

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA

SBI-IFUSP



305M810T2497

25/10/96

**DINÂMICA MOLECULAR DE PEPTÍDEOS NA
INTERFACE MEMBRANA-ÁGUA**



Tese apresentada ao Instituto de Física da
Universidade de São Paulo, para a obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Amando Siuiti Ito

Orientador: Prof. Dr. Amando Siuiti Ito
Co-orientador: Prof. Dr. Paulo M. Bisch

Banca examinadora:

Prof. Dr. Laerte de Oliveira - EPM-UFSP

Prof. Dr. Otaciro Rangel Nascimento - IF - S.Carlos - USP

Prof. Dr. José Ruggiero - IBILCE - S.J.Rio Preto - UNESP

Profa. Dra. Vera B. Henriques - IFUSP

PEDRO GERALDO PASCUTTI

São Paulo
1996

Iberê Luiz Caldas
Prof. Iberê Luiz Caldas
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

535.352

P281d

D

ex. 1

FICHA CATALOGRÁFICA

**Preparada pelo Serviço de Biblioteca e Informação
do Instituto de Física da Universidade de São Paulo**

Pascutti, Pedro Geraldo

**Dinâmica Molecular de Peptídeos na Interface
Membrana-Água.**

**Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo.
Instituto de Física. Departamento de Física Geral.**

**Área de Concentração: Física da Matéria Condensada
Orientador: Prof. Dr. Amando Siuiti Ito**

**Unitermos: 1. Dinâmica Molecular; 2. Peptídeos;
3. Imagens Eletrostáticas; 4. Estruturas Secundárias;
4. Fluorescência do Triptofano.**

USP/IF/SBI - 39/96

A Lima, Cris, Lúcia e Otávio

Agradecimentos

É com grande satisfação que agradeço ao Amando pela orientação, pela amizade, pela liberdade e pelo companherismo nas horas difíceis. Agradeço igualmente ao Paulo pela co-orientação, pela idéia do projeto e pelas condições que criou para a realização do mesmo. Agradeço imensamente ao Kleber pelo trabalho inicial com o Thor, sem o qual esse projeto não poderia concretizar-se.

Meus agradecimentos ao Américo pelas lições de programação e unix, à Beth, Lea, Carla e ao Piquini pela interação e ao Fernando e à Marta pelas discussões, críticas e sugestões.

Agradeço aos amigos João, Clélia, Ernesto, Márcia Biaggi, Celino, Petricio, Márcia, Máximo, Janete, Chico, Maria, Carlão, Izilda, Ibrain, Silvia, Celoni, Gilka, Katia, Elias, Laurent, Flávio, J. Chaves, Cláudio, André, Aninha, Tânia, Terexa e Regina pelo constante apoio.

Aos amigos do IFFUSP, do Instituto de Biofísica da UFRJ, do Instituto de Química da USP em São Carlos e do CBPF meu muito obrigado por todos esses anos de companherismo e apoio.

Agradeço à Lina pelo amor e paciência com que esperou por dias melhores. Agradeço aos meus pais, irmã, familiares e amigos por compreenderem minha ausência nesses últimos tempos.

Agradeço à CAPES pela bolsa de estudos.

Resumo

Um programa computacional foi desenvolvido para otimização de geometria e simulação de dinâmica molecular baseado em um campo de forças clássicas parametrizado. O solvente foi considerado como um contínuo eletrostático e a interface entre o meio aquoso e o interior de uma membrana biológica como uma superfície de descontinuidade dielétrica, tratada pelo “método das imagens eletrostáticas”. Nesse método, o campo de polarização produzido na superfície de descontinuidade por uma carga pontual é representado por uma carga fictícia, colocada na fase oposta, cuja distância e sinal é definida pelas condições de contorno na superfície. Diversos sistemas foram estudados, tanto em solventes contínuos como na presença de superfícies de descontinuidade: a) Foram estudadas as distribuições populacionais dos rotâmeros do triptofano na forma zwitteriônica e no peptídeo Ala-Trp-Ala, em solvente polar e apolar. Foi demonstrado que a dinâmica do triptofano e as populações de rotâmeros são compatíveis com as observações experimentais de fluorescência resolvida no tempo e NMR; b) Em um estudo das conformações em polialanina, verificou-se que a estabilidade da estrutura secundária hélice- α é um efeito cooperativo entre pontes de hidrogênio em solvente de baixa constante dielétrica. Na presença da interface água-membrana, a hélice- α anfílica de um modelo para a β -endorfina estabiliza-se sobre a interface. Um comportamento anfílico foi também observado na seqüência sinal para o receptor- λ da *e. coli*, a qual estabilizou-se perpendicularmente à interface, na conformação parcial hélice- α proposta na literatura; c) Em um estudo sobre o hormônio α -MSH observou-se que, em solvente polar, de uma conformação helicoidal ele passa para uma conformação estendida. Porém, ao atravessar para o interior hidrofóbico de uma membrana, o peptídeo estabiliza-se em dobra- β . Observou-se ainda que a estabilidade dessa conformação no interior da membrana é reforçada por pontes salinas entre os resíduos carregados do peptídeo, os quais formam um “caroço” hidrofílico circundado por resíduos hidrofóbicos. Esse arranjo estrutural está em concordância com o proposto para a conformação biologicamente ativa. De um modo geral, o modelo para biomembrana proposto no presente trabalho reproduziu o comportamento hidrofóbico, hidrofílico ou anfílico dos peptídeos estudados.

Abstract

A software was developed for optimisation of geometry and molecular dynamics simulation, based on a parameterized classical force field. Solvent was assumed as an electrostatic continuum. The interface between the aqueous medium and the hydrophobic core of biological membranes was described by a surface of dielectric discontinuity, treated by the "method of images". In this method, the polarisation field produced at the surface of discontinuity by a point charge was represented by a fictitious charge, placed in the opposite phase. The position and signal of this charge-image were defined by boundary conditions at the surface. Several systems were studied, either in continuous solvent, as in the presence of discontinuity surfaces: a) the population distribution of tryptophan rotamers was studied in the zwitterion and in the peptide Ala-Trp-Ala, in polar and apolar solvents; the results for the tryptophan dynamics and the rotamers populations agree with experimental observations using time resolved fluorescence and NMR spectroscopies. b) analysis of polyalanin conformations showed that the stability of the α -helix is a cooperative effect between hydrogen bonds in low dielectric constant solvent; in the presence of the water-membrane interface, the amphiphilic α -helix of a β -endorphin model stabilizes on the interface; a similar behavior was observed in the signal sequence for the *E. Coli* λ -receptor, that stabilized perpendicular to the interface in a partial α -helix conformation, as proposed in the literature. c) calculations on melanotropic hormone α -MSH showed that in polar solvent it goes from helycoidal conformation to an extended one; in the presence of the interface water-membrane, the peptide goes into the interior of the membrane and stabilizes in a β -turn; the stability of this conformation was reinforced by salt bridges between charged residues, forming a hydrophilic core surrounded by hydrophobic residues; this structural arrangement agrees with the one proposed for the biologically active conformation of the hormone. In general terms, the model proposed here for the biomembrane was able to mimic the hydrophobic, hydrophilic or amphiphilic behavior of the peptides studied.

Índice

Introdução	1
Capítulo 1: O Campo de Força	3
1.1 - Potenciais harmônicos	4
1.2 - Potencial torcional	7
1.3 - Interação de Van der Waals	8
1.4 - Interação eletrostática	9
1.5 - Função energia potencial total	14
Capítulo 2: Métodos das Imagens Eletrostáticas	16
2.1 - Carga puntiforme em presença de interface entre dielétricos	16
2.2 - Molécula contendo N cargas em presença de interface entre dielétricos	19
Capítulo 3: Otimização da Geometria Molecular	26
3.1 - O algoritmo <i>steepest-descent</i> para minimização de energia	26
Capítulo 4: Simulação por Dinâmica Molecular	31
4.1 - O algoritmo de Verlet	33
4.2 - O algoritmo <i>summed Verlet</i> ou <i>leapfrog</i>	34
Capítulo 5: Efeitos da Polaridade do Solvente	38
5.1 - Um estudo sobre o triptofano	38
5.1.1 - Métodos	40
5.1.2 - Resultados e discussão	43
5.2 - Estabilidade de hélice- α em polialanina	55
5.2.1 - Métodos	56
5.2.2 - Resultados e discussão	56
5.3 - Peptídeos na interface água-membrana	62
5.3.1 - Métodos	63
5.3.2 - Resultados e discussão	64
Capítulo 6: Estudo de uma Seqüência Sinal na Interface Água-Membrana	68
6.1 - Métodos	70
6.2 - Resultados e discussão	71
Capítulo 7: Dinâmica Molecular do α-MSH em Presença de Membrana	82
7.1 - Métodos	84
7.2 - Resultados e discussão	87
Capítulo 8: Conclusões	104
Referências Bibliográficas	109
Apêndices	114

Introdução

O desenvolvimento de técnicas de modelagem molecular abre a perspectiva de um grande avanço na compreensão de processos biológicos a nível atômico-molecular e na proposta de novas estruturas moleculares com elevada eficiência biológica. Entretanto, a aplicação dessas técnicas tem geralmente se restringido à simulação de uma única molécula, independente do meio solvente. A ação de muitos fármacos, hormônios e proteínas de membrana é em grande parte dependente da conformação espacial que essas moléculas assumem no meio inhomogêneo, formado pela membrana e sua vizinhança. No presente trabalho é apresentado um modelo para tratar a descontinuidade água-membrana, em estudos de modelagem e dinâmica molecular. Esse modelo foi proposto em 1992, quando teve início o projeto Thor (Mundim et al., 1992). Não significando uma sigla, Thor é o nome de um programa computacional piloto para modelagem e dinâmica molecular. As justificativas desse projeto baseiam-se na necessidade do desenvolvimento de um programa aberto e flexível, para atender a comunidade acadêmica. Seu caráter interdisciplinar possibilita a participação nele de pesquisadores de diversas áreas, colaborando tanto no seu desenvolvimento como na sua adaptação a sistemas específicos.

O tratamento átomo a átomo do sistema formado por peptídeos e a interface membrana-água é ainda limitado pelos recursos computacionais disponíveis, os quais permitem apenas a simulação dos movimentos em um conjunto de alguns milhares de átomos por poucos nanossegundos. A alternativa proposta no presente trabalho foi a simulação dos dois solventes por um contínuo eletrostático e a interface entre eles por uma superfície de descontinuidade dielétrica. Assim, no programa, somente os átomos dos peptídeos são simulados de forma explícita e sua interação com a interface membrana-água é considerada utilizando o “método das imagens eletrostáticas”.

Neste trabalho é exposto, no primeiro capítulo, o Campo de Força molecular utilizado no programa. É discutido cada termo da função energia potencial enfatizado-se o termo coulombiano, o qual é modificado no segundo capítulo para a simulação da interface água-membrana. No terceiro capítulo é apresentado o algoritmo *steepest-descent*, o qual é utilizado no programa para a minimização de energia. O algoritmo *leapfrog* utilizado na Dinâmica Molecular é exposto no quarto capítulo. Nos capítulos seguintes são apresentados exemplos de aplicação sobre alguns sistemas. Inicialmente é feito um estudo sobre o triptofano, onde avalia-se o modelo para as interações

atômicas utilizado no Campo de Força. Em seguida o modelo para a interface água-membrana é aplicado no estudo de peptídeos, avaliando-se as variações na energia interna das moléculas e suas trajetórias, relacionando-as com as conformações e distribuições de cargas. Um estudo mais detalhado é feito para dois casos de peptídeos com ação biológica em membrana, um para a sequência sinal do receptor- λ da *E. Coli* e outro para o α -MSH (hormônio estimulador de melanócitos). Com este último foi introduzida uma segunda interface para simular a membrana biológica com uma espessura finita. As conclusões são apresentadas no último capítulo, onde destacam-se a importância das interações eletrostáticas na migração molecular em relação a interface água-membrana e seu papel na hidrofobicidade.

A preparação dos arquivos de entrada para o programa Thor, com as coordenadas atômicas e a coleção de parâmetros, é descrita na seção de metodologia em cada capítulo, onde também são expostos alguns detalhes do funcionamento do programa. Nos Apêndices A, B e C são apresentados exemplos de arquivos de entrada para o programa. O Thor aceita qualquer conjunto de parâmetros compatível com sua função energia potencial. Os parâmetros aqui utilizados são os do Campo de Força GROMOS (*Groningen Molecular Simulation*) que é livre para o uso acadêmico.

1 O Campo de Força

Um sistema molecular seria descrito mais exatamente pela resolução quanto-mecânica do problema para cada geometria. Porém, o elevado número de átomos de um sistema biológico e as atuais limitações computacionais requerem a sua representação física através de uma relativamente simples função potencial, ou campo de força. Genericamente atribui-se a denominação de Campo de Força à descrição de um sistema de muitas partículas pela sobreposição de termos simples, que descrevem a interação entre duas, três ou quatro partículas. Para o tratamento de centenas ou milhares de átomos como proteínas e ácidos nucleicos são introduzidas funções potenciais empíricas, calibradas por informações experimentais e cálculos quânticos sobre pequenas moléculas. Frequentemente se refere ao conjunto desses parâmetros de ajuste, juntamente com as respectivas funções, como “campo de força molecular” (Brooks III et al., 1988; van Gunsteren & Berendsen, 1990).

Na simulação da dinâmica molecular, as forças que atuam sobre cada átomo são obtidas calculando-se a primeira derivada do potencial em relação às posições desses átomos. A partir dessas forças resolve-se as equações do movimento para descrever como as posições atômicas variam com o tempo. A cada passo da dinâmica as forças são então reavaliadas. Esse processo iterativo sobre um elevado número de átomos impõe que a função para a energia potencial seja baseada em um compromisso entre acurácia e simplicidade. Ela deve ser complexa o suficiente para uma análise acurada e realística da estrutura e da dinâmica do sistema e, ao mesmo tempo, simples o suficiente para que os cálculos sejam efetuados com rapidez e baixo custo computacional, possibilitando que a evolução temporal do sistema seja longa o bastante para uma significativa amostragem do espaço de configurações.

Diversas funções potenciais têm sido propostas (Brooks et al., 1983; Weiner et al., 1984 e 1986; van Gunsteren & Berendsen, 1987; Clark et al. 1989). Como fatores comuns entre elas aparecem termos harmônicos para descrever ligações covalentes entre pares de átomos e ângulos entre ligações químicas vizinhas, um termo torcional para descrever rotações em torno de ligações e termos para descrever interações entre átomos não ligados, que levam em conta a não interpenetração atômica, a dispersão, atrações e repulsões eletrostáticas.

1.1 Potenciais harmônicos

À temperatura ambiente, os comprimentos das ligações químicas oscilam próximos ao seu valor de equilíbrio, obedecendo a uma função potencial aproximada à de Hooke para um sistema de massas unidas por molas, na forma:

$$V_b = \frac{1}{2} K_b (b - b_0)^2 \quad [1.1]$$

em que K_b é a constante de Hooke associada à ligação química específica, b é o comprimento da ligação em um instante qualquer (Figura-1.1) e b_0 o parâmetro que define o comprimento de equilíbrio da ligação.

As vibrações características das moléculas são determinadas pelas massas atômicas e pela natureza das ligações químicas. Um sistema molecular obedece a mecânica quântica, de maneira que somente certos valores são permitidos para a energia de vibração. As energias desses estados vibracionais permitidos podem ser obtidas substituindo-se o potencial da Eq.-1.1 na equação de Schrödinger, que para uma molécula diatômica tem a solução:

$$E_{\text{vib}} = (n + \frac{1}{2})h/2\pi(\mu/K_b)^{1/2} \quad n = 0, 1, 2, \dots$$

na qual n é o número inteiro que define a energia do estado vibracional permitido, h é a constante de Planck, $\mu = m_1m_2/(m_1+m_2)$ é a massa reduzida da molécula e K_b é o mesmo da Equação-1.1. Em um estudo por espectroscopia de infravermelho admite-se que a absorção de radiação pela molécula pode fazer com que a mesma passe do estado vibracional de $n = 0$ para o estado vibracional de $n = 1$. Comparando a energia ($E = hv$) do fóton absorvido com a diferença em energia (ΔE) entre esses estados vibracionais, pode-se estimar um valor para a constante K_b . Dessa forma, valores para K_b podem ser obtidos a partir do cálculo dos modos normais, comparados a espectros vibracionais para a respectiva ligação química em pequenas moléculas, e inseridos em campos de forças para o tratamento clássico de macromoléculas (Barrow, 1976; Nilsson & Karplus, 1986).

Estudos por cristalografia de raios-X sobre peptídeos simples atribuem ao comprimento médio b_0 da ligação peptídica C-N um valor de 1,33 Å, enquanto que para a ligação N-C $_{\alpha}$ 1,46 Å (Figura-1.1). Desde que o comprimento médio para a dupla-ligação C=N em compostos modelo situa-se em torno de 1,27 Å, pode-se atribuir à ligação peptídica um caráter de dupla-ligação parcial. Tal comportamento se deve à deslocalização da dupla-ligação da carbonila vizinha de maneira que o orbital

molecular- π se estenda sobre todos os três átomos O-C-N. Resultados de raios-X mostram ainda que os seis átomos $C_{\alpha}CONHC_{\alpha}$, são coplanares, o que é uma consequência do caráter de dupla-ligação para a ligação peptídica (Pethig, 1979).

Da mesma forma que para as ligações químicas, as oscilações dos ângulos entre as mesmas também podem ser descritas por um potencial harmônico:

$$V_{\theta} = \frac{1}{2} K_{\theta}(\theta - \theta_0)^2 \quad [1.2]$$

onde θ é o ângulo entre duas ligações químicas consecutivas (Figura-1.1) e K_{θ} é a constante de Hooke para a restituição ao ângulo de equilíbrio θ_0 entre as duas ligações químicas. O valor de θ_0 dependerá de fatores como hibridação dos orbitais atômicos e simetria da região a que pertence na molécula.

Em alguns campos de força um terceiro potencial harmônico é definido para manter a estrutura tridimensional em um conjunto de quatro átomos, descrevendo ainda oscilações da mesma. Nesse potencial (Figura-1.2), um átomo central (átomo i) é ligado a três outros átomos (átomos j, k e l), na forma:

$$V_{\xi} = \frac{1}{2} K_{\xi}(\xi - \xi_0)^2 \quad [1.3]$$

onde ξ é o ângulo entre o plano formado pelos átomos i_j_k e o plano formado pelos átomos j_k_l (Figura-1.2) e K_{ξ} é a constante de Hooke para a restituição ao ângulo de equilíbrio ξ_0 entre esses dois planos. Este termo potencial é usado em campos de força onde os átomos de hidrogênio ligados a átomos de carbono, átomos de hidrogênio não polares como será explicado posteriormente, não são representados explicitamente. Tomando por exemplo como plano i_j_k o formado pelos átomos $C_{\alpha}N_C$ (como átomos i, j e k respectivamente) e como plano j_k_l o formado pelos átomos $N_C C_{\beta}$ (sendo C_{β} o átomo l) na Figura-1.2, o ângulo ξ_0 entre esses dois planos será 35.264° . Dessa forma é mantida a estrutura tetraédrica média do carbono- α e, analogamente, a de todos os outros semelhantes da molécula. (Brooks et al., 1983; van Gunsteren & Berendsen, 1987).

