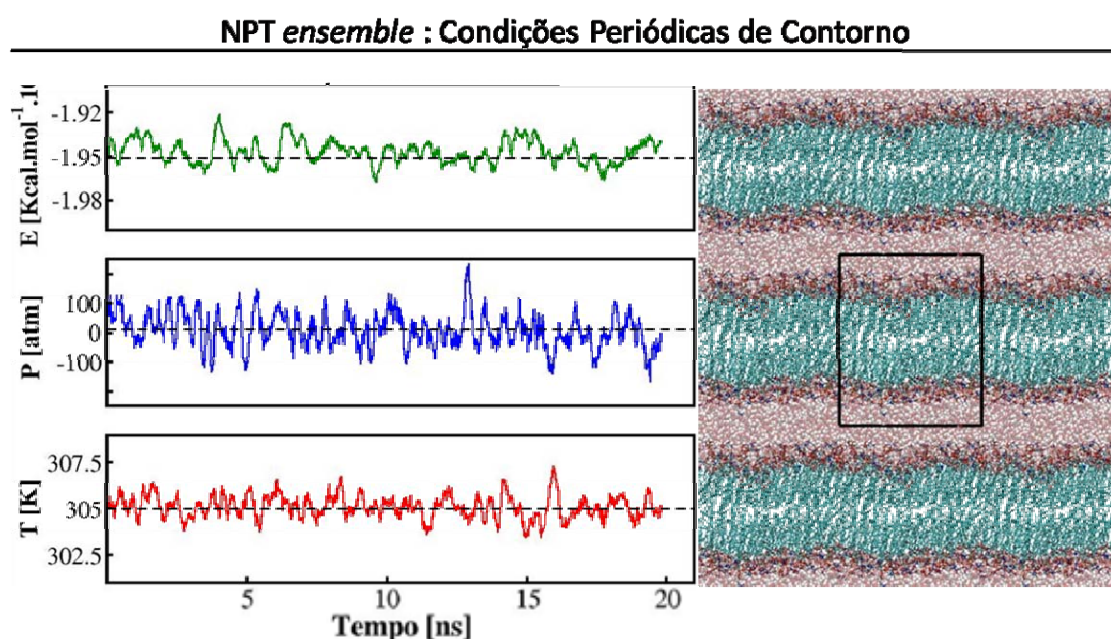


Figura 10. Simulação de um sistema de bicamada lipídica em um regime *NPT* (*n*º de partículas, pressão e temperatura constantes). Esquerda: Propriedades macroscópicas do sistema; variação total da energia (verde), pressão (azul) e temperatura (vermelho). A linha tracejada indica o valor médio dessas grandezas. Direita: representação atomística da bicamada lipídica, reproduzindo as condições periódicas de contorno (sigla em inglês *PBC*) usadas na simulação. O retângulo ao centro indica os limites da cela de simulação. Os *plots* foram construídos utilizando-se o programa Grace e a imagem da membrana com o VMD (vide metodologia 4.2.2.3).



Microscopicamente, a simulação da bicamada lipídica aqui apresentada está de acordo com medidas experimentais, indicando a validação do protocolo desenvolvido e utilizado nesse trabalho (Figura 11). White and Wiener (1995) desenvolveram um método que combinava a difração de nêutrons e de raios-X para decompor o padrão de espalhamento eletrônico de cada grupo constituinte de uma membrana de dioleoilfosfatidilcolina (*DOPC*). Com isso montaram um mapa de distribuição da densidade eletrônica dos grupos colina, fosfato, glicerol, carbonil da bicamada, além das águas de hidratação. Esse dado é até hoje uma referência para validação de protocolos de simulação com membranas. No presente trabalho a densidade eletrônica  $\rho$  para o sistema após equilíbrio da bicamada lipídica foi computada (figura 11A). A densidade eletrônica  $\rho$  do solvente coexiste com a da membrana apenas na região de interface, sobreposta às densidades dos grupos colina e fosfatidil. Esses grupos formam o principal pico de densidade eletrônica do lipídio na região de interface, sendo o grupo fosfatidil ligeiramente deslocado para o centro lipídico. A densidade eletrônica do lipídio apresenta uma depressão no centro da bicamada, devido à uma menor ocupação dos átomos das caudas hidrofóbicas nessa região. Note que, o estado de desorganização das cadeias carbônicas dos lipídios é característico da fase líquida da membrana. Finalmente, o valor de área média por fosfolipídio é de aproximadamente  $53 \text{ \AA}^2$ , cerca de  $5 \text{ \AA}^2$  menor que o valor experimental (Benz *et al*, 2005).

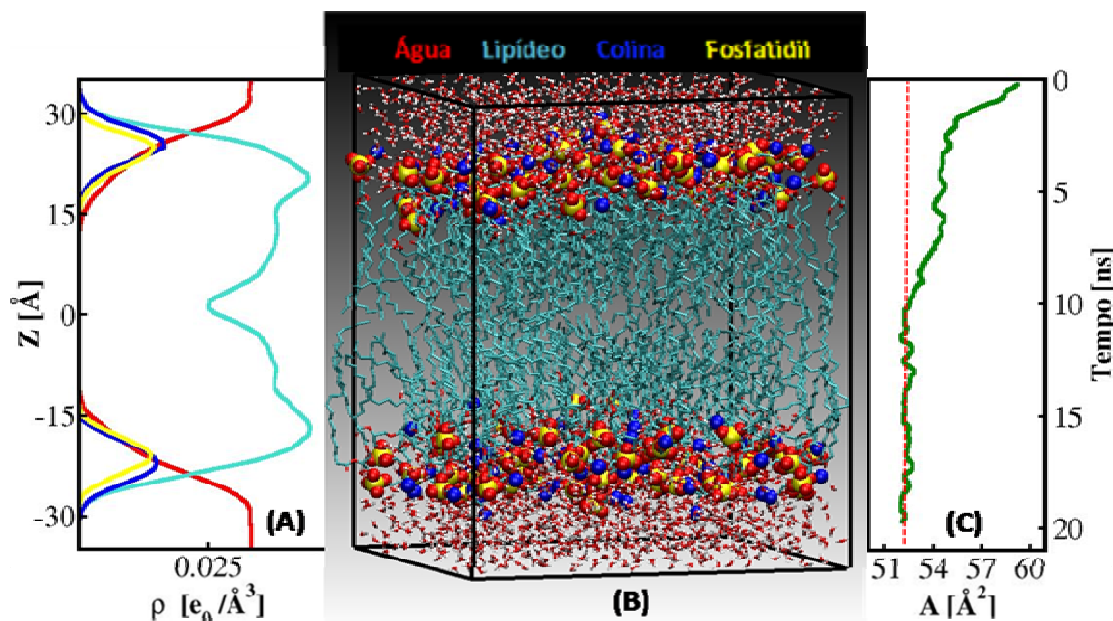


Figura 11. Característica microscópica da membrana após relaxamento de 20ns.

A: Eixo transmembrana ( $Z$ ) VS distribuição da densidade eletrônica ( $\rho$ ) para cada região da membrana. A coloração empregada no painel A está em conformidade com os grupos evidenciados no painel B. Notar a depressão de ( $\rho$ ) nas caudas hidrofóbicas do lipídio e os picos nas regiões de interface. B: Representação dos átomos constituintes do sistema evidenciados por cores: Vermelho = moléculas de água (bastão) e oxigênios do grupamento Fosfatidil (esferas VW); Azul escuro = nitrogênio do grupamento Colina (esferas VW); Amarelo = fósforo do grupo Fosfatidil (esferas VW); Azul piscina = cadeias alifáticas dos fosfolipídios (bastão). C: Área por fosfolipídio calculada teoricamente. Linha tracejada em vermelho indica a convergência para um valor  $\approx 53 \text{ \AA}^2$ . Os gráficos foram construídos utilizando-se o programa Grace e a imagem da membrana com o VMD (vide metodologia 4.2.2.3).