Um fato importante para o estudo de proteínas é que mantendo-se a seqüência $C_{\alpha}N_C C_{\beta}$ como átomos i_j_k_l respectivamente, na definição dos dois planos acima, garante-se que a cadeia lateral (que é um resíduo aminoácido; Figuras 1.1 e 1.4) fique na posição levógira do carbono- α . Para tratar polipeptídeos com cadeias laterais na posição destrógira é necessário inverter os átomos centrais na seqüência de

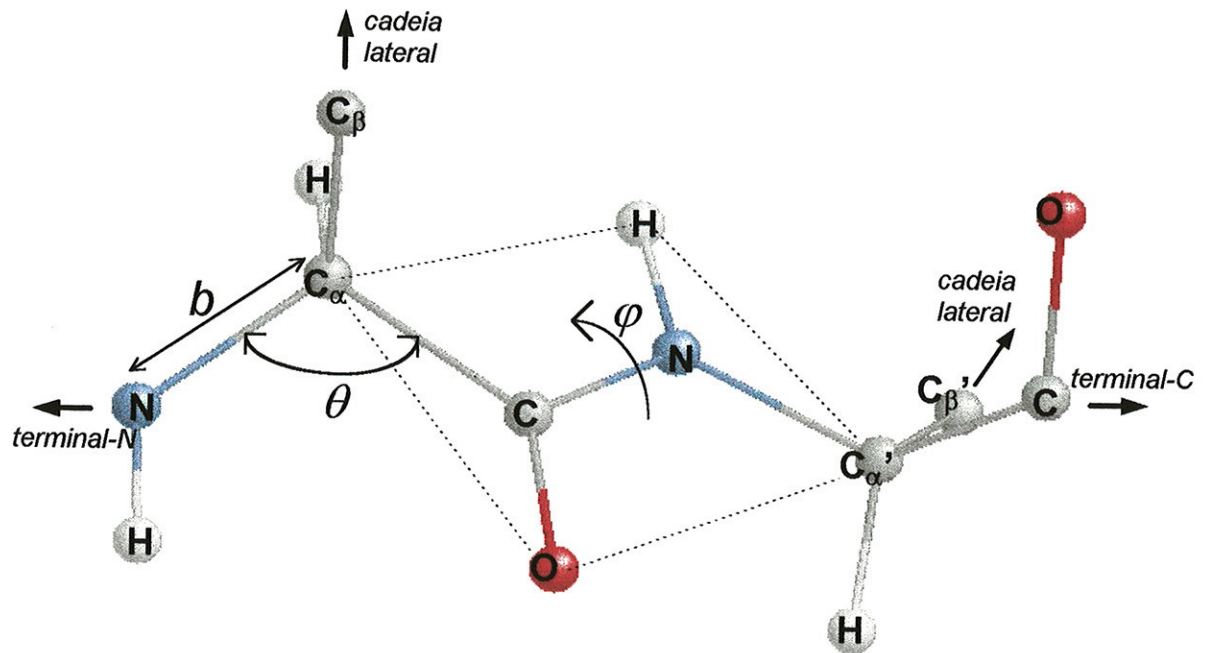


Figura-1.1 Esqueleto peptídico; b é o comprimento das ligações químicas; θ é o ângulo entre duas ligações consecutivas e φ é o ângulo torcional para ligações com liberdade de rotação (Na nomenclatura bioquímica os ângulos torcionais para as ligações do esqueleto peptídico N-C_α, C_α-C e C-N são denominados ϕ , ψ e ω respectivamente).

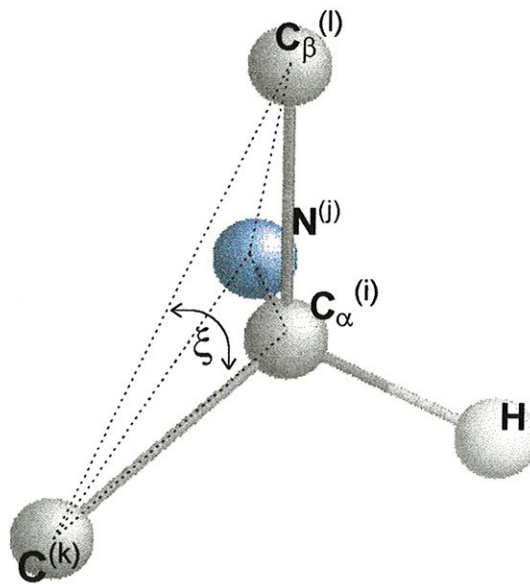


Figura-1.2 Estrutura tetraédrica do carbono- α . ξ é o ângulo entre os planos i_j_k e j_k_l .

maneira que $i_j_k_l$ sejam $C_\alpha_C_N_C_\beta$ respectivamente. Isto fará com que C_β troque de posição com H (Figura-1.2). O potencial na Equação-1.3, que é denominado pelas suas características Potencial Diedral Impróprio, é ainda aplicado para reforçar a coplanaridade dos átomos $C_\alpha\text{CONHC}_\alpha$ do esqueleto peptídico (Figura-1.1), situação em que ξ_0 é igual a zero. Uma outra aplicação para esse potencial harmônico é na manutenção de determinadas conformações para quatro átomos ligados em seqüência, por exemplo em anéis aromáticos, onde se deseja manter a estrutura planar.

1.2 Potencial torcional

A rotação em torno de ligações químicas é considerada na maioria dos campos de força com a introdução de um termo torcional, ao qual se refere como Potencial Diedral Próprio. Ele descreve a simetria rotacional pelas barreiras e mínimos de energia para a torção de cada ligação química com liberdade de rotação. Normalmente toma-se o termo mais baixo de uma expansão cosseno na forma (Brooks III et al., 1988):

$$V_\varphi = K_\varphi [1 + \cos(n\varphi - \delta)] \quad [1.4]$$

na qual K_φ é a constante que define a altura da barreira de rotação, n é o número de mínimos para a torção de uma ligação química específica, φ é o ângulo diedral para a ligação central em uma seqüência de quatro átomos e δ é a defasagem no ângulo diedral que pode colocar na posição φ igual a zero um ponto de máximo ou de mínimo. Por exemplo, novamente a ligação peptídica na Figura-1.1, para a qual se aplica a Equação-1.4 sobre o diedro $C_\alpha\text{-C-N-C}_\alpha$, com os parâmetros $K_\varphi = 8.0$ Kcal/mol.radiano², $n = 2$ mínimos e $\delta = 180^\circ$. Para φ igual a zero ou 180 graus o potencial V_φ será igual a zero, concordando com a coplanaridade do diedro discutida anteriormente (van Gunsteren & Berendsen, 1987).

Em proteínas, o valor do ângulo torcional para o diedro $C_\alpha\text{-C-N-C}_\alpha$ (Figura-1.1) aparece quase sempre em torno do mínimo em zero graus (conformação trans) o que proporciona maior flexibilidade à cadeia. Além disso, a barreira para rotação da ligação C-N segundo os parâmetros acima é de 16 Kcal/mol, sendo praticamente intransponível a temperaturas ordinárias. As mudanças conformacionais sofridas pelo esqueleto peptídico são principalmente devido as rotações em torno das ligações N- C_α e $C_\alpha\text{-C}$, cujas barreiras rotacionais são acessíveis à temperatura ambiente. Os valores de todos os ângulos diedrais C-N- $C_\alpha\text{-C}$ e N- $C_\alpha\text{-C-N}$ (ângulos ϕ e ψ na literatura

bioquímica) de uma proteína definem sua estrutura secundária. Uma conformação biologicamente relevante de uma proteína geralmente é composta por diversos fragmentos em estrutura secundária periódica, como hélices- α e folhas- β (Figura-1.3).

De maneira análoga à obtenção de K_b e b_0 para o potencial harmônico da Equação-1.1, as constantes e posições de equilíbrio nas Equações 1.2, 1.3 e 1.4 são obtidas por cálculos quânticos sobre pequenas moléculas, aliados a informações estruturais obtidas experimentalmente e à “intuição química”. Parâmetros obtidos somente a partir de cálculos *ab-initio* geralmente não resultam em campos de força satisfatórios, sendo necessário o emprego de dados de estrutura cristalina, de propriedades de líquidos, de espectroscopias de raios-X, infravermelho, ressonância magnética nuclear (NMR), etc (Brooks III et al., 1988; van Gunsteren & Berendsen, 1990). Os valores dos parâmetros nos potenciais harmônicos e torcional estão relacionados às particularidades de cada ligação química e sua vizinhança, tornando-se assim fatores limitantes na universalização de um campo de força. Para moléculas onde elétrons- π estão presentes, por exemplo, o comprimento das ligações, as alturas das barreiras torcionais e as posições dos mínimos de energia dependerão de como esses elétrons se deslocalizam pela molécula. Dessa forma, uma ligação entre um mesmo tipo de par de átomos pode ter diferentes valores para K_b , b_0 , K_φ e δ em diferentes moléculas. Em uma recente revisão da literatura, Halgren (1995), discute os avanços na metodologia de parametrização de campos de força e novas funções potenciais para biomoléculas.

1.3 Interação de van der Waals

As interações entre átomos não ligados quimicamente podem ser tratadas por potenciais efetivos, compostos por termos de curto e longo alcance que incluem a repulsão e atração de van der Waals e o termo eletrostático de Coulomb. Quando não há reações químicas, duas moléculas separadas interagem entre si obedecendo a potenciais desse tipo. Em uma molécula individual, com exceção dos primeiros e segundos vizinhos quimicamente ligados, cujas interações são tratadas pelos potenciais harmônicos já descritos, a interação de cada átomo com os outros átomos da molécula é também descrita por termos de van der Waals e Coulomb. As conformações das macromoléculas no meio biológico são definidas em grande parte por interações intramoleculares entre átomos não diretamente ligados e por interações intermoleculares com o solvente obedecendo a esses potenciais.

O termo repulsivo de van der Waals surge com a correção na equação de estado dos gases ideais ($PV = nRT$) para considerar o volume excluído no estudo dos gases reais. Microscopicamente, ele é atribuído à combinação da repulsão interatômica com o princípio de exclusão de Pauli. Este termo é de curtíssimo alcance, de maneira que a energia potencial aumenta rapidamente com a aproximação entre os núcleos atômicos devido a não interpenetração dos átomos não ligados quimicamente e ao fato do diâmetro atômico ser finito e quase invariável. O curto alcance da repulsão de van der Waals é tal que sua representação pelo modelo de esferas rígidas, por Ramachandran (1963), teve sucesso na predição das estruturas secundárias permitidas para proteínas.

A tendência de todos os gases se condensarem a baixas temperaturas é atribuída a forças atrativas que superam a energia cinética das moléculas nessas temperaturas. O termo atrativo de van der Waals surge com a correção na pressão, no tratamento dos gases reais, para incluir os efeitos dessas forças atrativas. Microscopicamente, ele é atribuído a pequenas flutuações na distribuição de cargas de um átomo na presença de outro átomo, as quais fazem surgir uma interação atrativa dipolo-dipolo. Esta interação, ou dispersão de London, varia com o inverso da sexta potência da distância de separação entre os núcleos atômicos, sendo relativamente de curto alcance. Este termo atrativo é associado ao repulsivo, descrito anteriormente, para compor o potencial de Lennard-Jones (ou de van der Waals) no qual a repulsão interatômica varia com o inverso da décima segunda potência da distância “r” que separa os núcleos:

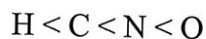
$$V_{LJ} = 4\epsilon [(\sigma/r)^{12} - (\sigma/r)^6] \quad [1.5]$$

em que ϵ é a profundidade do poço entre a barreira atrativa e a repulsiva e σ é o diâmetro de Lennard-Jones. Ambos são parâmetros ajustados experimentalmente e por cálculos teóricos. O poço negativo entre os dois termos potenciais é o responsável pela coesão nas fases condensadas e é também importante na estabilização conformacional de macromoléculas (Allen & Tildesley, 1987; Brooks III et al., 1988).

1.4 Interação eletrostática

Quando uma ligação química é formada entre dois átomos diferentes os elétrons que a constituem poderão se deslocalizar preferencialmente sobre um dos átomos devido às diferentes eletronegatividades. Como consequência a maioria das

ligações covalentes são pequenos dipolos elétricos, cuja magnitude dependerá da diferença em eletronegatividade dos átomos que as compõem. Por exemplo, os átomos mais abundantes em biomoléculas:



estão em ordem crescente de eletronegatividade. A disposição desses átomos no esqueleto peptídico (Figuras 1.1 e 1.4), contribui para uma distribuição de cargas parciais bastante significativa para a estabilização das estruturas secundárias nas proteínas. Isto se dá devido à formação de pontes de hidrogênio ($C=O \dots H-N$) entre várias partes do esqueleto peptídico na ausência de água (Figura-1.3). Nas superfícies expostas ao solvente aquoso, as pontes de hidrogênio podem formar-se com a própria água. Uma outra fonte para o campo eletrostático molecular vem dos grupos ionizáveis, os quais podem contribuir com cargas formais que aparecem também distribuídas por vários átomos vizinhos.

Um método bastante usado para a determinação de cargas atômicas parciais é o cálculo *ab-initio* da densidade de cargas no estado eletrônico fundamental, a partir do qual as cargas atômicas obtidas com a análise populacional de Mulliken ou Löwdin são refinadas com dados experimentais (Brooks III et al., 1988). Sharp (1994) discute alguns métodos para a determinação de cargas atômicas em macromoléculas considerando efeitos causados pelo solvente, pela polarizabilidade atômica e pelas contribuições não-polares. Em campos de força moleculares, as cargas parciais são colocadas no ponto central dos átomos, os quais são dimensionados no termo de van der Waals. Para ilustrar esse modelo atômico, na Figura-1.4 é apresentado um peptídeo onde as cargas parciais foram obtidas por um cálculo *ab-initio* e aparecem centradas em esferas de van der Waals.

A deslocalização eletrônica nas ligações C-H é estimada em 0,05 elétron (Pething, 1979), chegando a 0,10 elétron para cálculos no vácuo (Figura-1.4), fazendo com que esse grupo não estabeleça pontes de hidrogênio. Como consequência, em alguns campos de força esses átomos são representados agrupados, na aproximação de “átomo-unido”, somando-se suas massas e ajustando-se o termo de van der Waals. São introduzidos assim os pseudoátomos CH, CH₂ e CH₃ com carga residual zero e massas atômicas 13, 14 e 15 respectivamente. Os átomos de hidrogênio representados de forma explícita são somente os polares, aqueles ligados a nitrogênio ou oxigênio. Esta aproximação é válida quando não se pretende uma análise refinada ou

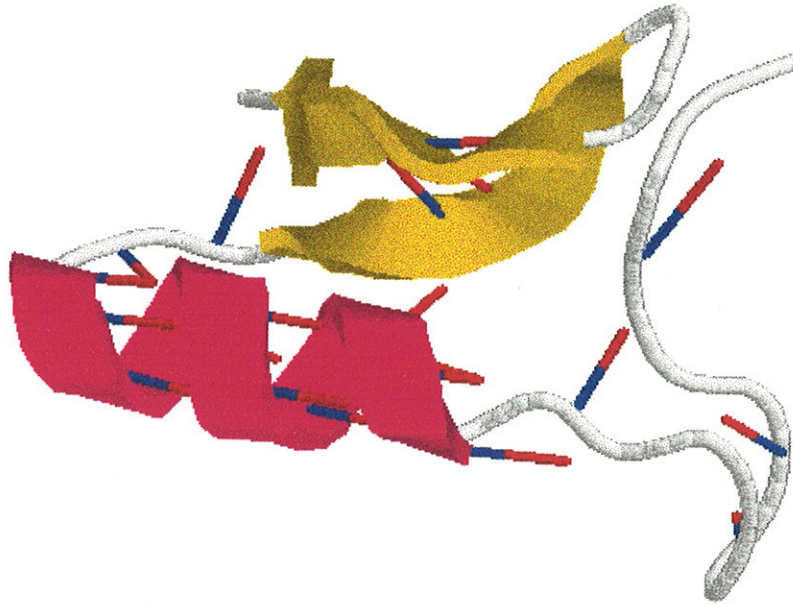


Figura-1.3 Estruturas secundárias da proteína "insect defensin": folhas- β antiparalelas (acima); hélice- α (abaixo); pontes de hidrogênio (bastões). (coordenadas extraídas do arquivo 1ica do "protein data bank").

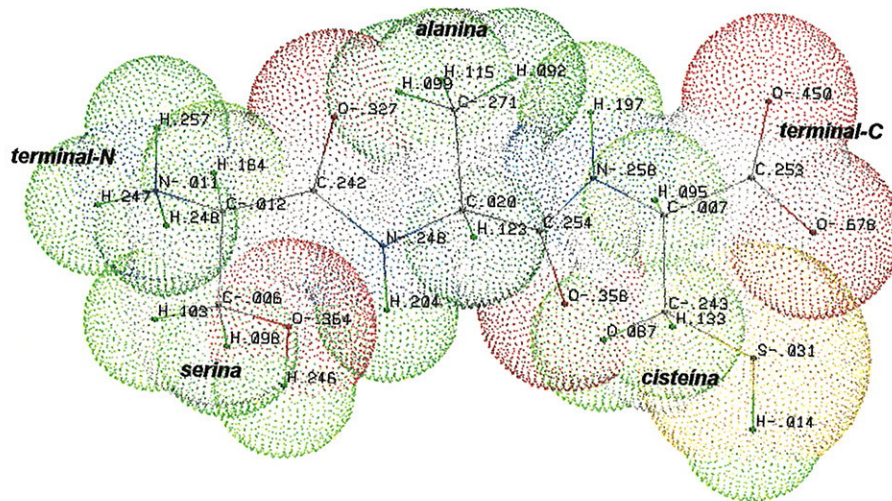


Figura-1.4 Cargas atômicas parciais centradas em esferas de van der Waals. (cargas parciais de Löwdin obtidas com a base N31-6G** usando o programa GAMESS; Schmidt et al.. 1993).

quantitativa das estruturas moleculares e apresenta a vantagem da redução do número de átomos do sistema para próximo da metade.

A energia potencial eletrostática é dada pela lei de Coulomb:

$$V_{\text{Col.}} = q_i q_j / 4\pi\epsilon_0\epsilon r \quad [1.6]$$

onde q_i e q_j são as cargas residuais sobre os átomos i e j , separados pela distância r . ϵ_0 é a permissividade do espaço livre e ϵ é a constante dielétrica que corrige ϵ_0 para considerar a polarizabilidade do meio. O campo elétrico devido a uma carga q é reduzido de um fator $1/\epsilon$ devido à polarização dos átomos do meio, a qual gera um campo que se opõe ao da carga q (Reitz et al., 1982; Jackson, 1983).