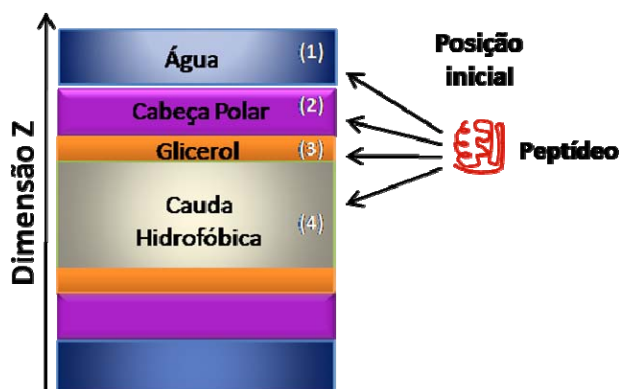
## 5.2.2 ESTRUTURA E ENERGÉTICA DA INSERÇÃO DOS PEPTÍDEOS

Uma vez minimizados os erros sistemáticos, o campo de força e o tamanho do *patch* lipídico, envolvidos nesse estudo de inserção peptídica pela membrana, resta a difícil tarefa de minimizar os erros estatísticos relacionados à amostragem dos diferentes estados do sistema durante o processo de inserção. Os resultados obtidos anteriormente com o método ABF desmotivaram a utilização de outros métodos para cálculo de energia livre atualmente implementados no GROMACS, como o *Umbrella sampling*, dado o

altíssimo custo computacional requerido para a convergência do PMF. No cálculo com o ABF, um número mínimo de 500 mil pontos para cada posição da coordenada de reação foi requerido para amostragem satisfatória do sistema (Figura 9, painel direito).

Diante da dificuldade de amostragem estatística e limitação técnica, a estratégia aqui empregada consistiu em se realizar simulações independentes onde os peptídeos foram inicialmente posicionados em diferentes regiões ao longo do eixo transmembrânico do sistema (Figura 12). Por meio dessa nova abordagem, diferentes estados do sistema puderam ser amostrados permitindo computar, de modo semi-quantitativo, a energética do processo de inserção.

Figura 12. Estratégia para investigar a inserção dos peptídeos. Para cada peptídeo, quatro simulações independentes foram realizadas com a molécula inicialmente posicionada nas regiões (1) à (4) do sistema.



Para isso, um total de quatro simulações foi realizado, com duração mínima de 100 ns, para cada um dos sistemas contendo os peptídeos Pep-1 e Pep-2. Em todas as simulações, estados de equilíbrio estacionário, ou metaestáveis, descritos pela posição transmembrânica  $z$  do peptídeo, foram atingidos durante aproximadamente os últimos 50 ns (Figuras 13 e 14). Nas simulações do Pep-1, a molécula se estabilizou nos estados  $z \approx 24 \text{ \AA}$ ,  $z \approx 16 \text{ \AA}$ ,  $z \approx 13 \text{ \AA}$  e  $z \approx 10 \text{ \AA}$ , correspondentes às posições interfaciais água/cabeça polar (A/CP) e cabeça polar/cauda hidrofóbica (CP/CH). Resultados semelhantes foram obtidos nas simulações do Pep-2, onde o peptídeo converge para as posições de interface  $z \approx 19 \text{ \AA}$ ,  $z \approx 17 \text{ \AA}$ ,  $z \approx 13 \text{ \AA}$  e  $z \approx 5 \text{ \AA}$ .