A interação eletrostática varia com o inverso da distância de separação entre os átomos, sendo portanto de longo alcance. Num ambiente biológico os grupos carregados e polares nas macromoléculas, a água e os íons fazem com que o número de efeitos eletrostáticos seja grande. A importância da energia eletrostática para os sistemas biológicos vem do fato de ela ser o resultado da soma de um elevado número de interações fracas e de longo alcance, ao passo que a contribuição devido aos outros potenciais resulta da soma de um pequeno número de interações fortes e de curto alcance. Logo, uma simulação ideal de um sistema biológico consideraria explicitamente todos os átomos do sistema, suas polarizabilidades e seu comportamento dinâmico, levando em conta todas as interações de curto e longo alcance. Nesse caso poderia ser descartado o uso de uma constante dielétrica. Na prática porém surgem diversos problemas como o da interação entre muitos corpos, que dificultaria, por exemplo, o tratamento da polarização atômica. Os efeitos de superfície devido às fronteiras do sistema, a inexistência de um raio de corte efetivo para o truncamento do longo alcance da interação coulombiana e o custo computacional, que cresce com o quadrado do número de átomos, são outros problemas. Esses fatores tornam plausível o uso do conceito macroscópico de uma constante dielétrica, podendo as moléculas do solvente serem simuladas implicitamente, como um meio eletrostático contínuo, ajustando-se o valor de ϵ (Rogers, 1989; Gilson, 1995).

A polarização atômico-molecular tem origem no deslocamento eletrônico em átomos ou ligações químicas e na orientação de pequenas moléculas polares, ou grupos polares, como resposta a um campo elétrico externo. Para a molécula de água o momento de dipolo resultante muda de 1,85 D (Debye) para 2,50 D, quando ela passa

da fase gasosa para a líquida como consequência da polarização média entre as moléculas de água no estado líquido (van Belle, 1992; Halgren, 1995). Quando sujeita a um campo elétrico externo a constante dielétrica da água passa de 4,5 para 80, devido principalmente à sua polarizabilidade orientacional (Pething, 1979). Por outro lado, a constante dielétrica em solventes apolares é de somente 1,5 ou 2 como consequência da polarização eletrônica de suas moléculas constituintes em um campo externo, não havendo contribuição orientacional devido a ausência de momento de dipolo resultante nessas moléculas (Gilson, 1995).

A crescente disponibilidade e capacidade computacional tem levado ao desenvolvimento de métodos para a simulação explícita do solvente aquoso em sistemas biológicos. Os efeitos de superfície são evitados com o estabelecimento de condições periódicas de contorno e a introdução de ruídos na dinâmica, como consequência do truncamento da interação eletrostática, é reduzida por funções que suavizam o truncamento quando a distância entre as cargas se aproxima do raio de corte (Allen, 1987; van Gunsteren & Berendsen 1990; van Gunsteren et al., 1994). Diversos modelos para a molécula de água têm sido propostos levando-se em conta a sua polarizabilidade eletrônica, ao mesmo tempo em que se trabalha no desenvolvimento de maneiras práticas de incorporar a polarizabilidade, tanto do solvente como do soluto, diretamente em funções de energia potencial (van Belle, 1992; Brooks III, 1995; Halgren, 1995). A implantação no programa Thor de condições periódicas de contorno e a de um raio de corte para as interações de longo alcance, para a simulação explícita do solvente, está sendo efetuada por M. Cassiano (tese de doutorado em andamento no Instituto de Física da Universidade de São Paulo).

O método do contínuo, que é o uso de uma constante dielétrica para considerar a polarizabilidade do sistema e representar o solvente de forma implícita, tem sido também refinado. O interior hidrofóbico das proteínas solúveis em água tem constante dielétrica bastante inferior à do meio aquoso externo, o que levou ao modelo da cavidade num meio dielétrico para descreve-las. Neste modelo as cargas atômicas de uma proteína são consideradas explicitamente e imersas no interior de uma cavidade de forma arbitrária, que representa o meio de baixa polarizabilidade, com constante dielétrica inferior a 5. O solvente e suas cargas são representados como um contínuo eletrostático, com constante dielétrica 80, no exterior da cavidade (Rogers, 1989).

A alta constante dielétrica do meio externo modifica a interação entre as cargas em uma proteína como um resultado do campo de reação devido ao solvente polar.

Quando íons estão presentes na solução uma blindagem adicional ocorre devido a uma densidade de cargas no meio solvente, como resultado de uma distribuição de Boltzmann de íons. Este sistema pode ser representado pela cavidade num meio dielétrico, simulando-se os átomos da proteína explicitamente em seu interior. Os potenciais eletrostáticos são então descritos no meio interior pela equação de Poisson e no meio exterior pela equação de Poisson-Boltzmann, acopladas pelas condições de contorno apropriadas (Juffer et al., 1991; Sharp, 1994; Gilson, 1995). Quando a cavidade que circunda a proteína é esférica, o campo de reação devido às cargas no interior da cavidade pode ser aproximado pelo campo que é gerado por cargas imagens (Friedman, 1975; Rogers, 1989; van Gunsteren & Berendsen, 1990). O “método das cargas-imagens”, ou das “imagens eletrostáticas”, é aplicado no presente trabalho na descrição da interface entre o solvente aquoso e o meio hidrofóbico do interior das membranas biológicas e é apresentado posteriormente.

1.5 Função energia potencial total

Após a descrição de cada termo em separado, é possível agora a construção da função energia potencial total que é empregada no código computacional Thor. A função energia potencial de um sistema molecular constituído de N_{at} átomos com vetores posição \mathbf{r}_i ($i = 1, 2, \dots, N_{at}$) pode assumir a forma:

$$\begin{aligned}
 V(\{\mathbf{r}_i\}) = V(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_{N_{at}}) = & \sum_{n=1}^{N_b} \frac{1}{2} K_{b_n} (b_n - b_{0n})^2 + \sum_{n=1}^{N_\theta} \frac{1}{2} K_{\theta_n} (\theta - \theta_{0n})^2 + \\
 & + \sum_{n=1}^{N_\xi} \frac{1}{2} K_{\xi_n} (\xi_n - \xi_{0n})^2 + \sum_{n=1}^{N_\phi} K_{\phi_n} [1 + \cos(n_n \phi_n - \delta_n)] + \\
 & + \sum_{\substack{i < j \\ i=1 \\ j=1}}^{N_{at}} [C_{12}(i,j)/r_{ij}^{12} - C_6(i,j)/r_{ij}^6 + q_i q_j / 4\pi\epsilon_0 \epsilon r_{ij}] \quad [1.7]
 \end{aligned}$$

na qual os três primeiros termos a direita da igualdade correspondem aos potenciais harmônicos descritos nas Equações 1.1, 1.2 e 1.3 somados sobre as N_b ligações químicas, os N_θ ângulos entre pares de ligações consecutivas e os N_ξ ângulos diedrais impróprios respectivamente. O quarto termo a direita da igualdade corresponde ao potencial torcional descrito na Equação-1.4 somado sobre os N_ϕ ângulos diedrais próprios. O termo seguinte corresponde aos potenciais de van der Waals e Coulomb descritos nas Equações 1.5 e 1.6 somados sobre todos os pares de átomos i e j

excluindo-se os primeiros e segundos vizinhos quimicamente ligados, cujas interações são descritas pelos termos harmônicos. Os parâmetros ϵ e σ do potencial de van der Waals (Eq.-1.5) são substituídos pelas constantes $C_{12}(i,j)$ e $C_6(i,j)$, as quais tratam os grupos de átomos CH, CH₂ e CH₃ na aproximação de “átomo-unido” (van Gunsteren & Berendsen, 1987).

Algumas funções potenciais incluem outros termos para descrever, por exemplo, especificamente as pontes de hidrogênio ou para acoplar oscilações entre ângulos e comprimentos de ligação com o objetivo de se obter uma melhor concordância com espectros vibracionais (Brooks III et al., 1988; van Gunsteren & Berendsen, 1990). A escolha do campo de força depende, em grande parte, do sistema a ser estudado e das propriedades do mesmo que serão investigadas. Embora uma descrição refinada das vibrações atômicas seja relevante, as conformações das macromoléculas dependem mais das torções, das repulsões e atrações de van der Waals e das interações eletrostáticas. Além disso, mesmo em sistemas onde é usada a aproximação de “átomo-unido”, com a representação explícita somente dos átomos de hidrogênio polares e suas cargas pontuais, o termo coulombiano descreve satisfatoriamente as pontes de hidrogênio. A forma da função potencial na Equação-1.7 foi escolhida para o programa Thor devido à sua popularidade, por ela se adequar aos objetivos do programa e ainda satisfazer o compromisso entre simplicidade e acurácia (Brooks et al., 1983; van Gunsteren & Berendsen, 1987; Brooks III et al., 1988).

Parâmetros para proteínas e ácidos nucleicos, para a função potencial da Eq.-1.7, podem ser encontrados na literatura (Brooks, et al., 1983; Weiner et al., 1984 e 1986; Nilsson & Karplus, 1986; Clark et al. 1989). No presente trabalho é usada a função potencial da Equação-1.7 com os parâmetros K_b , b_0 , K_θ , θ_0 , K_ξ , ξ_0 , K_ϕ , n , δ , as constantes $C_{12}(i,j)$ e $C_6(i,j)$, bem como as cargas atômicas parciais, usados no campo de força GROMOS (van Gunsteren & Berendsen, 1987). Tais parâmetros são próprios para proteínas, ácidos nucleicos e açúcares, podendo ser adaptados para moléculas arbitrárias.

2 Método das Imagens Eletrostáticas

O “método das imagens eletrostáticas” é aplicado em problemas envolvendo cargas na presença de superfícies de meios condutores ou dielétricos. Basicamente ele consiste em substituir o problema real composto pelas cargas e superfícies, por um problema mais simples composto pelas cargas e suas imagens projetadas no interior do meio em questão. O campo elétrico, devido a densidade de cargas induzida na superfície de um meio condutor, ou devido a polarização da superfície de um meio dielétrico, na presença de uma carga q , é aproximado ao produzido por uma carga hipotética q' situada simetricamente em relação a posição onde estaria a superfície (Reitz et al., 1982; Jackson, 1983).

No presente estudo, o solvente é tratado implicitamente como um meio eletrostático contínuo, homogêneo e isotrópico, representado pela sua constante dielétrica ϵ . A superfície entre dois meios é tratada como uma descontinuidade em ϵ . A diferença entre a polarizabilidade do meio aquoso ($\epsilon = 80$) e a do meio hidrocarbonado, apolar, do interior das biomembranas ($\epsilon = 2$) torna possível a abordagem da interface entre esses dois meios pelo “método das imagens eletrostáticas”. Uma abordagem semelhante foi empregada por Jackson (1983), que usou este método para tratar uma carga puntiforme imersa num meio dielétrico semi-infinito ϵ_1 , na presença de uma superfície plana entre esse meio e um outro dielétrico semi-infinito ϵ_2 . Uma adaptação desse sistema para o tratamento de peptídeos, contendo N cargas atômicas, na presença da interface água/membrana é apresentada a seguir.

2.1 Carga puntiforme em presença de interface entre dielétricos

Conforme exposto na seção 1.4, a polarização é um efeito que tem origem no deslocamento eletrônico em átomos ou ligações químicas e na orientação de moléculas ou grupos polares em resposta a um campo elétrico externo. A polarização de um meio dielétrico depende portanto das propriedades atômico-moleculares desse meio e da intensidade do campo aplicado externamente. Admitindo-se que o meio seja isotrópico, que sua resposta seja linear com o campo aplicado e que este não tenha

intensidade elevada, o vetor polarização \mathbf{P} será paralelo ao vetor campo elétrico externo \mathbf{E} , de forma que:

$$\mathbf{P} = \chi_e \mathbf{E} \quad [2.1]$$

onde χ_e é o coeficiente de proporcionalidade entre a polarização e o campo elétrico externo, independe da direção destes e é denominado “susceptibilidade elétrica” do meio.

O campo elétrico macroscópico terá contribuições de \mathbf{E} e \mathbf{P} e é representado pelo vetor deslocamento elétrico \mathbf{D} (Reitz et al., 1982), tal que:

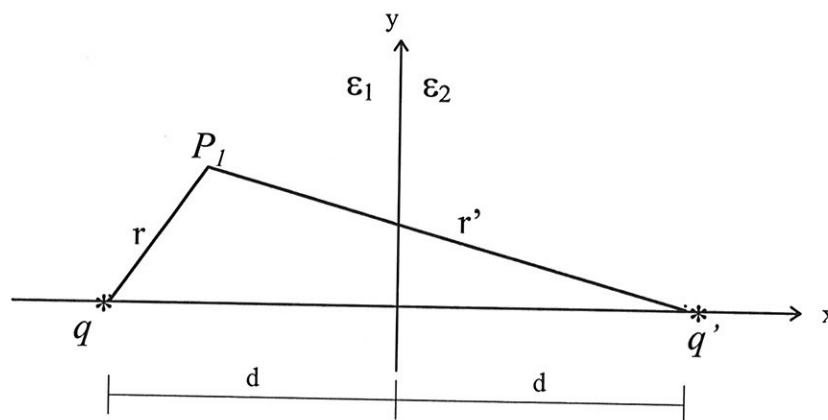
$$\mathbf{D} = \epsilon_0 \mathbf{E} + \mathbf{P} \quad [2.2]$$

Substituindo a Equação-2.1 na 2.2 obtém-se a equação:

$$\mathbf{D} = \epsilon_0 \mathbf{E} + \chi_e \mathbf{E} = (\epsilon_0 + \chi_e) \mathbf{E} = \epsilon \mathbf{E} \quad [2.3]$$

na qual ϵ é a permissividade do material, a qual se relaciona com a constante dielétrica por $\epsilon = \epsilon/\epsilon_0$ (Reitz et al., 1982).

Uma carga q situada a distância d de uma superfície entre dois meios, de constantes dielétricas ϵ_1 e ϵ_2 respectivamente, polariza esta superfície com uma densidade de carga de polarização que pode ser representada por uma carga q' , imagem de q , situada à mesma distância d no outro lado da superfície.



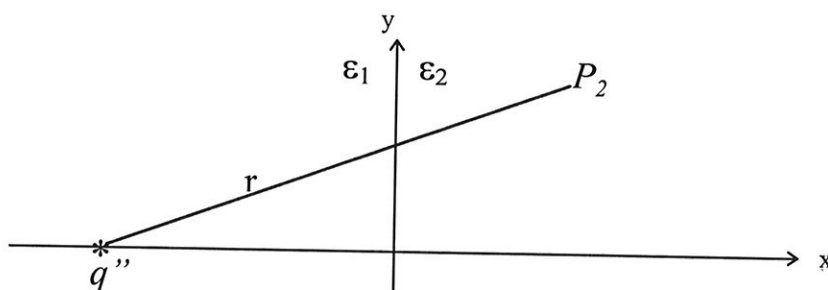
O potencial num ponto P_1 qualquer do meio de constante dielétrica ϵ_1 , o mesmo meio onde se encontra a carga q , tem contribuição de q e q' e é dado por:

$$\Phi_1 = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_1} [(q/r) + (q'/r')] \quad [2.4]$$

onde $r = [(x - d)^2 + y^2 + z^2]^{1/2}$ e $r' = [(x + d)^2 + y^2 + z^2]^{1/2}$.

Como na realidade não há cargas no meio de constante dielétrica ϵ_2 , o potencial nessa região é somente devido a carga q , porém corrigida para considerar a descontinuidade dielétrica na interface. Para levar em conta essa correção q é substituída por q'' de forma que o potencial em um ponto P_2 seja dado por:

$$\Phi_2 = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_2} [(q''/r)] \quad [2.5]$$



Os potenciais Φ_1 e Φ_2 devem satisfazer a duas condições de contorno:

1ª) continuidade do potencial eletrostático na superfície entre os meios:

$$\Phi_1 = \Phi_2 \quad \text{em } x = 0$$

2ª) continuidade da componente do deslocamento elétrico perpendicular à superfície:

$$\epsilon_1[\partial\Phi_1/\partial x] = \epsilon_2[\partial\Phi_2/\partial x] \quad \text{em } x = 0$$

Nesta última aplicou-se a dedução do vetor deslocamento da Equação-2.3 e a relação $\mathbf{E} = -\nabla\Phi$ (Reitz et al., 1982; Jackson, 1983). Igualando-se as Equações 2.4 e 2.5 para satisfazer a primeira condição de contorno obtém-se:

$$q + q' = (\epsilon_1/\epsilon_2)q'' \quad [2.6]$$

Calculando-se as derivadas parciais de Φ_1 e Φ_2 com relação a x , multiplicando-as pelas constantes dielétricas ϵ_1 e ϵ_2 respectivamente e igualando-as para satisfazer a segunda condição de contorno obtém-se:

$$q - q' = q'' \quad [2.7]$$

A solução do sistema formado pelas Equações 2.6 e 2.7 conduz a:

$$q' = q[(\epsilon_1 - \epsilon_2)/(\epsilon_1 + \epsilon_2)] \quad \text{e} \quad q'' = q[2\epsilon_2/(\epsilon_1 + \epsilon_2)]$$

que substituídas nas Equações. 2.4 e 2.5 levam aos potenciais Φ_1 e Φ_2 em função de q , nos pontos P_1 e P_2 respectivamente:

$$\Phi_1 = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_1} q[(1/r) + (\epsilon_1 - \epsilon_2)/(\epsilon_1 + \epsilon_2)r'] \quad [2.8]$$

$$\Phi_2 = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} 2q/(\epsilon_1 + \epsilon_2)r \quad [2.9]$$

2.2 Molécula contendo N cargas em presença de interface entre dielétricos

Devido a fatores como solubilidade e estabilidade, as proteínas solúveis em meio aquoso constituem-se, genericamente, em um “caroço” hidrofóbico circundado por uma região hidrofílica. Os resíduos aminoácidos apolares formam geralmente o interior e os resíduos polares ou carregados formam a superfície, em contato com o solvente polar. A discrepância entre as constantes dielétricas do interior dessas proteínas com relação à do solvente aquoso, levou ao modelo da cavidade em um meio dielétrico e ao “método das imagens eletrostáticas” para descrever o sistema, conforme mencionado na seção 1.4. Uma limitação desse método, apontada por Friedman (1975), Rogers (1989) e van Gunsteren & Berendsen (1990), consiste no fato de que a aproximação de uma carga à interface conduz igualmente à aproximação da carga-imagem, levando a um polo no potencial na superfície. Para proteínas solúveis em meio aquoso este problema é agravado pois as cargas formais nessas macromoléculas são encontradas geralmente na superfície.

No trabalho ora exposto não serão consideradas interações diretas com o solvente, de maneira que cada carga não “perceberá” o campo de reação gerado pela sua própria imagem, evitando assim a divergência da energia potencial eletrostática na superfície entre os meios, no caso o meio aquoso e o meio interior de uma biomembrana. Sobre cada carga q_i atuará o campo gerado por todas as outras cargas q_j da molécula e o campo de polarização devido a todas as imagens q_j' , excluindo-se os primeiros e segundos vizinhos quimicamente ligados. Pretende-se com isto a renormalização das interações eletrostáticas intramoleculares, a qual será empregada em peptídeos com ação biológica na membrana.