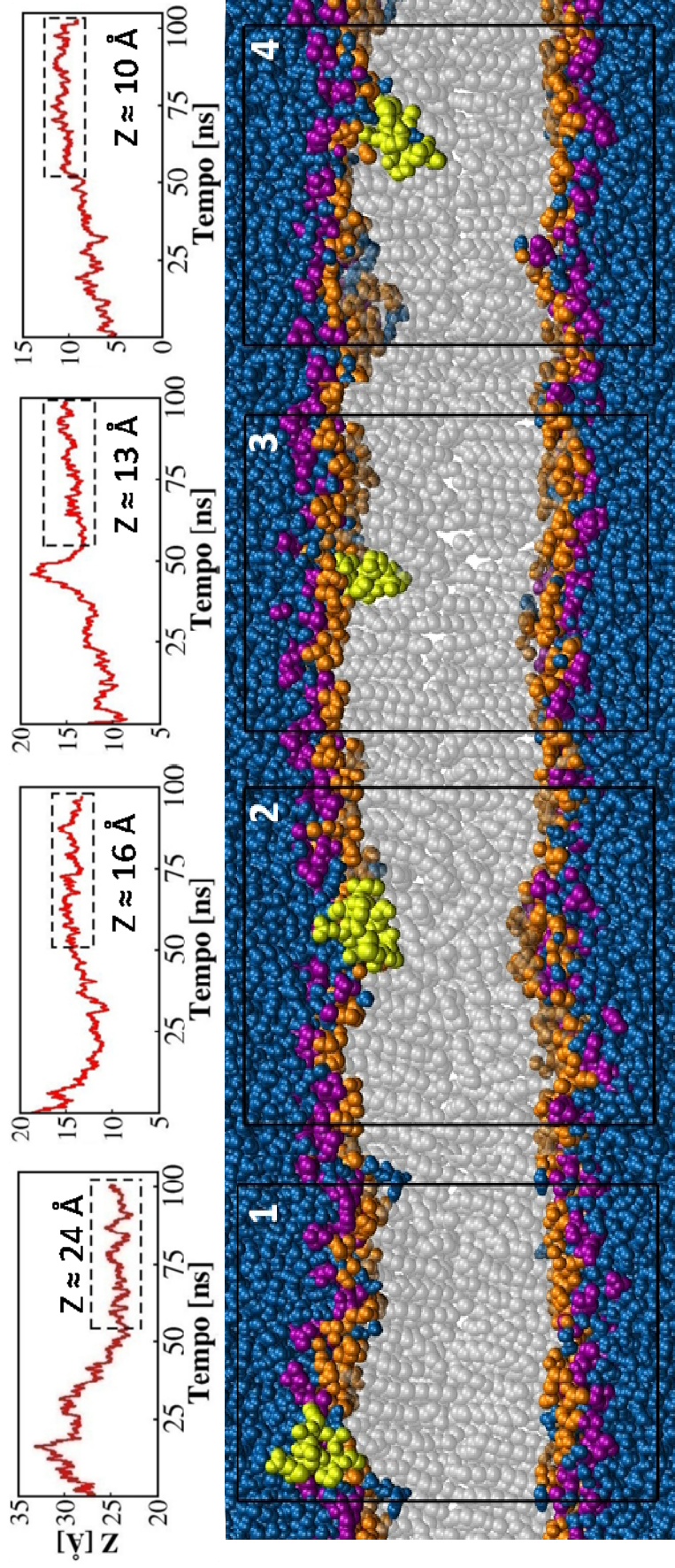


Figura 13. Painéis superiores: Estados resultantes das 4 simulações independentes do Pep-1, referente à posição relativa do peptídeo na direção do eixo transmembrânico  $z$ , ao término de 100ns de simulação. Todas as trajetórias atingiram estados metaestáveis durante os 50ns finais de simulação (retângulos tracejados e com o estado  $z$  em negro). Painéis inferiores: O peptídeo, a água, e os grupos constituintes da membrana estão representados por cores (esferas VW): Amarelo = Pep-1; Azul = água; Violeta = Cabeça Polar; Laranja = Glicerol; Cinza = Caudas Hidrofóbicas. 1: Simulação em que o peptídeo parte da água e se adsorve na interface água/cabeça polar (A/CP). 2: Peptídeo posicionado inicialmente na região das águas e Cabeças Polares, e se adsorvendo posteriormente à interface cabeça polar/cauda hidrofóbica (CP/CH); 3: Peptídeo partindo da interface CP/CH e permanecendo estável nessa região. 4: Peptídeo inicialmente posicionado no centro hidrofóbico da membrana e atingindo a interface CP/CH. A caixa de simulação está representada como um retângulo no centro da figura. A estrutura lamelar do sistema é mantida pelo PBC. Os *plots* foram construídos com o programa Grace e as figuras com o VMD (vide metodologia 4.2.2.3).



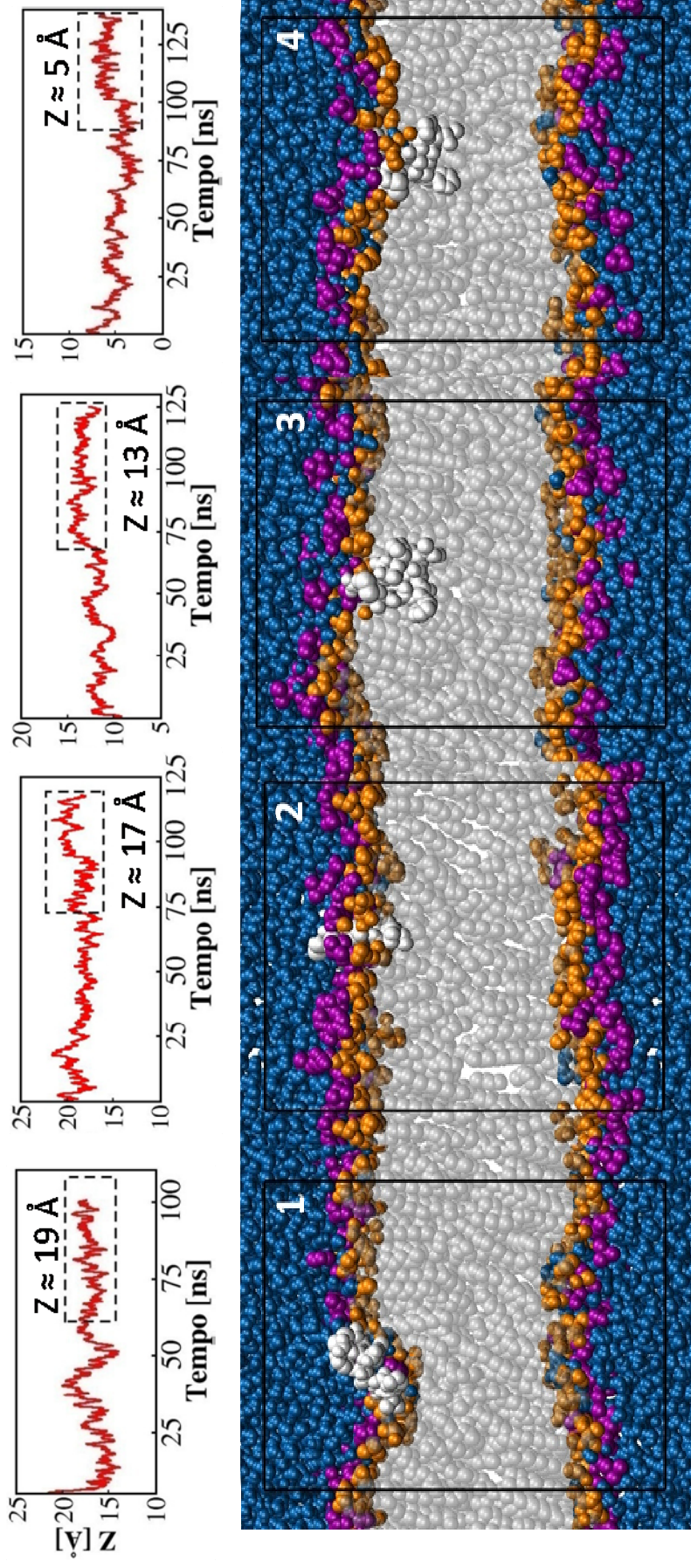


Figura 14 Painéis superiores: Estados resultantes das 4 simulações independentes do Pep-2, referente à posição relativa do peptídeo na direção do eixo transmembrânico  $z$ , ao término de 100ns de simulação. Todas as trajetórias atingiram estados metaestáveis durante os 50ns finais de simulação (retângulos tracejados e com o estado  $z$  em negrito). Painéis inferiores: O peptídeo, a água, e os grupos constituintes da membrana estão representados por cores (esferas VW): Amarelo = Pep-2; Azul = água; Violeta = Cabeça Polar; Laranja = Glicerol; Cinza = Caudas Hidrofóbicas. **1:** Peptídeo posicionado inicialmente na região das águas e Cabeças Polares, e se adsorvendo água/cabeça polar (A/CP). **2:** Peptídeo inicialmente posicionado na região da interface CP/CH e permanecendo estável nessa região. **3:** Peptídeo inicialmente posicionado no centro hidrofóbico da membrana e atingindo a interface CP/CH. A caixa de simulação está representada como um retângulo no centro da figura. A estrutura lamelar do sistema é mantida pelo *PBC*. Os *plots* foram construídos com o programa Grace e as figuras com o VMD (vide metodologia 4.2.2.3).

Os estados estacionários mencionados são estabilizados por interações entre os peptídeos e os diferentes componentes do sistema, dentre as quais, as ligações de hidrogênio (Figura 15). Um critério geométrico foi adotado para considerar essas ligações: todo contato entre átomos de oxigênio e hidrogênio do peptídeo e as demais moléculas do sistema, com comprimento de ligação intermolecular de 3,2 Å e ângulo entre esses átomos variando de 150° a 180°. Os peptídeos realizam, em particular, ligações de hidrogênio com a água e os grupos fosfatidil e glicerol. O Pep-1 faz em média mais ligações de hidrogênio que o Pep-2, devido a sua natureza polar. Note que a maioria das interações desse peptídeo é intermediada pelos 4 primeiros resíduos de sua sequência (CTKS), em especial, a lisina.