A energia potencial eletrostática entre um par de cargas q_i e q_j , apresentada na Equação-1.6, está relacionada com o potencial eletrostático Φ por:

$$V = q_i\Phi_i = q_j\Phi_j$$

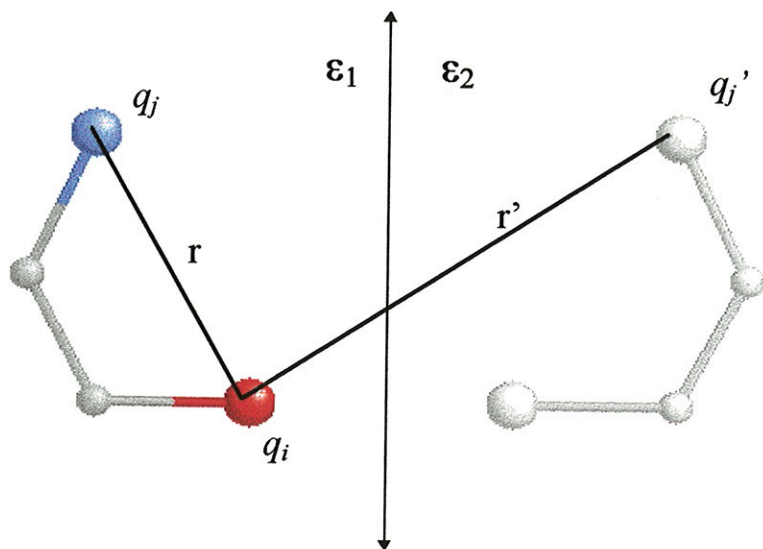


Figura-2.1 Par de cargas q_i e q_j imersas em um meio solvente de constante dielétrica ϵ_1 , nas proximidades da interface para outro meio de constante dielétrica ϵ_2 . O potencial devido à carga q_j sobre a carga q_i é alterado pela carga-imagem q_j' .

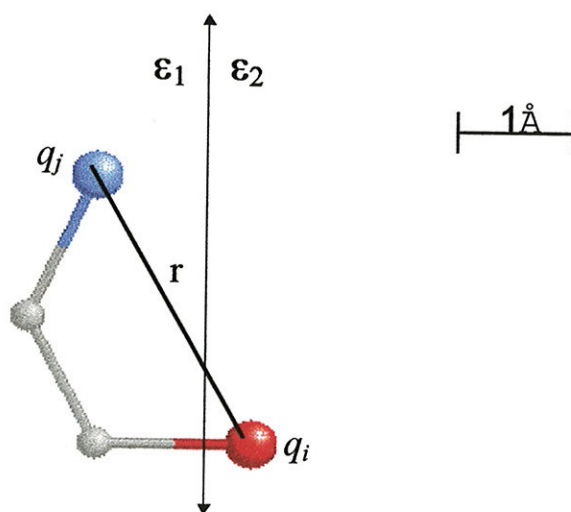


Figura-2.2 Par de cargas q_i e q_j imersas em dois meios solventes de constantes dielétricas ϵ_1 e ϵ_2 respectivamente. Não há correções no potencial devido à cargas-imagens.

onde Φ_i (Φ_j) é o potencial em i (j) devido à carga q_j (q_i) (Reitz et al., 1982; Jackson, 1983). Considerando um par de cargas q_i e q_j imersas num meio de constante dielétrica ϵ_1 , na presença de uma interface com um meio de constante dielétrica ϵ_2 (Figura-2.1), a energia potencial eletrostática em i é dada por:

$$V_i = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_1} q_i[(q_j/r) + (q_j'/r')] \quad [2.10]$$

que, usando a Equação-2.8, torna-se:

$$V_i = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_1} q_i q_j [(1/r) + (\epsilon_1 - \epsilon_2)/(\epsilon_1 + \epsilon_2)r'] \quad [2.11]$$

Se o par de cargas estivesse imerso no meio de constante dielétrica ϵ_2 a energia eletrostática em i seria:

$$V_i = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_2} q_i q_j [(1/r) + (\epsilon_2 - \epsilon_1)/(\epsilon_1 + \epsilon_2)r'] \quad [2.12]$$

Para a situação em que as cargas do par acima se encontram em meios diferentes, separadas pela interface (Figura-2.2), com o auxílio da Equação-2.9, a energia potencial eletrostática é dada por:

$$V_i = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} 2q_i q_j / (\epsilon_1 + \epsilon_2)r \quad [2.13]$$

Nesse caso V_i independe do meio.

Para considerar o efeito de polarização da interface água-membrana, o termo coulombiano na função energia potencial total (Equação-1.7) é substituído por um dos termos energia potencial das Equações 2.11, 2.12 ou 2.13, dependendo da posição do par de cargas q_i e q_j em relação à interface. Foram empregadas duas moléculas fictícias para testar a teoria acima: uma contendo um par de cargas de mesmo sinal (+0.25 e +0.25) e outra contendo um par de cargas de sinais opostos (+0.25 e -0.25). Fazendo $\epsilon_1 > \epsilon_2$ ($\epsilon_1 = 80$ e $\epsilon_2 = 2$), calculou-se o potencial total para cada molécula, usando a Equação-1.7 modificada pelas três últimas equações acima, em diversas posições do centro de massa com relação à interface. Para comparação foi empregada a Equação-1.7 sem modificações, sobre os dois meios dielétricos separadamente, para as mesmas posições (Figuras 2.3 e 2.4).

Uma primeira análise desse teste, apresentado nas Figuras. 2.3 e 2.4, mostra que o “método das imagens eletrostáticas”, empregado da maneira proposta neste

trabalho, evita a descontinuidade no potencial suavizando o potencial-degrau na superfície entre os dois meios. Como não há interação das cargas com suas próprias imagens não há divergência na energia potencial eletrostática quando uma carga está na superfície entre os dois meios. A ausência da interação das cargas com suas próprias imagens não afeta o resultado final, pois ao se afastar da interface o potencial total tende ao obtido pela solução da Equação-1.7 sem as correções propostas nas Equações 2.11, 2.12 e 2.13.

Se $\epsilon_1 > \epsilon_2$, o termo correspondente ao potencial gerado pela carga-imagem na Equação-2.11 é positivo, o que se pode interpretar como o sinal da carga-imagem sendo o mesmo da carga real. Por outro lado, na situação descrita pela Equação-2.12, se $\epsilon_1 > \epsilon_2$, interpreta-se como o sinal da carga-imagem sendo oposto ao da carga real (Figuras 2.5 e 2.6). Pela Eq.-2.13 não há participação de cargas-imagens na interação entre duas cargas em lados opostos da interface e a energia potencial efetiva é obtida pela média entre as constantes dielétricas. Nas condições acima, para ir do meio de ϵ_1 para o meio de ϵ_2 , um par de cargas com o mesmo sinal sobe, enquanto um par com sinais opostos desce uma barreira de potencial. No ambiente de menor constante dielétrica a curva de potencial é mais acentuada devido à maior interação eletrostática nesse meio. À distância de 15 Å, em torno de uma ordem de grandeza maior que o comprimento de uma ligação química C-C, o efeito da polarização da interface ainda é significativo no meio de baixa constante dielétrica. (Figuras 2.3 e 2.4).

Um esquema das forças eletrostáticas ($\mathbf{f}_i = -\nabla V_i$) atuando sobre cada carga das moléculas-teste, em três situações com relação à interface, é apresentado nas Figuras 2.5 e 2.6. Em todas as situações as forças resultantes sobre as moléculas são atribuídas às cargas-imagens, ou seja, às cargas de polarização da superfície entre os meios. Um par de cargas de mesmo sinal inserido no meio de constante dielétrica alta é repelido, enquanto que o mesmo par de cargas inserido no meio de constante dielétrica baixa é atraído pelas cargas de polarização da superfície (Figura-2.5). Por outro lado, um par de cargas de sinais opostos inserido no meio de constante dielétrica alta é atraído, enquanto que o mesmo par de cargas inserido no meio de constante dielétrica baixa é repelido pelas cargas de polarização (Figura-2.6).

A força resultante sobre uma macromolécula na presença da interface entre os dois meios solventes, o meio aquoso e o hidrocarbonado, é uma somatória das contribuições sobre pares de cargas atômicas na macroestrutura. A direção da força

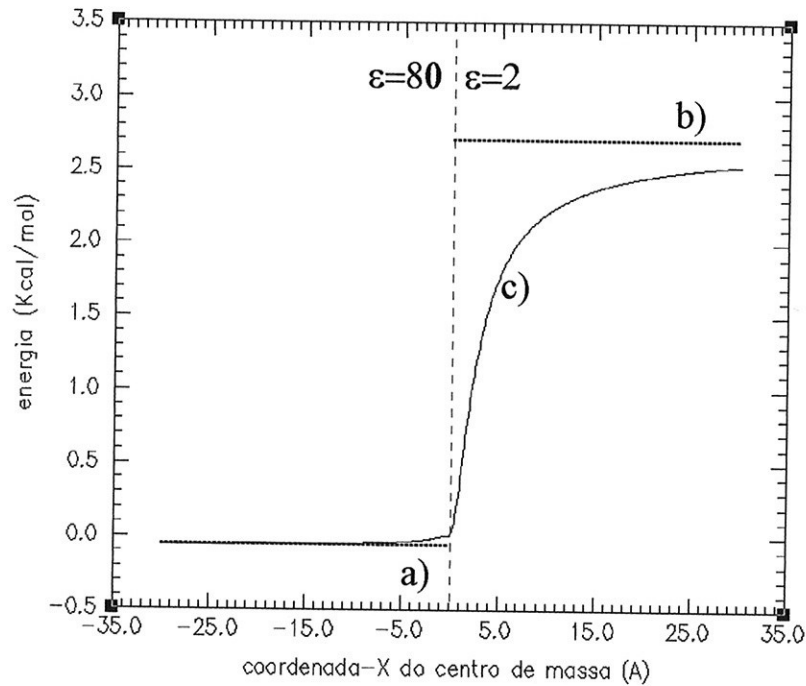


Figura-2.3 Soluções para a função energia potencial (Eq.-1.7) para a molécula teste com cargas de mesmo sinal: a) no solvente de $\epsilon = 80$; b) no solvente de $\epsilon = 2$; c) com as correções pelo método das imagens eletrostáticas.

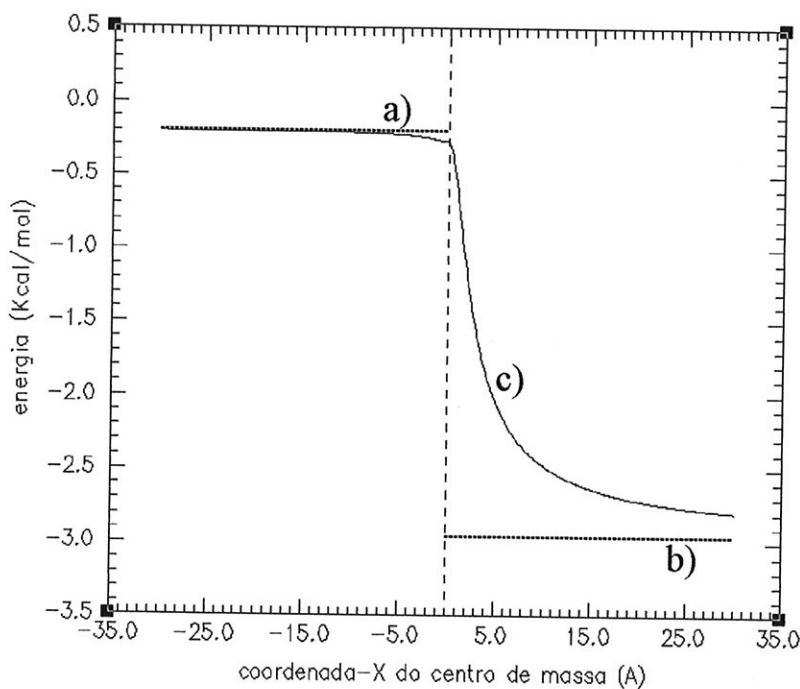


Figura-2.4 Soluções para a função energia potencial (Eq.-1.7) para a molécula teste com cargas de sinais opostos: a) no solvente de $\epsilon = 80$; b) no solvente de $\epsilon = 2$; c) com as correções pelo método das imagens eletrostáticas.

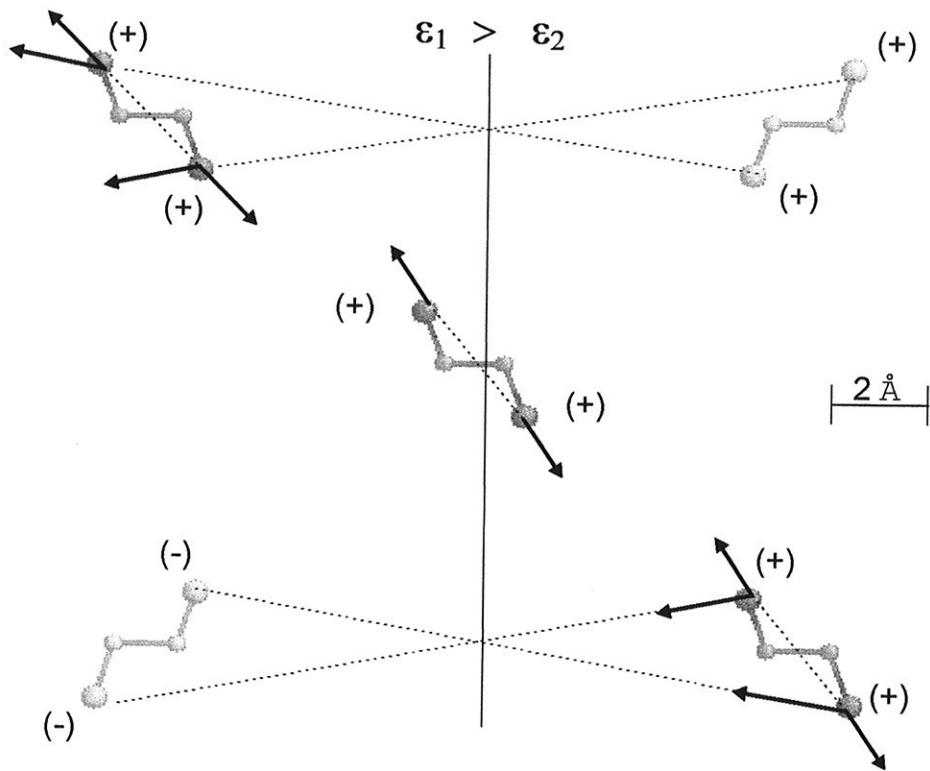


Figura-2.5 Forças eletrostáticas sobre um par de cargas de mesmo sinal na presença de uma interface de descontinuidade dielétrica.

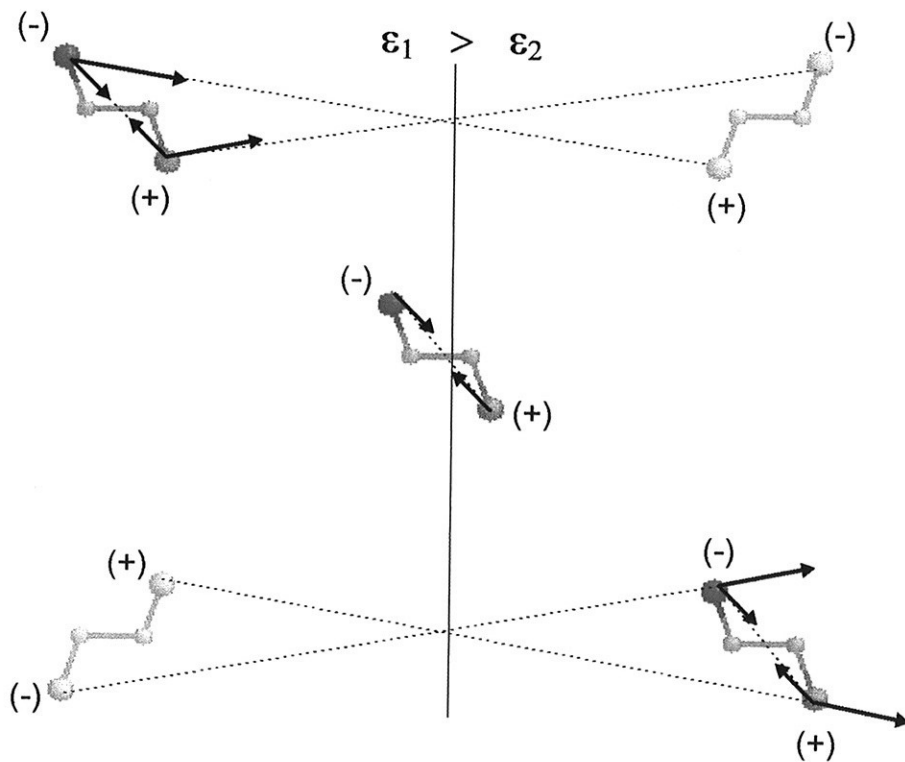


Figura-2.6 Forças eletrostáticas sobre um par de cargas de sinais opostos na presença de uma interface de descontinuidade dielétrica.

resultante será perpendicular à interface e o sentido dependerá da distribuição das cargas parciais e formais na macromolécula.

3 Otimização da Geometria Molecular

Calculando-se com a Equação-1.7 a energia para diversos valores de coordenadas de um sistema molecular, pode-se explorar a hipersuperfície de energia potencial para o mesmo. Dependendo das dimensões e características do sistema, a hipersuperfície apresentará um grande número de mínimos locais de energia, que correspondem a pontos no espaço de configurações onde todas as forças sobre os átomos do sistema são balanceadas. Devido ao elevado número de graus de liberdade das macromoléculas biológicas, uma exploração completa da superfície multidimensional de energia é praticamente impossível. Uma maneira de explorar tal superfície se dá pela minimização da energia potencial molecular. A Otimização da Geometria é uma técnica que visa encontrar um conjunto de coordenadas que minimizam a energia potencial do sistema de interesse. O procedimento básico consiste em caminhar sobre a superfície de potencial na direção em que a energia decresce de maneira que o sistema é levado a um mínimo de energia local próximo. Geralmente a configuração final, após este processo, não difere em muito da inicial. A minimização da energia cobre, portanto, somente uma pequena parte do espaço de configurações. Porém, pelos ajustes nas posições atômicas, ela relaxa as distorções nas ligações químicas, nos ângulos entre ligações e nos contatos de van der Waals.

A minimização da energia, ou otimização da geometria, é um processo iterativo que, em coordenadas cartesianas, pode ser representado por:

$$\mathbf{r}_{i,n+1} = \mathbf{r}_{i,n} + \Delta\mathbf{r}_{i,n} \quad (i = 1, 2, \dots, N_{at}) \quad [3.1]$$

na qual n é o número de iterações e $\Delta\mathbf{r}_{i,n}$ é o n -ésimo incremento nas coordenadas do átomo i . Existem diferentes maneiras de determinar o módulo e a direção do passo $\Delta\mathbf{r}_{i,n}$, os métodos mais comuns empregam a primeira derivada da função energia potencial, métodos divergentes, enquanto métodos mais sofisticados usam também a segunda derivada para melhorar a taxa de convergência. Uma descrição dos métodos clássicos de minimização pode ser encontrada em Brooks III et al. (1988) e Mackay et al. (1989), testes comparativos entre eles em Brooks et al. (1983) e estratégias de modelagem molecular usando minimização de energia em Mackay et al. (1989).

3.1 O algoritmo "steepest-descent" para minimização de energia

Para os propósitos do presente trabalho será empregado o método *steepest-descent* (Wiberg, 1965), que é um método de primeira derivada e converge vagarosamente nas proximidades do mínimo mas é poderoso para configurações distantes de um mínimo em energia. O algoritmo *steepest-descent* foi implantado na versão inicial do programa Thor devido à sua robustez e facilidade de implantação. Com este algoritmo é possível construir pequenas moléculas, como aminoácidos, a partir de coordenadas atômicas aleatórias com relativamente poucos passos de otimização e posteriormente conectá-los para formar cadeias peptídicas. A manipulação das coordenadas internas dessas cadeias (Apêndice-A) possibilita ainda escolher uma conformação, a qual pode ser reotimizada. De um modo geral, com o algoritmo *steepest-descent* é possível melhorar estruturas cristalográficas pouco refinadas, otimizar as construídas graficamente ou construir estruturas a partir de informações de NMR ou por homologia a estruturas conhecidas.

A força resultante sobre um átomo i é obtida pelo gradiente da energia potencial (dada pela Equação-1.7, podendo se considerar também suas variações propostas no Capítulo-2 quando for o caso) em i :

$$\mathbf{F}_i = -\nabla V(\{\mathbf{r}_i\}) \quad [3.2]$$

No método *steepest-descent*, como em outros métodos, o passo ou incremento nas coordenadas $\Delta \mathbf{r}_{i,n}$ de um átomo i , é dado na direção e sentido da força resultante sobre este átomo:

$$\Delta \mathbf{r}_{i,n} = k_n(\mathbf{F}_{i,n}/|\mathbf{F}_{i,n}|) \quad [3.3]$$

em que k_n é um parâmetro de ajuste do tamanho do passo e $\mathbf{F}_{i,n}/|\mathbf{F}_{i,n}|$ é o vetor unitário na direção e sentido da força resultante sobre i no passo n . O algoritmo para minimização de energia, utilizando a Equação-3.1, é então descrito por:

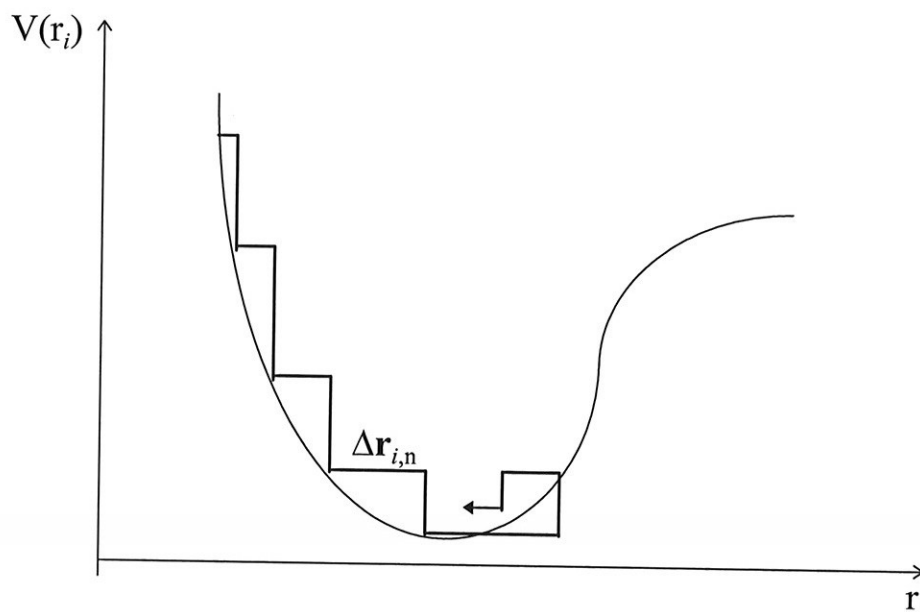
$$\mathbf{r}_{i,n+1} = \mathbf{r}_{i,n} + k_n(\mathbf{F}_{i,n}/|\mathbf{F}_{i,n}|) \quad [3.4]$$

em que k_n é ajustado para acelerar a minimização. Partindo de um valor típico $k_0 = 0.1 \text{ \AA}$, o valor de cada passo em cada direção x , y ou z será definido pela respectiva componente do vetor unitário na Equação-3.4. Se o potencial total no passo n $V_n(\{\mathbf{r}_i\})$, dado pela Equação-1.7, diminui com relação a $V_{n-1}(\{\mathbf{r}_i\})$, no passo seguinte k_{n+1} é aumentado fazendo-se por exemplo:

$$k_{n+1} = k_n * 1.2$$

Se $V_n(\{\mathbf{r}_i\})$ aumenta, o sistema está se afastando do mínimo, k_n pode estar tão grande que o sistema pode ter passado pelo mínimo e estar escalando o outro lado do poço de potencial. No passo seguinte k_{n+1} é diminuído fazendo-se por exemplo:

$$k_{n+1} = k_n * 0.5$$



Em cada passo verifica-se a diferença entre os valores de $V_{n-1}(\{\mathbf{r}_i\})$ e $V_n(\{\mathbf{r}_i\})$. Se a mesma for menor que um fator de convergência ΔV estipulado, o processo é interrompido. Com $\Delta V = 10^{-5}$ Kcal/mol chega-se satisfatoriamente a um mínimo para muitos sistemas, embora valores menores para ΔV possam ainda diminuir a energia em alguns Kcal/mol. Com $\Delta V = 10^{-2}$ Kcal/mol as deformações em ligações, ângulos e em esferas de van der Waals são eliminadas na maioria dos sistemas moleculares, muitas vezes baixando a energia potencial para valores acessíveis a temperaturas ordinárias.

A eliminação das deformações é importante na preparação de um sistema sobre o qual se pretende aplicar a Dinâmica Molecular. Durante a dinâmica são constantes as conversões entre as energias potencial e cinética, de maneira que um sistema com energia potencial inicialmente elevada apresentará temperaturas irreais nos primeiros passos da dinâmica, as quais poderão aprisioná-lo em configurações indesejáveis do espaço de fase. A prévia minimização da energia favorece a termalização e evita regiões “quentes” em um sistema no início de sua dinâmica.

Por caminharem no sentido da força, os métodos comuns de minimização geralmente levam o sistema para o mínimo de energia mais próximo, não ultrapassando barreiras de potencial para alcançar mínimos mais baixos em energia. Na Dinâmica Molecular, por outro lado, atribuem-se velocidades às partículas possibilitando ao sistema transpor barreiras da ordem de $K_B T$ por grau de liberdade (onde K_B é a constante de Boltzmann e T é a temperatura absoluta). Com a Dinâmica portanto, uma parte maior do espaço de configurações é coberta, tornando possível ao sistema alcançar mínimos mais baixos. Geralmente, um sistema sobre o qual se aplica a Dinâmica Molecular apresenta uma configuração final com energia potencial mínima menor que a configuração inicial.

É comum haver um único mínimo com a mais baixa energia, o mínimo global, sobre o qual espera-se uma maior estabilidade para o sistema. Em sistemas biológicos é freqüente o mínimo global não estar muito abaixo energeticamente de alguns mínimos locais, de forma que o sistema possa flutuar entre eles nas temperaturas dos respectivos organismos. Ainda é discutível se as conformações biologicamente ativas das proteínas estão sobre um mínimo global. Qualquer que seja a energia para uma conformação com atividade biológica nessas macromoléculas, com os métodos para minimização de energia e simulação de dinâmica molecular é praticamente impossível encontrá-la no espaço de configurações partindo-se de uma conformação estendida ou aleatória. O processo de enovelamento e empacotamento pelo qual as proteínas atingem sua conformação nativa, é um problema dinâmico ainda em aberto por desenvolver-se em escala de tempo que chega a minutos, enquanto que as simulações de dinâmica abrangem intervalos de nanosegundos com os recursos computacionais atuais. Para o estudo da dinâmica de sistemas envolvendo macromoléculas, a configuração inicial deve portanto ser construída e otimizada com o máximo de informação sobre a estrutura tridimensional dos mesmos.

Recentemente foi implantado no programa Thor o método de Simulação por Termalização Generalizada (*Generalized Simulated Annealing*) por Gonçalves (1996; Moret et al., 1996). Neste método não é necessário o cálculo das forças sobre cada átomo em cada iteração, avaliando-se somente a energia potencial. O passo $\Delta r_{i,n}$ é aleatório, porém ajustado por uma função de visitação e um ruído, ou temperatura artificial, que possibilitam ao sistema transpor barreiras de energia e ser resfriado gradativamente, de maneira análoga ao processo de “recozimento”. Por essas características, este método possibilita uma maior cobertura do espaço de configurações que a Dinâmica

Molecular, para o mesmo tempo de CPU. Ele está sendo testado em peptídeos com estrutura tridimensional conhecida e, para alguns, está encontrando essas estruturas no mínimo global.

4 Simulação por Dinâmica Molecular

Dinâmica Molecular é uma técnica com a qual se estudam os movimentos em um sistema de partículas por simulação. Ela pode ser empregada tanto em sistemas de elétrons, átomos ou moléculas, como em sistemas de galáxias. Seus elementos essenciais são o conhecimento do potencial de interação entre as partículas e das equações de movimento que governam a dinâmica dessas partículas. O potencial pode variar do simples como o gravitacional para interações entre estrelas, ao complexo, composto por vários termos como o que descreve as interações entre átomos e moléculas. Para muitos sistemas, entre os quais os biomoleculares, as equações da dinâmica clássica são adequadas. Porém, para alguns problemas como evolução de galáxias são incluídos efeitos relativísticos, enquanto que para outros como reações químicas envolvendo tunelamento são necessárias correções quânticas (Karplus & Petsko, 1990).

O estado microscópico de um sistema pode ser especificado em termos das posições e momentos das partículas que o constituem. Dessa forma, a Hamiltoniana H de um sistema molecular clássico pode ser escrita como a soma das energias cinética T e potencial V , como função das séries de coordenadas generalizadas \mathbf{q}_i e de momentos generalizados \mathbf{p}_i de todos os N_{at} átomos do sistema:

$$H(\{\mathbf{q}_i, \mathbf{p}_i\}) = T(\{\mathbf{p}_i\}) + V(\{\mathbf{q}_i\}) \quad [4.1]$$

onde $\mathbf{q}_i = \mathbf{q}_1, \mathbf{q}_2, \dots, \mathbf{q}_{N_{at}}$ e $\mathbf{p}_i = \mathbf{p}_1, \mathbf{p}_2, \dots, \mathbf{p}_{N_{at}}$.

A energia potencial $V(\{\mathbf{q}_i\})$ contém os termos de interação inter e intramoleculares, de curto e longo alcance, e pode ser substituída pela função potencial $V(\{\mathbf{r}_i\})$ da Equação-1.7 (modificada ou não pelas Equações 2.11, 2.12 e 2.13), tal que as coordenadas \mathbf{q}_i sejam as coordenadas cartesianas \mathbf{r}_i e \mathbf{p}_i seus momentos conjugados. A energia cinética assume a forma:

$$T(\{\mathbf{p}_i\}) = \sum_{i=1}^{N_{at}} \frac{\mathbf{p}_i^2}{2m_i} \quad [4.2]$$

em que m_i é a massa do átomo i .

A partir de H é possível construir as equações de movimento que governam a evolução temporal do sistema e suas propriedades dinâmicas. Como a energia potencial dada pela Equação-1.7 (e suas correções do Capítulo-2) independe das

velocidades e do tempo, H é igual a energia total do sistema e as equações de movimento de Hamilton:

$$\dot{\mathbf{q}}_i = \partial H / \partial \mathbf{p}_i \quad [4.3]$$

$$\dot{\mathbf{p}}_i = - \partial H / \partial \mathbf{q}_i \quad [4.4]$$

conduzem às equações do movimento de Newton:

$$\dot{\mathbf{r}}_i = \mathbf{p}_i / m_i = \mathbf{v}_i \quad [4.5]$$

$$\dot{\mathbf{p}}_i = m_i \ddot{\mathbf{r}}_i = - \partial V(\{\mathbf{r}_i\}) / \partial \mathbf{r}_i = \mathbf{F}_i \quad [4.6]$$

respectivamente, em que $\dot{\mathbf{r}}_i$ (ou \mathbf{v}_i) e $\ddot{\mathbf{r}}_i$ são a velocidade e a aceleração do átomo i , enquanto \mathbf{F}_i é a força sobre o átomo i . A Equação-4.6 é equivalente à Equação-3.2 (Goldstein, 1980; Berendsen & van Gunsteren, 1986; Allen & Tildesley, 1987).

A Dinâmica Molecular consiste portanto na resolução numérica das Equações 4.5 e 4.6 e na integração das mesmas passo-a-passo no tempo, de maneira eficiente e acurada. Como resultado obtém-se energias e trajetórias para todas as partículas (ou átomos) e para o sistema como um todo, a partir das quais várias propriedades podem ser calculadas. O tempo deixa de ser contínuo, sendo discretizado nos sistemas moleculares em passos menores (geralmente 20 vezes menores) que o período das vibrações dos átomos de hidrogênio, o movimento molecular mais rápido. Em sistemas com hidrogênio usualmente aplica-se um passo de tempo de $5,0 \times 10^{-16}$ segundos. Neste procedimento é essencial que a energia potencial seja uma função contínua das posições das partículas e que as posições variem suavemente com o tempo. As forças \mathbf{F}_i sobre cada átomo, que são obtidas a partir da derivada espacial da função energia potencial como é mostrado na Equação-4.6, podem desta maneira serem consideradas constantes no intervalo entre dois passos. A estabilidade da dinâmica é assim favorecida, as partículas seguem suas trajetórias clássicas mais acuradamente e a energia total do sistema tende a conservar-se.

Uma limitação para a simulação da dinâmica molecular reside portanto no fato de que para cada nanosegundo de simulação são necessários dois milhões de passos com o passo de tempo acima. A simulação de um nanosegundo da dinâmica de uma macromolécula com 200 átomos pode levar horas de tempo de CPU em um

supercomputador, utilizando-se um algoritmo eficiente. Uma descrição e análise da eficiência de algoritmos para simulação de dinâmica molecular pode ser encontrada em Berendsen & van Gunsteren (1986) e Allen & Tildesley (1987). Este último inclui rotinas em linguagem FORTRAN para alguns métodos de simulação.

4.1 O algoritmo de Verlet

Os termos que compõem a energia potencial total na Equação-1.7 caracterizam-na como uma função contínua das posições atômicas. Com o tratamento da descontinuidade dielétrica entre dois meios solventes pelo “método das imagens eletrostáticas” (Capítulo-2), o potencial-degrau na superfície de separação entre os dois meios é suavizado, de forma que é mantida a continuidade da energia potencial total como função das posições. Quando a energia potencial é uma função contínua das posições e o passo de tempo é pequeno o suficiente para se considerar que as posições variem suavemente com o tempo, dado um conjunto de posições atômicas num instante t , as posições no passo seguinte podem ser obtidas por uma expansão de Taylor de $\mathbf{r}_i(t)$:

$$\mathbf{r}_i(t + \delta t) = \mathbf{r}_i(t) + \dot{\mathbf{r}}_i(t) \delta t + \frac{1}{2!} \ddot{\mathbf{r}}_i(t) \delta t^2 + \dots \quad [4.7]$$

Do mesmo modo obtém-se as posições no passo anterior a $\mathbf{r}_i(t)$:

$$\mathbf{r}_i(t - \delta t) = \mathbf{r}_i(t) - \dot{\mathbf{r}}_i(t) \delta t + \frac{1}{2!} \ddot{\mathbf{r}}_i(t) \delta t^2 - \dots \quad [4.8]$$

em que δt representa o passo de tempo. Somando-se as Equações 4.7 e 4.8 obtém-se o algoritmo de Verlet (1967) para a propagação das posições:

$$\mathbf{r}_i(t + \delta t) = 2\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i(t - \delta t) + \ddot{\mathbf{r}}_i(t) \delta t^2 \quad [4.9]$$

desprezando-se os termos de ordem superiores. A aceleração $\ddot{\mathbf{r}}_i(t)$ é obtida a partir da Equação-4.6, tal que:

$$\ddot{\mathbf{r}}_i(t) = \mathbf{F}_i(t)/m_i \quad [4.10]$$

e:

$$\mathbf{F}_i(t) = -\partial V(\{\mathbf{r}_i(t)\})/\partial \mathbf{r}_i \quad [4.11]$$

No algoritmo de Verlet, como em outros métodos numéricos da Dinâmica Molecular, resolve-se portanto as equações de movimento de Newton para cada átomo

e em cada incremento no tempo. A avaliação das forças (Equação-4.11) para obtenção das acelerações (Equação-4.10), é o processo que mais consome tempo computacional na Dinâmica Molecular. O tempo gasto no cálculo das forças depende da complexidade da função energia potencial. São tomadas as derivadas espaciais de cada termo potencial e somadas para se obter a força resultante e a aceleração, sobre cada átomo e a cada novo conjunto de coordenadas. As acelerações são inseridas num algoritmo, como o da Equação-4.9, para a previsão das novas posições e em seguida o processo se repete.

Como as velocidades não aparecem na Equação-4.9, elas não desempenham papel algum na determinação das trajetórias neste algoritmo. A previsão das novas posições no instante $t + \delta t$ são computadas somente a partir das posições nos instantes t e $t - \delta t$ e das forças $F_i(t)$ sobre cada partícula no instante t . As velocidades, porém, são necessárias para o cálculo da energia cinética, que somada à energia potencial dá a energia total do sistema. Subtraindo-se as Equações 4.7 e 4.8 obtém-se o algoritmo de Verlet para a propagação das velocidades:

$$\dot{\mathbf{r}}_i(t) = [\mathbf{r}_i(t + \delta t) - \mathbf{r}_i(t - \delta t)]/2\delta t \quad [4.12]$$

Quando há truncamento nas interações de longo alcance, o potencial sofre variação brusca no instante em que a distância entre um par de átomos em interação ultrapassa o raio de corte. Situações como a do potencial-degrau, devido à descontinuidade dielétrica entre solventes tratada no presente trabalho, como a do modelo de esferas rígidas ou de poços de potenciais retangulares, são outros exemplos onde o potencial varia bruscamente. Nesses casos, com a expansão de Taylor não se pode prever as posições nas vizinhanças onde o potencial é descontínuo, as partículas sofrem colisões impulsivas e as velocidades variam de maneira descontínua. Quando não é o caso de corrigir a descontinuidade no potencial, o tratamento passo-a-passo acima deve ser substituído por (ou acoplado a) uma análise colisional da dinâmica do sistema (Allen & Tildesley, 1987).