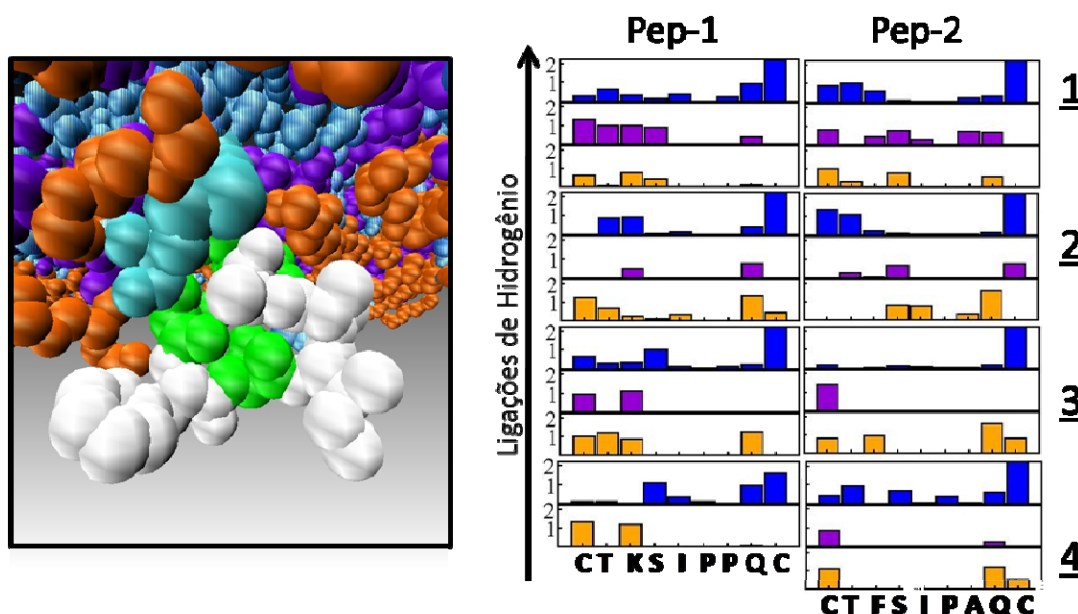


Figura 15. Esquerda: Representação atomística geral do mínimo de energia para o Pep-2 (visão do centro da membrana para o teto polar). Os resíduos estão coloridos segundo a polaridade (esferas VW): Polares = Verde e azul claro; Hidrofóbicos = Brancos. A coloração das moléculas de água e dos grupos da membrana está de acordo com as barras dos histogramas do quadrante direito da figura. Direita: Número médio de ligações de hidrogênio, por resíduo dos peptídeos calculado a partir dos estados metaestáveis (50 ns finais de simulação). As barras estão coloridas de acordo com os grupos do sistema: Azul escuro = água; Violeta = Fosfatidil; Laranja = Glicerol. Os números sublinhados à direita indicam as quatro simulações independentes (1-4) para ambos os Pep-1 e Pep-2. Imagem renderizada com o programa VMD e *plots* construídos com o programa Grace (vide metodologia 4.2.2.3).

A energia potencial total do sistema, calculada para os diferentes estados  $z$ , referentes aos estados metaestáveis alcançados nas simulações, está apresentada na figura 16 para ambos os peptídeos. Para o Pep-1, a energia do sistema contendo o peptídeo particionado na membrana é cerca de 1000 kcal/mol superior à energia referente à localização da molécula em fase aquosa. Uma barreira energética negativa de mesma magnitude é observada para o Pep-2 imerso na membrana.

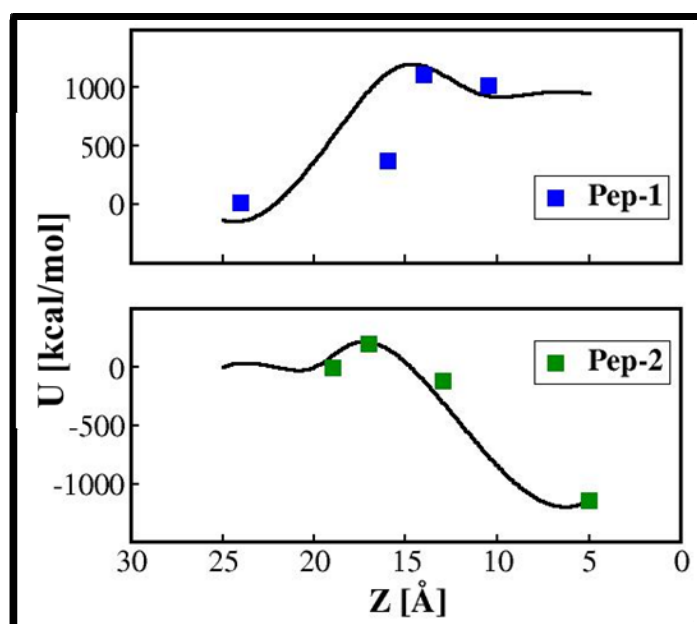


Figura 16. Energia potencial ( $U$ ) do sistema em função da posição transmembrânica  $z$  dos peptídeos. O valor da coordenada  $z$  decresce da região da água ( $z = 25$  Å) para o centro da bicamada lipídica ( $z=0$  Å). As curvas são ajustes ponderados para as energias dos estados metaestáveis amostrados (quadrados). Os gráficos foram construídos com o programa Grace (vide metodologia 4.2.2.3).

As energias potenciais aqui calculadas possibilitam estimar, de modo semi-quantitativo, o perfil de energia livre associado à inserção peptídica. Pela combinação das equações 16 e 17 (vide metodologia), a variação de energia livre entre dois estados do sistema  $z_1$  e  $z_2$ , é dada simplesmente pela equação 22:

$$\Delta A = A(z_2) - A(z_1) = -\frac{1}{\beta} \ln \sum_i^n \frac{e^{-\beta U_i(z_2)}}{e^{-\beta U_i(z_1)}} \quad (22)$$

Entende-se por metaestabilidade a convergência do sistema para um mínimo local da superfície de energia potencial. O peso de Boltzmann dos estados de energia mínima aqui encontrados é bastante significativo (Figura 17) e, portanto, em uma primeira aproximação, dominam a equação 22 permitindo se estimar a energia livre para a inserção de ambos os peptídeos na membrana (Figura 19). De acordo com a natureza hidrofóbica de cada peptídeo, o processo de inserção na membrana é respectivamente *uphill* e *downhill* para os Pep-1 e 2. Recentemente, Babakhani e colaboradores (2008) mostraram por meio de dinâmica molecular utilizando o método *umbrella sampling*, que a energia livre de particionamento de um peptídeo hidrofóbico (WL5) no interior da membrana é de  $\approx 11$  kcal/mol.

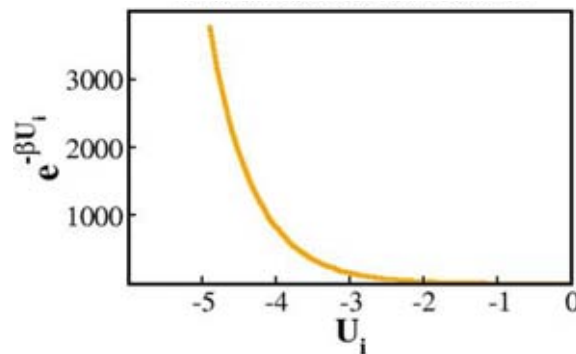


Figura 17. Ilustração da dependência do peso de Boltzmann com a energia potencial dos microestados  $U_i$  de um dado estado  $z$  do sistema. Note que, o peso de Boltzmann é significativamente maior para os microestados de mínimos de energias. Gráfico construído com o programa Grace (vide metodologia 4.2.2.3).

No mínimo global de energia livre, o Pep-1 ancora na interface A/CP, adotando uma orientação preferencial que minimiza a frustração energética do sistema, via interações de seus grupos polares com o ambiente (Figura 13, simulação 1). Nessa configuração, a porção N-terminal (CTKS) interage fortemente com o teto polar da membrana, enquanto o restante da molécula



forma ligações de hidrogênio com a água. Já o Pep-2 é estabilizado no centro da membrana, dado que a molécula é repelida da região do solvente devido a alta dispersão dos resíduos apolares quando expostos às moléculas de água (Figura 14, simulação 4).