4.2 O algoritmo “summed Verlet” ou “leapfrog”

As trajetórias obtidas a partir da Equação-4.9 estão sujeitas a imprecisões numéricas pelo fato de, para cada átomo, tomar-se a diferença entre duas posições, que são quantidades grandes, com o objetivo de se obter o incremento que leva à

posição seguinte, que é uma quantidade pequena. Uma forma de evitar este problema surgiu com o algoritmo de meio-passo *leapfrog*, que é uma modificação do algoritmo básico de Verlet (Berendsen et al., 1984; Allen & Tildesley, 1987; van Gunsteren & Berendsen, 1990). As velocidades nos meio-passos $t + \delta t/2$ e $t - \delta t/2$ podem ser definidas desmembrando-se a Eq.-4.12, de forma que:

$$\dot{\mathbf{r}}_i(t + \delta t/2) = [\mathbf{r}_i(t + \delta t) - \mathbf{r}_i(t)]/\delta t \quad [4.13]$$

e

$$\dot{\mathbf{r}}_i(t - \delta t/2) = [\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i(t - \delta t)]/\delta t \quad [4.14]$$

A propagação das posições é obtida diretamente da Equação-4.13, na forma:

$$\mathbf{r}_i(t + \delta t) = \mathbf{r}_i(t) + \dot{\mathbf{r}}_i(t + \delta t/2) \delta t \quad [4.15]$$

a qual apresenta resultados mais acurados por não lidar com diferenças entre valores grandes, comparados às pequenas variações nas posições atômicas entre t e $t + \delta t$. Para atualizar as posições com a Equação-4.15, no entanto, é necessário o conhecimento das velocidades $\dot{\mathbf{r}}_i(t + \delta t/2)$. Para obtê-las, substitui-se a Equação-4.9 na Equação-4.13 e em seguida a Equação-4.14, conduzindo a:

$$\dot{\mathbf{r}}_i(t + \delta t/2) = \dot{\mathbf{r}}_i(t - \delta t/2) + \ddot{\mathbf{r}}_i(t) \delta t \quad [4.16]$$

em que a aceleração, no último termo, é obtida como indicado nas Equações 4.10 e 4.11. Para se obter a energia cinética do sistema num instante t , determina-se as velocidades em t pela média:

$$\dot{\mathbf{r}}_i(t) = [\dot{\mathbf{r}}_i(t + \delta t/2) + \dot{\mathbf{r}}_i(t - \delta t/2)]/2 \quad [4.17]$$

Conhecendo-se a energia potencial no instante t , é possível determinar a energia total do sistema ($H = T + V$) no instante t .

As Equações 4.15 e 4.16 compõem o algoritmo *Summed Verlet* ou *leapfrog*. Este algoritmo equivale algebricamente ao algoritmo de Verlet básico, exposto na seção anterior. Porém, além de sua menor susceptibilidade a erros numéricos o *leapfrog* ocupa menos espaço de armazenamento na memória, sendo um dos algoritmos mais estáveis, simples e eficientes, podendo ser aplicado em sistemas constituídos de fluidos simples a biopolímeros. Talvez sua maior vantagem seja o fato de as velocidades aparecerem no cálculo das novas posições, o que torna o sistema acoplável a um banho térmico por correções nas velocidades. Como a energia

potencial é uma função das posições e a variação destas depende das velocidades (Equação-4.15), controlar as velocidades significa controlar diretamente, além da energia cinética, também a energia potencial e conseqüentemente a energia total do sistema.

A temperatura T de um sistema pode ser aproximada em termos da energia cinética média sobre um número N_{steps} de passos:

$$\frac{3}{2} N_{at} K_B T = \left\langle \sum_{i=1}^{N_{at}} \frac{1}{2} m_i \dot{\mathbf{r}}_i(t)^2 \right\rangle_{N_{steps}} \quad [4.18]$$

N_{steps} varia geralmente entre 20 a 50 passos, dependendo do número N_{at} de átomos do sistema (Brooks et al., 1983). O acoplamento a um banho térmico se dá a partir da comparação da temperatura T a cada ciclo de N_{steps} , com uma temperatura de referência T_0 . Se a diferença entre T e T_0 estiver fora de um desvio ΔT estipulado, geralmente 10% de T_0 , então as novas velocidades são corrigidas por um fator:

$$\dot{\mathbf{r}}_i(t + \delta t/2) = \dot{\mathbf{r}}_i(t - \delta t/2) [(T_0/T)^{1/2}] \quad [4.19]$$

Quando não há forças externas atuando sobre um sistema sua energia total se conserva, podendo o mesmo ser mantido isolado, dispensando as correções nas velocidades. Porém, como no início da dinâmica há uma tendência geralmente na direção de configurações de mais baixa energia potencial a energia cinética e portanto a temperatura tende a aumentar. Mesmo nas vizinhanças do mínimo global, ou onde a hipersuperfície de energia é rugosa o suficientemente, poderá haver flutuações entre configurações levando a desvios na temperatura. Erros numéricos levam também à não conservação da energia total do sistema. Esses fatores motivam o estudo da dinâmica de macromoléculas utilizando um ensemble canônico, acoplando o sistema a um banho térmico representado pelas correções nas velocidades.

O controle das velocidades é também útil no início da dinâmica. Dado um conjunto de coordenadas iniciais otimizadas, são introduzidas velocidades iniciais por um sorteio dentre uma distribuição de Maxwell-Boltzmann associada a um valor de temperatura igual ou inferior a 10 K. Uma dinâmica preliminar de poucos picosegundos pode ser efetuada para melhorar a distribuição e equilíbrio das velocidades. O sistema é então aquecido, ajustando-se as velocidades, a taxas em torno de 20 K por picosegundo até se alcançar a temperatura desejada. Em seguida a dinâmica desenvolve-se à temperatura constante por algumas dezenas de

picosegundos para equilibrar o sistema no espaço de fase, passando à coleta de dados.
Um protocolo semelhante pode ser encontrado em Brooks (1983).

5 Efeitos da Polaridade do Solvente

Neste capítulo a influência do solvente, como um contínuo eletrostático, é investigada sobre vários sistemas por otimização de geometria e simulação de dinâmica molecular. Paralelamente, são descritos alguns detalhes de funcionamento do programa Thor e são testados o Campo de Força, com o “modelo de átomo unido”, e a aplicação do “método das imagens eletrostáticas” para descrever a interface água-membrana. O teste para o Campo de Força e o “modelo de átomo unido” é feito inicialmente sobre o triptofano e uma polialanina. A primeira dessas moléculas é um aminoácido cuja superfície de energia potencial é conhecida, sendo bem definidas as posições de seus mínimos de energia. Na seção 5.1 são então descritas as várias configurações para o triptofano, tanto na forma de zwitterion ($^+H_3N-Trp-COO^-$) como embutido em um tri-peptídeo entre alaninas (Ac-Ala-Trp-Ala-NH₂), sendo considerada a influência dos solventes polar e apolar, tratados como contínuos de constante dielétricas $\epsilon = 80$ e $\epsilon = 2$ respectivamente.

A alanina geralmente participa da formação de estruturas secundárias em hélice- α em proteínas. Além disso, um peptídeo constituído somente de alaninas tende a estabilizar-se em conformação hélice- α em solvente apolar. A estabilidade da hélice- α formada por uma polialanina em relação ao meio solvente é verificada na seção 5.2. Uma segunda estrutura em hélice- α é utilizada para testar o modelo de interface água-membrana na seção 5.3. Trata-se de um fragmento da β -endorfina que é modificado sinteticamente para favorecer a estabilização de uma estrutura secundária anfifílica, ou seja, uma estrutura com afinidade tanto para a água como para o meio hidrofóbico do interior das membranas biológicas (Taylor & Kaiser, 1987). Nesta última seção, tetra-peptídeos com comportamento esperado hidrofílico ou hidrofóbico, são também empregados para testar o modelo de interface água-membrana.

5.1 Um estudo sobre o triptofano

As propriedades espectroscópicas do triptofano (Trp) o tornam uma importante sonda intrínseca para a estrutura e dinâmica de proteínas. Os espectros de emissão e absorção, tempos de vida e rendimento quântico para a fluorescência do cromóforo indol no Trp, são parâmetros bastante sensíveis às alterações locais no ambiente. É praticamente um consenso que as posições dos picos nos espectros de absorção e

emissão estejam associadas à polarizabilidade do meio e que a passagem do Trp para um ambiente apolar é acompanhada de um deslocamento espectral para o azul (Ito et al. 1993; Swaminathan et al. 1994). Já é estabelecido o decaimento multi-exponencial na intensidade da fluorescência do Trp, tanto em cadeias peptídicas como isolado em diversos pH's (Engh et al. 1986). Em pH 7, para o triptofano na forma zwitteriônica em água, a curva de decaimento ajusta-se a uma soma de duas exponenciais correspondentes a tempos de vida em torno de 0,5 e 3,1 nanosegundos respectivamente (Beechem & Brand, 1985). Em proteínas com um único resíduo triptofano foram observados decaimentos bi e tri-exponenciais, com tempos de vida situados entre 0,2 e 6,6 nanosegundos (Swaminathan et al. 1994). Para peptídeos melanotrópicos são obtidos melhores ajustes para a curva de decaimento com três exponenciais, com tempos de vida variando de 0,2 a 3,9 nanosegundos em água ou de 0,4 a 5,7 nanosegundos em membranas lipídicas modelo (Ito et al. 1993).

Não há consenso porém na associação dos diferentes tempos de vida do estado excitado a aspectos eletrônicos, estruturais ou dinâmicos do triptofano. Uma interpretação baseia-se na existência de dois ou mais rotâmeros que não interconvertem durante o tempo de vida da fluorescência, de forma que o grupo cromóforo indol ficaria submetido a vizinhanças estruturais diferentes, as quais causariam maior ou menor tempo de desexcitação (Szabo & Rayner, 1980; Petrich et al. 1983). A multiplicidade de rotâmeros do Trp tem sido confirmada por NMR (Jäckle & Luisi, 1984; Ross et al., 1992), cristalografia de proteínas (Ponder & Richards, 1987) e mecânica molecular (Engh et al., 1986; Gordon et al., 1992). São identificadas três conformações de energia mínima para rotações em torno da ligação $C_{\alpha}-C_{\beta}$ (ângulo torcional χ_1 , medido sobre o diedro $N-C_{\alpha}-C_{\beta}-C_{\gamma}$, Figura-5.1): *trans* (*t*), *gauche*⁺ (*g*⁺) e *gauche*⁻ (*g*⁻), com valores angulares próximos a: 180, 60 e -60 graus respectivamente. Para a ligação $C_{\beta}-C_{\gamma}$ (ângulo torcional χ_2 , medido sobre o diedro $C_{\alpha}-C_{\beta}-C_{\gamma}-C_{\delta 2}$) são identificadas duas conformações: *perpendicular* (*perp- χ_2*), com valor angular em torno de 90 graus e *antiperpendicular* (*anti- χ_2*), com valor angular em torno de -90 graus. A torção combinada dessas duas ligações leva portanto a seis configurações de mínima energia.

Com este trabalho pretende-se um levantamento dos mínimos de energia para o Trp isolado e no peptídeo Ala-Trp-Ala, obter a distribuição populacional das conformações correspondentes a esses mínimos e observar a importância da constante dielétrica nessa distribuição, bem como na posição e energia dos mínimos. Pretende-

se ainda discutir a relação das conformações obtidas, e das mudanças conformacionais, com o “modelo de rotâmero” para o decaimento da fluorescência.

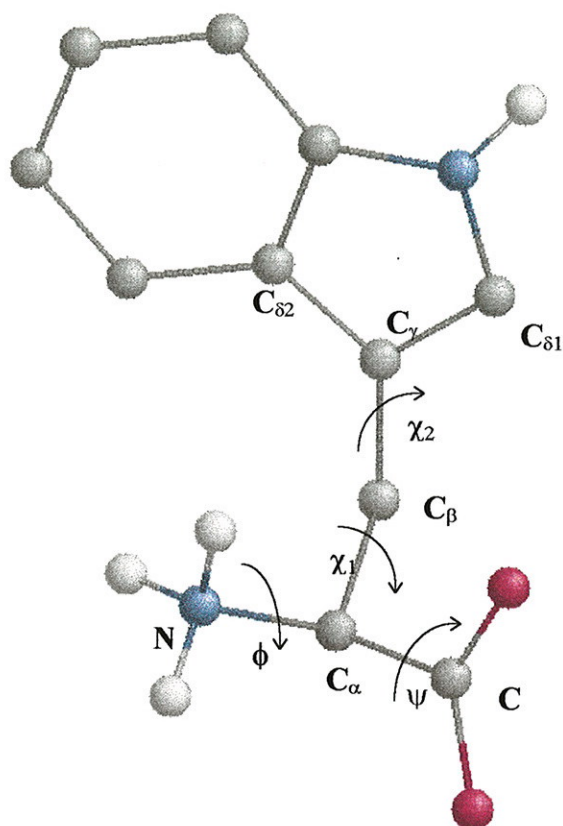


Figura-5.1 Representação gráfica do triptofano na forma de zwitterion, no “modelo de átomo unido”. Somente os átomos de hidrogênio polares são modelados explicitamente.

5.1.1 métodos

São necessários dois conjuntos de informações para a montagem de dois arquivos básicos de entrada para o programa Thor. Em um arquivo (com extensão “.IN”) entra-se com as linhas de comando, o conjunto de coordenadas internas ou cartesianas, a matriz de conectividade (para informar ao programa quais os átomos ligados entre si) e a carga residual sobre cada átomo. Em um segundo arquivo (com extensão “.TOP”) entra-se com o conjunto de parâmetros para a molécula em estudo (descritos no Capítulo-1), na forma de tabelas com as constantes e posições de equilíbrio para os potenciais de Hooke, Angular Teta, Diedral Impróprio e Próprio. Neste arquivo entra-se ainda com as massas atômicas e a lista de primeiros e segundos vizinhos excluídos no cálculo das interações de longo alcance. Os parâmetros de Van der Waals são lidos de uma tabela genérica por ser menos dispendioso

computacionalmente. As tabelas Trp.IN e Trp.TOP, constantes dos Apêndices A e B, são esses arquivos de entrada básicos para o triptofano. No Apêndice-C é apresentada a tabela de entrada com as informações para a dinâmica (temperatura inicial, taxa de aquecimento, intervalo para flutuações na temperatura além do qual se reescala as velocidades em cada ciclo, temperatura de referência, valor do passo de tempo, número de passos, número de passos em cada ciclo e a sinalização para o sorteio ou não das velocidades iniciais).

Há diversas maneiras de se criar o arquivo com a extensão “.IN”. Ele pode ser digitado manualmente respeitando-se a formatação de leitura do programa. As coordenadas podem ser aproximadas (ou mesmo aleatórias) pois com a minimização de energia (que pode ser seguida de alguns passos de dinâmica), uma molécula de até 50 átomos é otimizada em poucos minutos de CPU. Alguns programas, como o DTMM (*Desktop Molecular Modeller*), constroem graficamente e otimizam uma diversidade de estruturas moleculares, gerando uma saída em formato *ascii* com as coordenadas e a matriz de conectividade, bastando acrescentar o cabeçalho e a coluna de cargas residuais. É possível ainda aproveitar as coordenadas obtidas do Banco de Dados de Proteínas (PDB), acessível pela internet. Foi escrito um programa auxiliar para o Thor, o programa Seqüência, para gerar o arquivo “.IN” para peptídeos e proteínas a partir de um banco de dados de aminoácidos contendo coordenadas otimizadas, a matriz de conectividade e a coluna de cargas. Um outro programa, o Pdbthor, foi construído para ler as coordenadas de um arquivo no formato PDB aproveitando a matriz de ligações químicas e as cargas residuais do mesmo banco de aminoácidos. Os arquivos de entrada “.IN” utilizados nas simulações constantes deste e do próximo Capítulo foram criados com o programa Seqüência. O arquivo MSH.IN para o α -MSH, objeto de estudo no Capítulo-7, foi criado inicialmente com o auxílio do programa DTMM.

O arquivo com extensão “.TOP” para peptídeos e proteínas pode ser criado automaticamente pelo programa Thor, a partir das informações no arquivo “.IN” e de um banco de parâmetros para aminoácidos. Porém, a entrada externa dessa tabela de topologia possibilita ao programa Thor efetuar cálculos sobre estruturas moleculares diversas, além de cadeias peptídicas, desde que se construa o arquivo “.TOP” com os parâmetros corretos.

Os resultados da otimização de geometria (valores de energias para cada potencial, número de ciclos, etc) e da dinâmica (temperaturas, energias, coordenadas do centro de massa a cada N passos, etc) são escritos no arquivo de saída “.OUT”. As

novas coordenadas após esses cálculos são escritas no arquivo “.NEW”. Neste arquivo são também armazenadas as velocidades para cada átomo no último passo da dinâmica, para que a mesma possa ser retomada. As trajetórias de todos os ângulos diedrais próprios durante a dinâmica podem ser registradas nos arquivos de saída “.DHA”, “.DHB”, “.DHC”, etc. Quando a dinâmica molecular é simulada a temperaturas elevadas (900 K por exemplo) e interrompida em intervalos para a aplicação do *annealing* (resfriamento lento, seguido de otimização), as coordenadas, ou ângulos diedrais, e as energias são armazenadas nos arquivos “.ANA”, “.ANB”, etc. Este procedimento foi utilizado com o Trp e o Ala-Trp-Ala para o levantamento dos mínimos de energia dessas estruturas e a obtenção de uma distribuição populacional por esses mínimos.

Durante dinâmicas longas as coordenadas e velocidades podem ser gravadas, a cada intervalo de tempo, no arquivo “.DBK”. Isto permite a recuperação e registro em maiores detalhes de determinados momentos julgados mais importantes, além de garantir a continuidade da dinâmica após situações como paradas nos computadores. Finalmente, é possível a visualização gráfica por programas como DTMM, Xmol e Rasmol, a partir das saídas “.DMM”, “.XYZ” e “.PDB”. Com o programa Xmol pode-se visualizar a animação da dinâmica pela leitura quadro a quadro de conjuntos de coordenadas gravados no arquivo “.XYZ”. Com o Rasmol é possível exportar a imagem que estiver na tela do computador para um formato GIF, BMP, etc, a qual pode ser lida e editada por diversos editores. As imagens moleculares constantes deste trabalho foram obtidas dessa maneira.

Após a construção e otimização das coordenadas do Trp na forma zwitteriônica ($^+H_3N-Trp-COO^-$; Figura-5.1) e do peptídeo Ala-Trp-Ala na forma acetilada para evitar o efeito de cargas formais nas extremidades ($H_3CCO-Ala-Trp-Ala-NH_2$), o cálculo das velocidades iniciais para a dinâmica foi efetuado usando uma distribuição de Maxwell-Boltzmann (Pathria, 1985). As direções das componentes das velocidades foram escolhidas aleatoriamente usando a função RAN3 (Press et al., 1992), tendo início a dinâmica a 10 K utilizando o algoritmo *leapfrog* descrito no Capítulo-4.

Para o Trp a temperatura de referência T_0 foi incrementada para o sistema chegar a 300 K em 30 picosegundos, em seguida transcorreu a dinâmica por 45 nanosegundos sendo registradas as variações na temperatura, nas energias cinética, potencial e total e nos ângulos diedrais χ_1 e χ_2 (em torno das ligações $C_\alpha-C_\beta$ e $C_\beta-C_\gamma$; Figuras 5.1 e 5.2). Para o *annealing* foram simulados 10 nanosegundos para o Trp e para o Ala-Trp-Ala, sendo que, em intervalos regulares, cada sistema foi resfriado e

otimizado. Antes de iniciar o resfriamento as coordenadas e velocidades, na temperatura 900 K, foram armazenadas para que a dinâmica pudesse ser retomada após cada otimização. Assim, em uma simulação típica, inicialmente T_0 foi levada a 900 K em 25 picosegundos. Coordenadas e velocidades foram armazenadas nessa temperatura e o sistema foi resfriado pela subtração de 20 K em T_0 a cada 100 passos, até a temperatura final de 20 K. Em seguida foi aplicada a otimização utilizando o algoritmo *steepest-descent* (Capítulo-3), com um fator de convergência de 10^{-5} Kcal/mol. A dinâmica teve então prosseguimento por 5000 passos, pela recuperação das posições e velocidades anteriores, a 900 K. Este ciclo foi repetido por 2099 vezes até um total de 20 milhões de passos, ou 10 nanosegundos de simulação, sendo aplicado no Trp e no Ala-Trp-Ala em $\epsilon = 80$ e $\epsilon = 2$. Foram registradas os 2099 valores de energia potencial, juntamente com os respectivos ângulos diedrais para as configurações de cada um dos quatro sistemas acima.

5.1.2 Resultados e discussão

dinâmica a 300 K

Nos primeiros nanosegundos de dinâmica, nas condições descritas anteriormente, são observadas instabilidade na temperatura e nas energias para o Trp (Figura-5.2a e b). No início da dinâmica é mais freqüente o valor da temperatura escapar do intervalo permitido para a sua flutuação (linha tracejada na Figura-5.2a). O acoplamento com um reservatório térmico, representado pela renormalização das velocidades (Equação-4.19), corrige a temperatura em cada ciclo que a mesma estiver fora do intervalo permitido, fazendo com que a sua flutuação tenha a amplitude diminuída e ocorra somente em torno da temperatura de referência T_0 . O controle das velocidades permite controlar a energia do sistema de maneira que, com o avanço da dinâmica, as energias cinética e potencial tendem a oscilar em fases opostas e a energia total, que é a soma das duas, tende a conservar-se (Figura-5.2b). Na simulação caracterizada na Figura-5.2, pode-se observar mudanças conformacionais para o Trp por rotações somente em torno da ligação $C_\beta-C_\gamma$, ângulo diedral χ_2 , não ocorrendo interconversões entre conformações em torno da ligação $C_\alpha-C_\beta$, ângulo diedral χ_1 (Figura-5.2c). Esse comportamento foi verificado partindo de diversas condições iniciais, com novos sorteios de direções de movimento e em outros valores possíveis para χ_1 , sendo observada somente uma interconversão de χ_1 em uma das simulações.

Uma maior interconversão para χ_2 foi também observada por Gordon (1992) por simulação de dinâmica molecular.

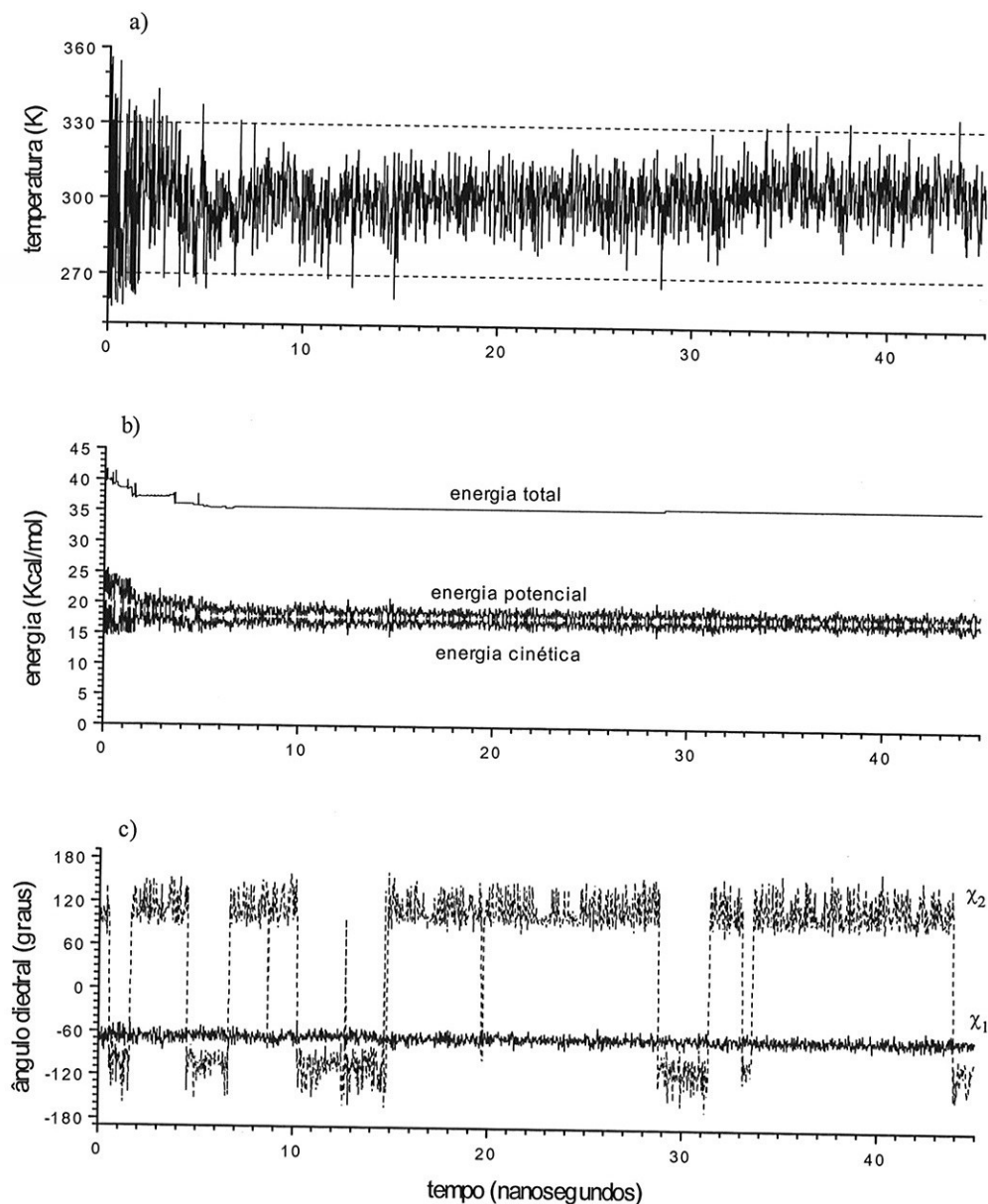


Figura-5.2 Variações de (a) temperatura, (b) energia cinética, potencial e total e (c) ângulos diedrais χ_1 e χ_2 para o tiptofano em dinâmica de 45 nanosegundos.

localização de rotâmeros

Os resultados do *annealing* para a localização dos seis rotâmeros do Trp na forma zwitteriônica ou no peptídeo Ala-Trp-Ala, nos meios de $\epsilon = 80$ e $\epsilon = 2$, são apresentados na Figura-5.3. Nos eixos-X estão o ângulo diedral χ_1 e nos eixos-Y o ângulo χ_2 para cada uma dessas quatro condições. 2099 pontos estão distribuídos em cada quadro nas posições *t*, *g*- e *g*+, para χ_1 , e *perp* e *anti* para χ_2 . Os valores para $\chi_1 t$ encontram-se divididos em duas posições, em torno de -180° e $+180^\circ$, que

correspondem ao mesmo poço de potencial. Praticamente não há diferenças nas localizações dos mínimos rotacionais para o Trp, em relação ao solvente ou na forma isolada com respeito à intercalada no peptídeo. Comparando-se a Figura-5.3a (Trp em $\epsilon = 80$) com a 5.3b (Trp em $\epsilon = 2$) e a Figura 5.3c (Ala-Trp-Ala em $\epsilon = 80$) com a 5.3d (Ala-Trp-Ala em $\epsilon = 2$), não se observa dependência com a constante dielétrica do meio. Um maior espalhamento dos pontos é observado para os rotâmeros do Trp no peptídeo (Figura-5.2c e 5.2d) porém, as concentrações destes ocorrem nas mesmas regiões onde se concentram os pontos do Trp zwitteriônico (Figura-5.2a e 5.2b).

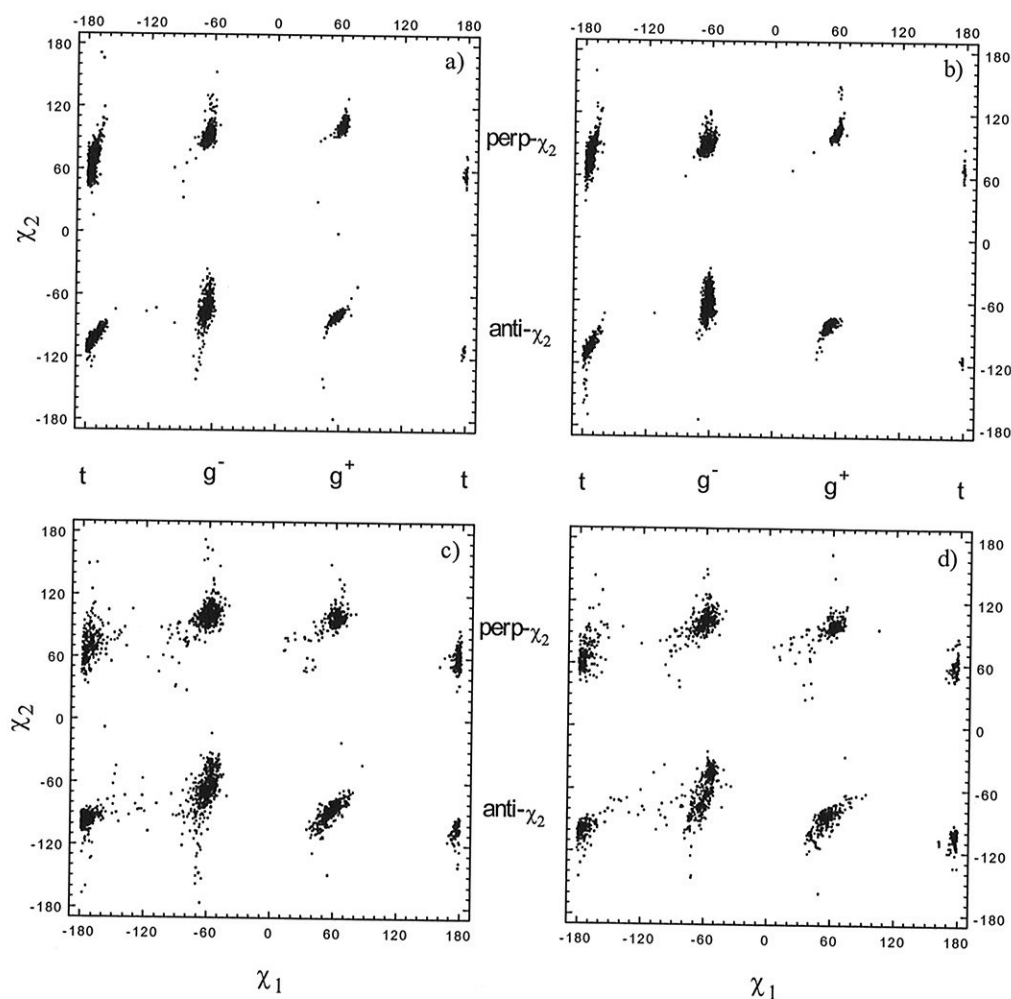


Figura-5.3 Localização dos rotâmeros do triptofano na forma de zwitterion em (a) $\epsilon = 80$ e (b) $\epsilon = 2$; e no peptídeo Ala-Trp-Ala (c) em $\epsilon = 80$ e (d) $\epsilon = 2$.

O grupo indol no Trp não contém cargas formais, possuindo somente uma região polar envolvendo a ligação N-H (Apêndice-A). Este fato faz com que as interações eletrostáticas do indol com os terminais carregados no zwitterion, ou com os grupos polares do esqueleto peptídico, não desloquem os mínimos locais de

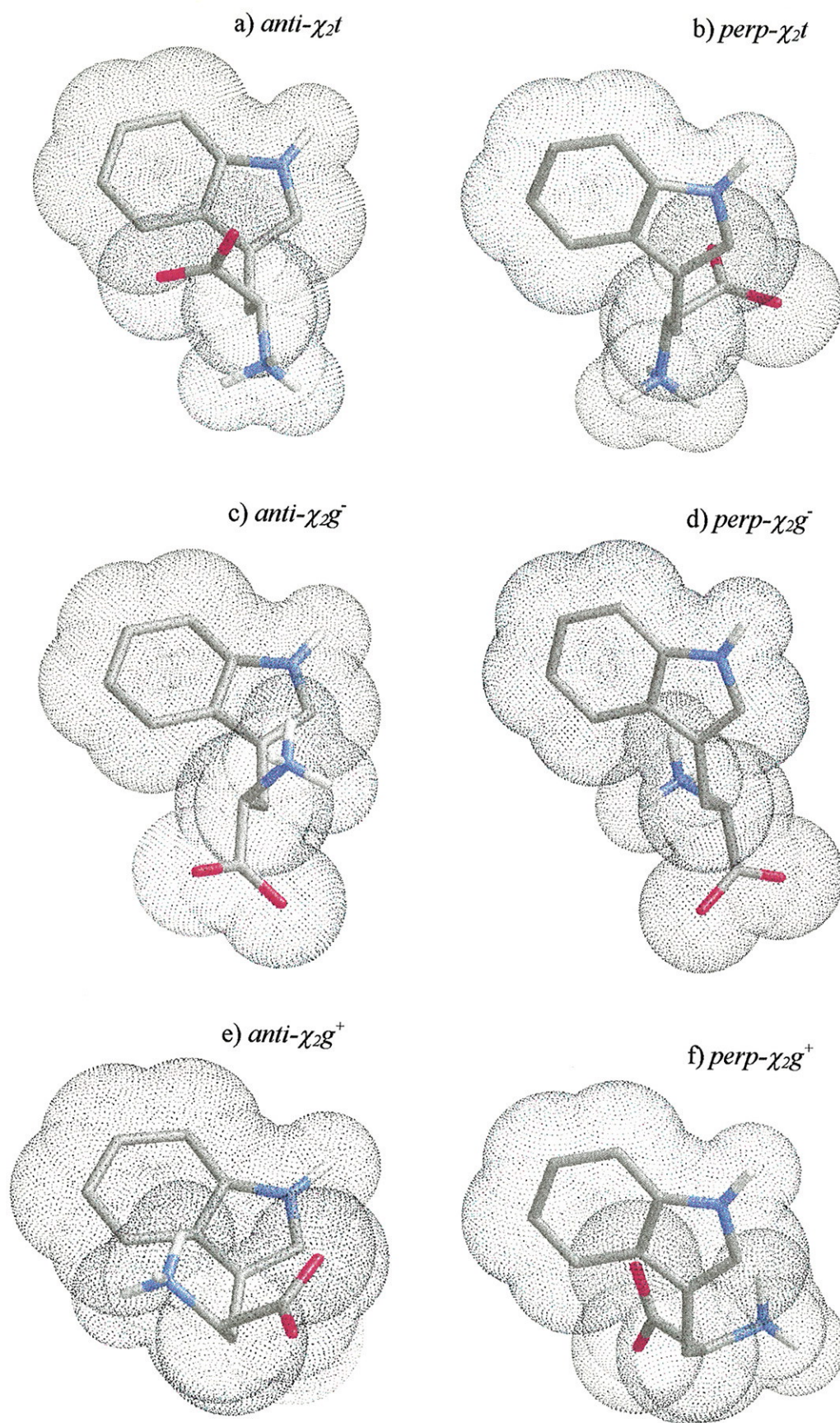


Figura-5.4 Representação gráfica dos rotâmeros do triptofano.

energia, de maneira significativa, de suas posições quando a molécula muda de solvente. Para aminoácidos isolados de cadeia lateral carregada como o ácido aspártico este deslocamento é observável. As diferenças nas vizinhanças do Trp, quando o mesmo está inserido na cadeia peptídica, mostram ainda que a interação de van der Waals com os átomos das alaninas também não desloca qualitativamente os mínimos de suas posições. Essas análises porém, são feitas com base em cálculos clássicos que consideram o solvente como um contínuo eletrostático.

É possível inferir, da discussão acima, que os potenciais de curto alcance desempenham o papel mais importante na definição e constância das posições dos mínimos rotacionais do Trp. Porém, uma inspeção na ligação química $C_{\beta}-C_{\gamma}$ que é estabelecida entre um carbono tetraédrico e um planar, ou nos parâmetros para as torções nesta ligação constantes nos Apêndices A e B, mostram que uma rotação de 360° de χ_2 leva a seis mínimos de energia. Este número de mínimos, combinado com os três mínimos para torções na ligação $C_{\alpha}-C_{\beta}$ conduziriam a dezoito rotâmeros para o Trp. A limitação do número de rotâmeros em seis e o não deslocamento dos mínimos de energia correspondentes, pode então ser atribuída às restrições estéricas para rotações. As esferas de van der Waals do indol e dos terminais no zwitterion, ou dos átomos mais próximos no esqueleto peptídico, permitiriam a existência de apenas dois mínimos para rotações de χ_2 e imporiam restrições ao deslocamento dos seis mínimos. As imagens dos seis rotâmeros do Trp na forma zwitteriônica, envoltos em suas superfícies de van der Waals, são apresentadas na Figura-5.4.

população de rotâmeros

A 900 K espera-se que a energia cinética em um sistema molecular esteja acima de todas as barreiras rotacionais. As barreiras para rotações em χ_1 e χ_2 são transpostas com frequência elevada nessa temperatura como pode ser observado na Figura-5.5, onde alguns resultados de *annealing* são apresentados de forma diferente em relação aos da Figura-5.3. Na Figura 5.5a e 5.5b a seqüência de 2099 pontos, para duas simulações do Trp zwitteriônico em $\epsilon = 80$, são registradas em função dos ângulos diedrais χ_1 e χ_2 . Essas simulações foram efetuadas a partir de condições iniciais idênticas, com exceção da distribuição e sorteio das velocidades. A constância dos saltos sobre as barreiras pode ser verificada pela distribuição, praticamente uniforme, dos pontos pelos mínimos rotacionais com o avanço da dinâmica. Nos detalhes, Figuras 5.5c e 5.5d, são apresentados os 100 primeiros pontos dessas duas

simulações unidos por linhas para visualização das trajetórias dos ângulos diedrais. Essas trajetórias mostram que as evoluções das duas dinâmicas foram diferentes, refletindo diferentes distribuições e sorteios para as velocidades iniciais.