Apesar de haver poucos resultados teóricos e experimentais sobre a termodinâmica de interação entre peptídeos com estruturas tridimensionais cíclicas e membranas, recentemente alguns resultados encontrados na literatura apontam para a estabilização de peptídeos, com caráter hidrofílico mais acentuado, na interface polar de bicamadas lipídicas. Uma configuração semelhante para o mínimo global aqui encontrado foi descrita previamente em simulações de neurotoxinas carregadas e predominantemente hidrofílicas (Wee *et al*, 2007).

No ano de 2008, Andrushchenko e colaboradores calcularam, via microcalorimetria de titulação isotérmica, a energia livre de ligação de peptídeos antimicrobianos helicoidais à superfície de vesículas do tipo bicamada lipídica, LUVs (do inglês *Large Unilamellar Vesicles*) e também com extratos de membrana celular de *E. Coli*. Nesse trabalho foram construídos dois grupos distintos de vesículas, sendo um neutro, com fosfatidilcolina pura (*POPC*) simulando as características físico-químicas de membranas de eucariotos, e o outro carregado negativamente devido à mistura de fosfatidiletanolamina (*POPE*) e fosfatidilglicerocolina (*POPG*), simulando as características físico-químicas de membranas de procariotos. A variação de energia livre da ligação dos peptídeos, às vesículas carregadas, e ao extrato de membrana de *E. Coli* foi de  $\approx -8,5$  kcal/mol. Já a energia livre de ligação às vesículas neutras foi de  $\approx -5,7$  kcal/mol. Esses dados reforçam o resultado aqui apresentado para a maior estabilização do Pep-1 que realiza na região N-terminal várias ligações de hidrogênio com a interface polar A/CP.

A inserção favorável aqui determinada para do Pep-2 é consistente com as escalas de hidrofobicidade previamente determinadas para os aminoácidos (Nelson e Cox, 2002). Mishra e colaboradores em 2008, estudando peptídeos hidrofóbicos, mostraram por RMN uma maior estruturação de um peptídeo helicoidal com mutação de leucina para fenilalanina, quando inserido no núcleo hidrofóbico de uma membrana de DMPC (1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina). Nesse caso, as interações hidrofóbicas entre os resíduos

apolares, quando inseridos na região de caudas hidrofóbicas, foram cruciais para a inserção e estabilização dos peptídeos no centro da bicamada lipídica, o que também pode ser observado para as simulações do Pep-2 aqui apresentadas.

Para ambos os peptídeos, a inserção na membrana é limitada por uma barreira de energia localizada na região dos grupos fosfatidilcolina. A magnitude dessa barreira é maior para o Pep-1 comparada ao Pep-2, indicando que o primeiro se insere mais lentamente na membrana comparado ao segundo. Dada essas barreiras de energia livre, é pertinente questionar se o processo de inserção desses peptídeos é dirigido predominantemente por fatores entálpicos e/ou entrópicos. A entalpia está relacionada com a natureza das interações intermoleculares entre a molécula permeante e os grupos lipídicos, enquanto a entropia depende do número total de conformações acessíveis ao sistema, proveniente dos lipídios, solvente e peptídeos. No intuito de responder essa questão, a liberdade conformacional dos Pep-1 e 2 foi estudada em meio aquoso, por meio de dois sistemas formados individualmente por um peptídeo imerso em uma caixa cúbica de água (aresta = 40 Å), contendo 1856 moléculas do solvente (Figura 18). O tempo total para essas simulações foi de 1.5 ns. O desvio estrutural dos peptídeos em relação à conformação inicial foi calculado a partir do parâmetro RMSD (do inglês *Root Mean Square Deviation*), segundo a equação 23 (Humphry *et al*, 1996):

$$rmsd(A, B, t) = \sum_{i=1}^N \frac{\|A_i - B_i\|}{N} \quad (23)$$

em que  $A$  e  $B$  são conformações da proteína nos instantes  $t_1 = 0$  e  $t_2 = t$ , respectivamente, e  $i$  é o índice de cada átomo dessas moléculas, sendo  $\|A_i - B_i\|$  a norma entre os vetores  $A_i$  e  $B_i$  como mostrado a seguir:

$$\|A_i - B_i\| = \sqrt{(A_{ix} - B_{ix})^2 + (A_{iy} - B_{iy})^2 + (A_{iz} - B_{iz})^2} \quad (24)$$

onde, de forma generalizada,  $N_{kl}$  é uma coordenada cartesiana  $l$  de um átomo  $k$  para uma dada conformação  $N$ .

Na figura 18, o RMSD para ambos os peptídeos foi de apenas 1.5 Å, valor esse que é da ordem do fator temperatura observado para proteínas em fase cristalina (Silva *et al*, 2008), indicando, portanto, a rigidez estrutural dessas moléculas. Além disso, esses peptídeos compartilham de um mesmo volume de exclusão, considerando que ambos adotam uma conformação preferencial na forma de anel e têm aproximadamente a mesma massa molecular ( $\approx 1\text{kDa}$ ).

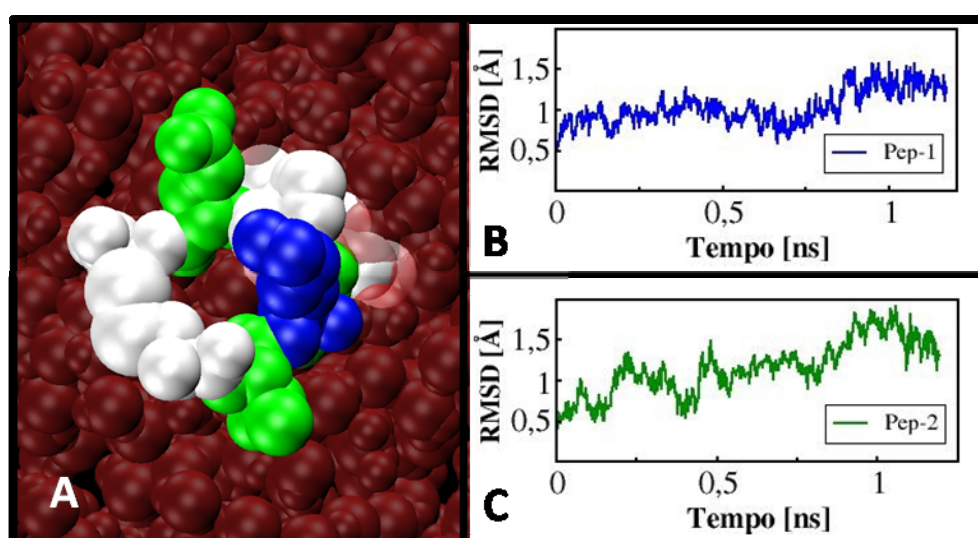


Figura 18. Análise estrutural dos peptídeos Pep-1 e Pep-2 em água. (A) Estrutura final do Pep-1 obtida após 1.5 ns de simulação. A estrutura do Pep-2 foi semelhante à observada em (A). Os aminoácidos estão coloridos pela polaridade (carregados = azul; polares = verde; apolares = branco) e as moléculas de água representadas em vermelho. (B) e (C) RMSD para os Pep-1 e Pep-2, respectivamente. Note que a estrutura dos peptídeos, em forma de anel, é estabilizada ao longo da simulação pela ligação dissulfeto entre as Cisteínas 1 e 9. A imagem do peptídeo foi renderizada com o programa VMD, e os gráficos construídos com o programa Grace (vide metodologia 4.2.2.3).

Assumindo que a variação de entropia do lipídio e do solvente para a inserção de ambos os peptídeos seja similar, dados a rigidez estrutural e o mesmo volume de exclusão das moléculas permeantes, espera-se que a diferença entre as barreiras de energia livre aqui encontradas (Figura 19), seja determinada predominantemente pela variação de entalpia decorrente das

interações molécula/membrana. Isso mostra uma dependência direta da magnitude dessas barreiras com a natureza físico química dos peptídeos.

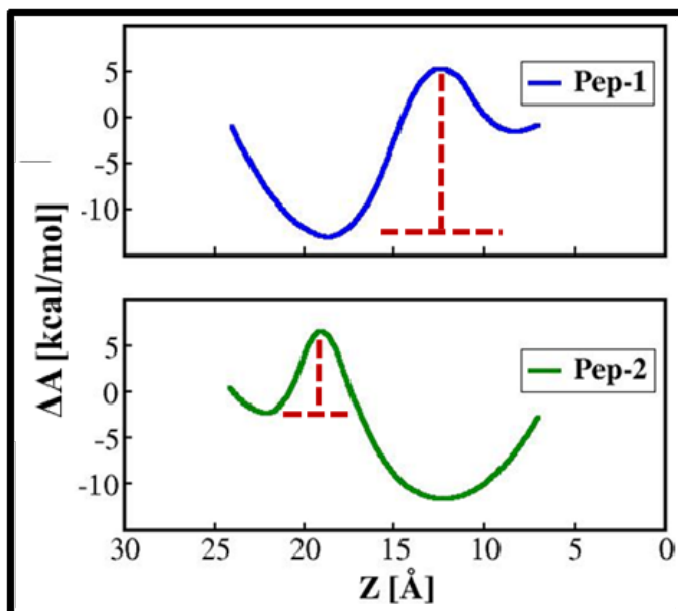


Figura 19. Perfil de energia livre para o processo de inserção de ambos os peptídeos em um modelo de bicamada lipídica neutra (POPC). A energia livre foi calculada segundo a equação 22, utilizando as curvas de energia potencial ajustadas na figura 16. Note que para o Pep-1 a barreira de energia para cruzar a interface polar da membrana é consideravelmente maior em relação ao Pep-2 (linhas tracejadas em vermelho). Os gráficos foram construídos com o programa Grace (vide metodologia 4.2.2.3).

Vale ressaltar que no trabalho de Andrushchenko e colaboradores em 2008, o termo entálpico foi consideravelmente dominante sobre o termo entrópico para todas as medidas de energia livre da interação entre os peptídeos antimicrobianos às vesículas *LUV* e ao extrato de membrana de bactéria. Esses peptídeos helicoidais apresentam uma estrutura tridimensional rígida, como os peptídeos cíclicos aqui estudados, o que reforça a idéia de que para os Pep-1 e 2 a estabilização nos mínimos de energia, bem com as barreiras de ativação, sejam governadas entalpicamente.

No perfil de energia livre estimado para a inserção do Pep-1 pelas simulações com o CHARMM, foi encontrada uma barreira energética da ordem de  $\approx 15$  kcal/mol, localizada entre a região das águas e a interface polar da bicamada (Figura 8). Esse perfil claramente é ascendente (*Uphill*) e não revela nenhum mínimo de energia durante o processo de inserção. Diferentemente, pelas simulações com o campo de força GROMOS foi possível se identificar a localização dos mínimos de energia livre do processo de inserção de dois peptídeos distintos bem como das barreiras de energia livre para o processo de inserção. Esse resultado está diretamente vinculado à estratégia aqui apresentada para amostrar diferentes estados  $z$  do sistema ao longo da coordenada de reação. Outro ponto relevante desse estudo foi a convergência de as todas as oito simulações independentes, para estados metaestáveis, durante os 50 ns finais de simulação. Desse modo, pelo reordenamento da função de energia livre (equação 16) e da probabilidade de densidade canônica (equação 17), foi possível realizar uma estimativa semi-quantitativa da variação de energia livre entre dois estados  $z$  do sistema (equação 22). Considerando todas essas informações, pelo trabalho aqui apresentado pode-se estimar um perfil de energia livre para inserção de peptídeos de naturezas físico-químicas distintas, condizente com os poucos dados presentes atualmente na literatura.

## 6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Em uma última análise, apesar de o PMF ter sido calculado por métodos avançados de dinâmica molecular, como o *ABF*, as imperfeições do atual campo de força CHARMM e as dimensões reduzidas do *patch* lipídico, inicialmente escolhidos, influenciaram diretamente na não convergência do perfil de energia livre, mostrando que essa tarefa está longe de ser alcançada em poucas etapas metodológicas e de modo automatizado. Em dezembro de 2008, Hénin e colaboradores publicaram uma implementação feita no campo de força CHARMM para representar o sistema molecular como átomos unidos, assim como é representado no GROMOS. Durante as etapas de validação desse novo campo de força (CHARMM27-UA), simulações com vários modelos de bicamada lipídica, de diferentes dimensões foram testadas quanto à área por fosfolípido. Os resultados indicam valores de  $\approx 60 \text{ \AA}^2$  para essa variável o que é muito próximo aos dados obtidos experimentalmente. Espera-se que com esse advento dos campos de força e o aumento da capacidade de processamento de dados dos computadores seja possível, nos próximos anos, estimar quantitativamente a magnitude das barreiras energéticas para o processo de inserção peptídica.

Diante desse contexto de grande desafio científico e metodológico, o estudo aqui desenvolvido contribui para o entendimento geral sobre o a inserção e posteriormente o transporte de peptídeos pela membrana. A partir dos dados aqui apresentados é possível concluir que há uma grande influência das propriedades físico-químicas de cada uma das moléculas protéicas no modo como os peptídeos se inserem na membrana. Os resultados aqui obtidos indicam que moléculas predominantemente hidrofílicas se associam fortemente à região interfacial água/lipídio, enquanto que as hidrofóbicas se estabilizam no centro da bicamada. Em ambos os casos, o passo limitante para o processo de inserção é a transposição dos peptídeos pela região da cabeça polar.

Esse conhecimento é requerido para a engenharia biotecnológica, visando à obtenção de propriedades desejáveis para o transporte de moléculas específicas. Tais propriedades incluem a maior estabilização dessas moléculas no interior da membrana, aumento da velocidade de inserção e estabilização

de agregados, o que seria particularmente útil para o desenvolvimento de veículos para entrega de drogas no interior da célula.

A metodologia aqui desenvolvida poderá ser aplicada para se estudar igualmente uma série de outras moléculas com diferentes estruturas secundárias, carregadas ou neutras, que se adsorvam, particionem e efetivamente atravessem diferentes modelos de membranas. Em particular, ela poderá ser útil para o estudo do mecanismo de permeação de peptídeos helicoidais, especialmente os antimicrobianos (Leontiadou *et al*, 2006) cuja aplicabilidade farmacológica e medicinal é de grande interesse.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams J. The Proteasome: A suitable antineoplastic target. **Nature Reviews: Cancer**. 4. 349-360. 2004.

Afonin S, Durr UHN, Wadhvani P, Salgado J, Ulrich AS. Solid state NMR structure analysis of the antimicrobial peptide gramicidin S in lipid membranes: concentration-dependent re-alignment and self-assembly as a beta-barrel. **Bioactive Conformation II**. 273. 139-154. 2008.

ALBERTS, B; JOHNSON, A; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K; WATER, P. **Molecular Biology of the Cell**. 4<sup>th</sup> Edition. New York: 29 West 35th Street. 2002.

Allen MP, Tildesley DJ. **Computer Simulation of Liquids**. Clarendon Press, Oxford. 1989.

Andrushchenko VV, Aarabi MH, Nguyen LT, Prenner EJ, Vogel HJ. Thermodynamics of the interactions of tryptophan-rich cathelicidin antimicrobial peptides with model and natural membranes. **Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes**. 1778. 1004-1014. 2008.

Arrondoa JLR, Goñi FM. Structure and dynamics of membrane proteins as studied by infrared spectroscopy. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**. 72. 367-405. 1999.

Babakhani A, Gorfe AA, Kim JE, McCammon JA. Thermodynamics of Peptide Insertion and Aggregation in a Lipid Bilayer. **Journal of Physical Chemistry B**. 112. 10528-10534. 2008.

Bachar M, Becker OM. Protein-Induced Membrane Disorder: A Molecular Dynamics study of Melittin in a Dipalmitoylphosphatidylcholine Bilayer. **Biophysical Journal**. 78. 1359-1375. 2000.

Benz RW, Castro-Roman F, Tobias DJ, White SH. Experimental Validation of Molecular Dynamics Simulations of Lipid Bilayers. **Biophysical Journal**. 88. 805-817. 2005.

Berendsen HJC, Postma JPM, van Gunsteren WF, DiNola A, Haak JR. Molecular dynamics with coupling to an external bath. **Journal of Chemical Physics**. 81. 3684-3690. 1984.

Berendsen HJC, Spoel DVD, Drunen RV. **Computer Physics Communication**. 91. 43-56. 1995.



Bhandarkar M, Brunner R, Chipot C, Dalke A, Dixit S, Grayson P, Gullinsrud J, GURSOY A, Humphrey W, Hurwitz D, Krawetz N, Nelson M, Phillips J, Shinozaki A, Zheng G, Zhu F. **NAMD version 2.4**. <http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd>. 2002.

Bong DT, Janshoff A, Steinem C, Ghadiri MR. Membrane Partitioning of the Cleavage Peptide in Flock House Virus. **Biophysical Journal**. 78. 839–845. 2000.

Brooks BR, Bruccoleri RE, Olafson BD, States DJ, Swaminathan S, Karplus M. CHARMM: a Program for Macromolecular Energy, Minimizations, and Dynamics Calculations. **Journal of Computational Chemistry**. 4. 187-217. 1983.

Bürck J, Roth S, Wadhvani , Afonin S, Kanithasen N, Strandberg E, Ulrich AS. Conformation and Membrane Orientation of Amphiphilic Helical Peptides by Oriented Circular Dichroism. **Biophysical Journal**. 95. 3872–3881. 2008.

Cheng JTJ, Hale JD, Elliot M, Hancock REW, Straus SK. Effect of Membrane Composition on Antimicrobial Peptides Aurein 2.2 and 2.3 From Australian Southern Bell Frogs. **Biophysical Journal**. 96. 552–565. 2009.

Cornell WD, Cieplak P, Bayly CI, Gould IR, Merz KM Jr, Ferguson DM, Spellmeyer DC, Fox T, Caldwell JC, Kollman PA. A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. **Journal of American Chemical Society** 117. 5179-5197. 1995.

Essmann U, Perera L, Berkowitz ML, Darden T, Lee H, Pedersen LG. **Journal of Chemical Physics**. 103. 8577-8593. 1995.

FLIESSBACH, T. **Curso de Física Estatística**. Traduzido por João da Providência Jr. Lisboa: Av. de Berna. 2000. Cap. 22, p. 183-191.

Frederix P, Akiyama T, Staufer U, Gerber C, Fotiadis D, Muller DF, Engel A. **Current Opinion in Chemical Biology**. 7. 641. 2003.

Hess B, Bekker H, Berendsen HJC, Fraaije JGEM. **Journal of Computational Chemistry**. 18. 1463-1472. 1984.

Hénin J, Chipot C. Overcoming free energy barriers using unconstrained molecular dynamics simulations. **Journal of Chemical Physics**. 121. 2904-2914. 2004.

Hénin J, Shinoda W, Klein ML. United-Atom Acyl Chains for CHARMM phospholipids. **The Journal of Physical Chemistry B**. 112. 7008-7015. 2008.

Hoover WG. Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. **Physical Review**. A31. 1695-1697. 1985.

Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD – Visual Molecular Dynamics. **Journal of Molecular Graphics**. 14. 33-38. 1996.

Im W, Brooks CL. Interfacial folding and membrane insertion of designed peptides studied by molecular dynamics simulations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 102. 6771-6776. 2005.

Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **Journal of Chemical Physics**. 79. 926-935. 1983.

Kalé L, Skeel R, Bhandarkar M, Brunner R, Gursoy A, Krawtez N, Phillips J, Shinozaki A, Varadarajan K, Schulten K. NAMD2 - Greater Scalability for Parallel Molecular Dynamics. **Journal of Computational Physics**. 151. 283-312. 1999.

Kandt C, Ash WL, Tieleman DP. Setting up and running molecular dynamics simulations of membrane proteins. **Methods**. 41. 475-488. 2007.

Khurana E, Nielsen SO, Ensing B, Klein ML. Self-Assembling Cyclic Peptides: Molecular Dynamics Studies of Dimers in Polar and Nonpolar Solvents. **Journal of Physical Chemistry B**. 110. 18965-18972. 2006.

Kusalik PG, Svishchev IM. The spatial structure in liquid water. **Science**. 265. 1219-1221. 1994 .

Ladokhin AS. Analysis of Protein and Peptide Penetration into Membranes by Depth-Dependent Fluorescence Quenching: Theoretical Considerations. **Biophysical Journal**. 76. 946-955. 1999.

LAKOWICZ, JR. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3<sup>rd</sup> Edition. Springer. 2006.

Lee H, Kandasamy SK, Larson RG. Molecular Dynamics Simulations of the Anchoring and Tilting of the Lung-Surfactant Peptide SP-B<sub>1-25</sub> in Palmitic Acid Monolayers. **Biophysical Journal**. 89. 3807-3821. 2005.

Lensink MF, Christiaens B, Vandekerckhove J, Prochiantz A, Rosseneu M. Penetratin-Membrane Association: W48/R52/W56 Shield the Peptide from the Aqueous Phase. **Biophysical Journal**. 88. 939-952. 2005.

Leontiadou H, Mark AE, Marrink SJ. Antimicrobial Peptides in Action. **Journal of the American Chemical Society**. 128. 12156-12161. 2006.

Lindhal E, Hess B, Spoel Dvd. GROMACS 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis. **Journal of Molecular Graphics and Modeling**. 7. 306-317. 2001.

MacKerell AD Jr, Bashford D, Bellott M, Dunbrack RL Jr, Evanseck J, Field MJ, Fischer S, Gao J, Guo H, Ha S, Joseph-McCarthy D, Kuchnir L, Kuczera K, Lau FTK, Mattos C, Michnick S, Ngo T, Nguyen DT, Prodhom B, Reiher III WE, Roux B, Schlenkrich M, Smith JC, Stote R, Straub J, Watanabe M, Wiorkiewicz-Kuczera J, Yin D, Karplus M. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. **Journal of Physical Chemistry. B** 102. 3586-3616. 1998.

Mackerell Jr AD. Empirical force fields for biological macromolecules: Overview and issues. **Journal of Computational Chemistry**. 25. 1584-1604. 2004.

Martin I, Gormaghtigh E, Ruyschaert JM. Attenuated total reflection IR spectroscopy as a tool to investigate the orientation and tertiary structure changes in fusion proteins. **Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes**. 97-103. 1614. 2003.

Martyna GJ, Tuckerman ME, Tobias DJ, Klein ML. Explicit reversible integrators for extended systems dynamics. **Mol. Phys.** 87. 1117-1157. 1996.

McElhaney RN. Differential scanning calorimetric studies of lipid–protein interactions in model membrane systems. **Biochimica et Biophysica Acta**. 864. 361–421. 1986.

McGregor CL, Chen L, Pomoroy NC, Hwang P, Go S, Chakrabarty A, Privé GG. Lipopeptide detergents designed for the structural study of membrane proteins. **Nature Biotechnology**. 21. 171-176. 2003.

Mckerracher J, Munzer JS. A polypeptide selected from SEQ ID NO. 4, 6, 10, 14, 18, 20, 25, 30, 35, or 37, not defined in the specification, or its analogs, is new. Patent Assignees: **BIOAXONE THERAPEUTIQUE INC (BIOA-Non-standard)**. Accession Number: 2008-J37217. Patent Number(s): WO2008077236-A1. 2008.

Mihailescu D, Smith JC. Atomic Detail Peptide-Membrane Interactions: Molecular Dynamics Simulation of Gramicidin S in a DMPC Bilayer. **Biophysical Journal**. 79. 1718–1730. 2000.

Mishra VK, Palgunachari MN, Krishna NR, Glushka J, Segrest JP, Anantharamaiah GM. Effect of Leucine to Phenylalanine Substitution on the Nonpolar Face of a Class A Amphipathic Helical Peptide on Its Interaction with Lipid. **Journal of Biological Chemistry**. 283. 34393–34402. 2008.

Nanga RPR, Brender JR, Xu J, Veglia G, Ramamoorthy A. Structures of Rat and Human Islet Amyloid Polypeptide IAPP1-19 in Micelles by NMR Spectroscopy. **Biochemistry**. 47. 12689–12697. 2008.

NELSON, D. L., and COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3ª Edição. Traduzido por Arnaldo Antonio Simões e Wilson Roberto Navega Lodi. São Paulo: SARVIER. 2002.

Pei QX, Lim CG, Cheng Y, Gao HJ. Molecular dynamics study on DNA oligonucleotide translocation through carbon nanotubes. **Journal of Chemical Physics**. Volume:129. Issue:12. Article Number:125101. 2008.

Ruan Q, Cheng MA, Levi M, Gratton E, Mantulin WW. Spatial-Temporal Studies of Membrane Dynamics: Scanning Fluorescence Correlation Spectroscopy (SFCS). **Biophysical Journal**. 87. 1260–1267. 2004.

Rusu L, Gambhir A, McLaughlin S, Rädler J. Fluorescence Correlation Spectroscopy Studies of Peptide and Protein Binding to Phospholipid Vesicles. **Biophysical Journal**. 87. 1044–1053. 2004.

Sanderson JM. Peptide-lipid interactions: insights and perspectives. **Organic and Biomolecular Chemistry**. 3. 201-212. 2004.

Seeling J. Thermodynamics of lipid–peptide interactions. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1666. 40–50. 2004.

Shintou K, Nakano M, Kamo T, Kuroda Y, Handa T. Interaction of an Amphipathic Peptide with Phosphatidylcholine/Phosphatidylethanolamine Mixed Membranes. **Biophysical Journal**. 93. 3900–3906. 2007.

Silva AJ, Teles RCL, Esteves GF, Santos CR, Barbosa JARG, Freitas SM. Purification, crystallization and preliminary crystallographic studies of SPCI-chymotrypsin complex at 2.8 resolution. **Acta Crystallographica: Series F**. 64. 914-917. 2008.

Sugita Y. Free-energy landscapes of proteins in solution by generalized-ensemble simulations. **Frontiers in Bioscience**. 14. 1293-1303. 2009.

Torrie GM, Valleau JP. Monte Carlo free energy estimates using non-Boltzmann sampling: Application to the sub-critical Lennard-Jones fluid. **Chemical Physical Letter**. 28. 578-581.1974.

Torrie GM, Valleau JP. Nonphysical sampling distributions in Monte Carlo free-energy estimation: Umbrella sampling. **Journal of Computational Physics**. 23. 187-199. 1977.

TREPTOW, W. **Canais iônicos dependentes de voltagem: formulação de uma teoria geral para excitabilidade celular**. 2003. 72. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Biologia Molecular - Universidade de Brasília. Brasília

Treptow W, Tarek M. Environment of Gating Charges in the Kv1.2 Shaker Potassium Channel. **Biophysical Journal**. 90. L60-L63. 2006.

Tristram-Nagle S, Petrache HI, Nagle JF. Structure and interactions of fully hydrated dioleoylphosphatidylcholine bilayers. **Biophysical Journal**. 75. 917–925. 1998.

Tuckerman ME, Martyna GJ. Understanding modern molecular dynamics: Techniques and applications. **Journal of Physical Chemistry. B** 104. 1117-1128. 2000.

Valincius G, Heinrich F, Budvytyte R, Vanderah, McGillivray DJ, Sokolov Y, Hall JE, Lösche. Soluble Amyloid b-Oligomers Affect Dielectric Membrane Properties by Bilayer Insertion and Domain Formation: Implications for Cell Toxicity. **Biophysical Journal**. 95. 4845–4861. 2008.

van Gunsteren WF, GROMOS. Groningen Molecular Simulation Program Package. University of Groningen. Groningen. 1987.

van Gunsteren WF, Berendsen HJC. Computer simulation of molecular dynamics: methodology, applications, and perspectives in chemistry. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.** 29. 992-1023. 1990.

Vivcharuk V, Tomberli B, Tolokh IS, Gray CG. Prediction of binding free energy for adsorption of antimicrobial peptide lactoferricin B on a POPC membrane. **Physical Review E.** 77. 031913-1/031913-11. 2008.

Zhelev DV, Stoicheva N, Scherrer P, Needham D. Interaction of Synthetic HA2 Influenza Fusion Peptide Analog with Model Membranes. **Biophysical Journal.** 81. 285–304. 2001.

Wee CL, Bemporad D, Sands ZA, Gavaghan D, Sansom MSP. SGTx1, a Kv channel gating-modifier toxin, binds to the interfacial region of lipid bilayers, **Biophysical Journal.** 92. L07–L09. 2007.

White SH, Wiener MC. Determination of the structure of fluid lipid bilayer membranes. In *Permeability and Stability of Lipid Bilayers*. **CRC Press, Boca Raton.** FL: 1–19. 1995.

White SH, Wimley WC. Hydrophobic interactions of peptides with membrane interfaces. **Biochimica et Biophysica Acta.** 1376. 339-352. 1998.

Wimley WC, White SH. Determining the Membrane Topology of Peptides by Fluorescence Quenching. **Biochemistry.** 39. 161-170. 1999.

White SH. The progress of membrane protein structure determination. **Protein Science.** 13. 1948-1949. 2004.

Yeh IC, Olson MA, Lee MS, Wallqvist A. Free-Energy Profiles of Membrane Insertion of the M2 Transmembrane Peptide from Influenza A Virus. **Biophysical Journal.** 95. 5021-5029. 2008.