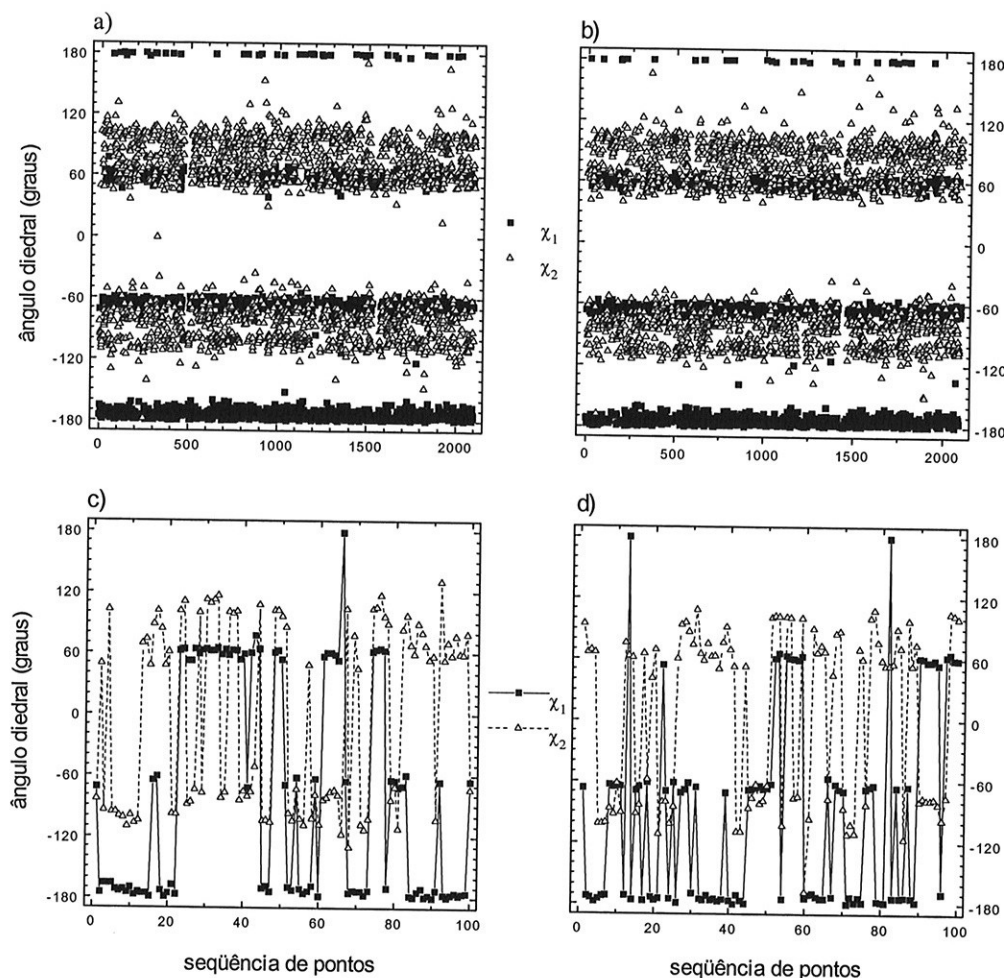


Figura-5.5 Seqüências de pontos obtidos com *annealing* para o triptofano, na forma de zwitterion em $\epsilon = 80$, partido de diferentes sorteios iniciais (a) e (b). Detalhes dos 100 primeiros pontos dessas simulações (c) e (d).

Apesar de seguirem por diferentes trajetórias, as dinâmicas expostas na Figura-5.5, levaram a populações semelhantes para os seis rotâmeros do Trp em $\epsilon = 80$, obtidas com o *annealing*. A distribuição percentual dos rotâmeros do Trp pelas seis configurações de mínima energia são apresentadas na Tabela-5.1a, para as duas simulações. As diferenças percentuais entre as duas simulações não excedem 2%. O rotâmero mais visitado foi o *perp- χ_2t* , com 30 %, seguido pelo *anti- χ_2t* , com 19-20%. Os menos visitados foram o *perp- χ_2g^+* (8-9%) e o *anti- χ_2g^+* (7-9%). Os rotâmeros *perp- χ_2g^-* e *anti- χ_2g^-* obtiveram em torno de 15-16% e 18% dos pontos,

respectivamente. É possível supor, a partir desses dados, que em uma amostra contendo N moléculas de Trp em água ocorra uma distribuição percentual semelhante da população dos seis rotâmeros.

Tabela-5.1 Resultados numéricos do *annealing* para o triptofano em $\epsilon = 80$
(*simulação apresentada na Figura 5.3a e 5.5a)

a) distribuição populacional de rotâmeros							
rotâmero		χ_1-t		χ_1-g^-		χ_1-g^+	
perp- χ_2	%	30,54*	30,20	14,67*	16,44	8,91*	7,77
anti- χ_2	%	20,25*	18,53	18,20*	17,77	7,43*	9,29
	totais (χ_1)	50,79%*	48,73%	32,87%*	34,21%	16,34%*	17,06%

b) energia e posição do mínimo para cada rotâmero							
rotâmero		χ_1-t		χ_1-g^-		χ_1-g^+	
perp- χ_2	energia (Kcal/mol)	15,08674*	15,08292	15,44685*	15,45344	15,21488*	15,21858
	posição ($\chi_1; \chi_2$)	-178,70; 57,56*	-178,27; 53,66	-64,83; 93,97*	-64,34; 90,60	60,58; 102,18*	61,48; 102,89
anti- χ_2	energia (Kcal/mol)	14,78998*	14,78538	15,57766*	15,57420	15,51307*	15,51792
	posição ($\chi_1; \chi_2$)	-172,78; -104,35*	171,95; -101,93	-66,44; -78,30*	-66,80; -78,02	57,76; -79,60*	56,94; -80,34

Os menores valores de energia potencial obtidos para cada um dos seis rotâmeros, nas duas simulações, são expostos na Tabela-5.1b, onde são incluídos os valores angulares de χ_1 e χ_2 para esses mínimos. As diferenças na energia mínima, entre as duas simulações, situam-se na segunda ou terceira casa após a vírgula e as diferenças nas posições não excedem três graus para a maioria dos rotâmeros. Comparando-se as Tabelas 5.1a e 5.1b não se observa uma correspondência entre as populações de rotâmeros e os valores mínimos de energia. Poderia se esperar que a conformação com o mínimo global, *anti- χ_2t* , fosse a mais populada. Porém, a medida da energia potencial intramolecular não é um bom parâmetro para esta comparação. Ela corresponde somente à energia interna da molécula mergulhada em um contínuo eletrostático. Para se fazer tal comparação seria necessário estimar o valor da energia livre de Gibbs.

Para o Trp em $\epsilon = 2$ foi utilizado o mesmo procedimento que em $\epsilon = 80$. Duas simulações foram também efetuadas para testar a reprodutibilidade dos resultados. Na Tabela-5.2a encontra-se a distribuição percentual para a população de rotâmeros e na Tabela-5.2b as energias e posições angulares dos rotâmeros de menor energia.

Comparando-se essas duas simulações em $\epsilon = 2$ pode se dizer novamente, que as diferenças percentuais entre as populações não excedem 2%, que as diferenças nas energias mínimas aparecem na segunda ou terceira casa após a vírgula e que as coordenadas angulares diferem em torno de três graus para a maioria dos rotâmeros. Em $\epsilon = 2$ os rotâmeros mais populados foram o *anti- χ_2g^-* (25-26%), e o *perp- χ_2g^-* (25%), seguidos pelo *perp- χ_2t* (19-21%). O menos populado foi o *perp- χ_2g^+* (6%). Os rotâmeros *anti- χ_2g^+* e *anti- χ_2t* obtiveram cerca de 11-13% e 12% dos pontos, respectivamente. O mínimo global de energia (Tabela-5.2b) pertenceu ao rotâmero *perp- χ_2g^-* .

Tabela-5.2 Resultados numéricos do *annealing* para o triptofano em $\epsilon = 2$
(*simulação apresentada na Figura-5.3b)

a) distribuição populacional de rotâmeros							
rotâmero		χ_1-t		χ_1-g^-		χ_1-g^+	
<i>perp-χ_2</i>	%	20.96*	19.20	24.59*	24.54	5.57*	5.71
<i>anti-χ_2</i>	%	11.62*	12.15	26.45*	25.30	10.81*	13.10
	totais (χ_1)	32,58%*	31,35%	51,04%*	49,84%	16,38%*	18,81%

b) energia e posição do mínimo para cada rotâmero							
rotâmero		χ_1-t		χ_1-g^-		χ_1-g^+	
<i>perp-χ_2</i>	energia (Kcal/mol)	-26,78157*	-26,77785	-27,45138*	-27,44871	-26,22634*	-26,22186
	posição ($\chi_1; \chi_2$)	-173.94; 85.04*	-174.08; 88.10	-63.60; 89.43*	-65.51; 86.83	55.86; 98.17*	58.50; 97.88
<i>anti-χ_2</i>	energia (Kcal/mol)	-26,62378*	-26,63474	-26,89875*	-26,91390	-27,11900*	-27,14016
	posição ($\chi_1; \chi_2$)	-172.68; -107.60*	-176.30; -106.75	-62.69; -68.54*	-61.91; -65.40	55.44; -81.77*	53.47; -83.19

As posições dos mínimos de energia para cada rotâmero não variam significativamente quando o Trp passa do meio de $\epsilon = 80$ para $\epsilon = 2$, como observado nas distribuições na Figura-5.3. As pequenas variações nas posições dos mínimos de menor energia entre o Trp em $\epsilon = 80$ (Tabela-5.1b) e em $\epsilon = 2$ (Tabela-5.2b) apontam na mesma direção. Há porém, duas exceções significativas envolvendo o ângulo torcional χ_2 . Este ângulo aumenta cerca de 30° no rotâmero *perp- χ_2t* e cerca de 10° no rotâmero *anti- χ_2g^-* quando o Trp passa para o meio de menor constante dielétrica. As maiores variações com a mudança de meio estão no deslocamento do mínimo global,

que passa do rotâmero *anti- χ_2^t* para o rotâmero *perp- $\chi_2^g^-$* , e na distribuição populacional que muda quase que completamente.

Nos resultados de NMR freqüentemente são distinguidas somente três populações de rotâmeros para o Trp, as quais têm sido associadas às conformações *trans*, *gauche⁻* e *gauche⁺* para rotações de χ_1 . Esta associação é feita assumindo-se que as rotações de χ_2 são muito mais rápidas que as de χ_1 , com respeito à escala de tempo de relaxação em NMR (Gordon et al., 1992; Ross et al., 1992). Para efeito de comparação com resultados experimentais portanto, as populações dos rotâmeros *perp- χ_2* e *anti- χ_2* são somadas nas Tabelas 5.1a e 5.2a. Em $\epsilon = 80$ em torno de 49-51% dos pontos caíram na posição *trans* de χ_1 enquanto que somente cerca de 16-17% caíram em *gauche⁺*, ficando a posição *gauche⁻* com 33 a 34%. No meio com $\epsilon = 2$ ocorre uma inversão das populações em *gauche⁻* e *trans*, em relação ao meio com $\epsilon = 80$. *gauche⁻* recebe cerca de 50-51% dos pontos enquanto a conformação *trans*, 31 a 33%. A conformação *gauche⁺* continua a menos visitada, com 16 a 19% dos pontos.

Tem sido observado em experimentos de NMR que a conformação em *gauche⁺* para o Trp, quando não é a menos populada, com freqüência permanece abaixo da média de 33%. As populações em *trans* e *gauche⁻* estariam mais sujeitas às alterações ambientais, ou às vizinhanças em uma cadeia peptídica, sendo por isto mais ou menos populadas que a média (Dezube et al., 1981; Jäcke & Luisi, 1984; Sugg et al., 1988; Ross et al., 1992). Voltando às imagens para os seis rotâmeros na Figura-5.4, pode-se observar uma maior proximidade do grupo indol com os terminais NH_3^+ e COO^- para a conformação *gauche⁺* (*perp* e *anti- χ_2*). As rotações de χ_2 seriam dificultadas pelos dois terminais, o que levaria a uma menor flexibilidade para essa conformação tornando-a menos acessível dinamicamente. Nas conformações *trans* e *gauche⁻* o grupo indol teria seus movimentos, pela rotação de χ_2 , restringidos somente por um dos terminais. É então possível associar às conformações *trans* e *gauche⁻* uma maior entropia com relação à *gauche⁺*. Essa associação seria também necessária para que, na distribuição populacional de rotâmeros, os mais populados fossem os de menor energia livre de Gibbs.

estruturas secundárias hélice- α e folha- β

Para o peptídeo Ala-Trp-Ala, além das conformações da cadeia lateral do Trp, foram ainda monitoradas as do esqueleto peptídico. Os resultados são apresentados na Figura-5.6, onde 2099 pontos encontram-se distribuídos principalmente pelas

posições correspondentes à estruturas secundárias hélice- α e folha- β , para o peptídeo nos meios de $\epsilon = 80$ e $\epsilon = 2$. Essas estruturas assumem posições definidas nos ângulos torcionais ϕ (medido sobre o diedro C-N-C $_{\alpha}$ -C) e ψ (medido sobre o diedro N-C $_{\alpha}$ -C-N) do esqueleto peptídico (Ramachandran et al., 1963; Voet & Voet, 1990). Para o ângulo ϕ , os limites para ambas estão aproximadamente em -180° e -50° , enquanto que para ψ , as hélices- α situam-se em torno de -40° e as folhas- β entre os limites 80° e 180° . Não são consideradas aqui as sub-estruturas da região β , as conformações intermediárias entre hélice- α e folha- β e as conformações em hélice- α para a esquerda (segundo quadrante do diagrama). O ângulo torcional ω (medido sobre o diedro C $_{\alpha}$ -C-N-C $_{\alpha}$) tem duas posições de mínima energia, uma em 0° e outra em 180° . Dos 2099 pontos, caíram em torno de $\omega = 180^{\circ}$ 1392 pontos para o solvente de $\epsilon = 80$ e 1398 para $\epsilon = 2$. Observou-se não haver influência do valor do ângulo ω (0° ou 180°) na construção do diagrama de Ramachandran (Figura 5.6a e 5.6b). Os valores das energias potenciais para $\omega = 0^{\circ}$ não diferiram significativamente dos valores de energia para $\omega = 180^{\circ}$.

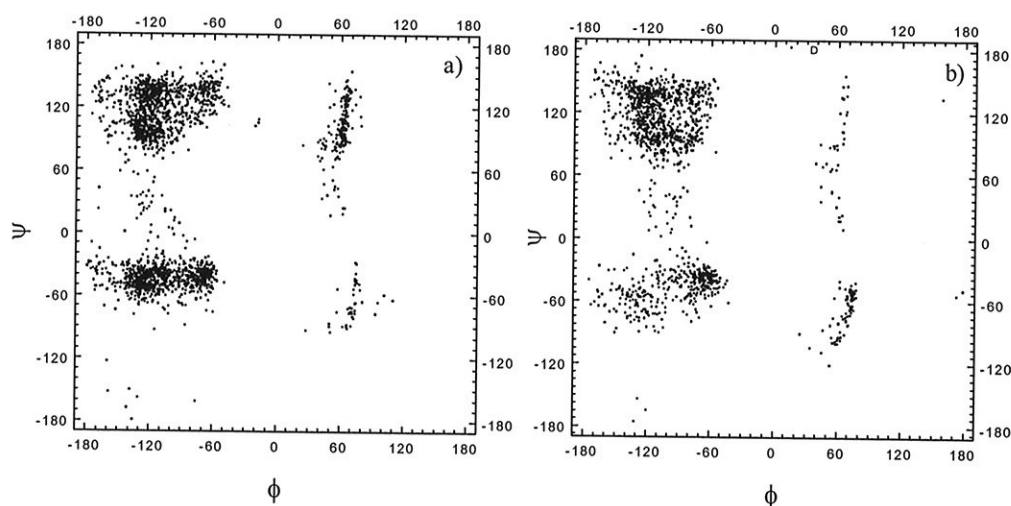


Figura-5.6 Diagramas de Ramachandran: ângulo diedral ϕ versus ψ (veja na Figura-1) para o triptofano no peptídeo Ala-Trp-Ala, em (a) $\epsilon = 80$ e (b) $\epsilon = 2$.

Como as estruturas protéicas são constituídas basicamente com o ângulo ω em 180° , na análise populacional da Tabela-5.3 as conformações com $\omega = 0^{\circ}$ foram descartadas. Os pontos para os valores positivos de ϕ também foram desconsiderados, para restringir a análise somente sobre as estruturas hélice- α e folha- β . As distribuições percentuais na Tabela-5.3a, Ala-Trp-Ala em $\epsilon = 80$, foram portanto

calculadas com 1241 pontos e na Tabela-5.3b, Ala-Trp-Ala em $\epsilon = 2$, com 1262 pontos. Nessas tabelas os seis rotâmeros do Trp estão associados com essas duas conformações básicas do esqueleto peptídico. Em $\epsilon = 80$ as populações tipo hélice- α (48,03%) e tipo folha- β (51,97%) foram aproximadas, enquanto no meio de $\epsilon = 2$ a população tipo folha- β (73,69%) foi superior. Num ambiente polar a distribuição populacional de rotâmeros pelas estruturas secundárias é mais homogênea (Tabela-5.3a), comparada à distribuição em um ambiente apolar (Tabela-5.3b), onde as interações eletrostáticas impõem maior restrição conformacional. Considerando as somas dos rotâmeros *perp* e *anti*- χ_2 , a conformação *gauche*⁻ para χ_1 foi a mais visitada nos dois meios (39% e 42,4%). Porém, enquanto em $\epsilon = 80$ é mantida a distribuição aproximada entre hélice- α (18,62%) e folha- β (20,38%), em $\epsilon = 2$ houve privilégio para folha- β (35,34%) ficando a hélice- α (7,06%) a conformação menos visitada. Finalizando a análise dessa tabela, a conformação *gauche*⁺ para χ_1 continua com menor população, ou abaixo da média, nos dois meios (27,4% em $\epsilon = 80$ e 28,76% em $\epsilon = 2$), concordando com a análise feita para o Trp na forma zwitteriônica. Nesse caso, o bloqueio para rotações em χ_2 seria feito pelos dois lados do esqueleto peptídico, em substituição aos grupos terminais NH_3^+ e COO^- do Trp zwitteriônico.

Tabela-5.3 Distribuição populacional de rotâmeros para o triptofano no peptídeo Ala-Trp-Ala.

a) $\epsilon = 80$ (simulação apresentada na Figura-5.3c)									
rotâmero		χ_1 -t		χ_1 -g ⁻		χ_1 -g ⁺		totais (estruturas)	
		hélice- α	folha- β	hélice- α	folha- β	hélice- α	folha- β	hélice- α	folha- β
<i>perp</i> - χ_2	%	7.01	9.11	10.56	10.64	7.17	6.37		
<i>anti</i> - χ_2	%	8.86	8.62	8.06	9.74	6.37	7.49		
totais parciais	%	15,87	17,73	18,62	20,38	13,54	13,86	48,03	51,97
totais (χ_1)	%	33,60		39,00		27,40		100%	

b) $\epsilon = 2$ (simulação apresentada na Figura-5.3d)									
rotâmero		χ_1 -t		χ_1 -g ⁻		χ_1 -g ⁺		totais (estruturas)	
		hélice- α	folha- β	hélice- α	folha- β	hélice- α	folha- β	hélice- α	folha- β
<i>perp</i> - χ_2	%	3.72	9.35	3.41	18.46	4.60	8.48		
<i>anti</i> - χ_2	%	5.15	10.62	3.65	16.88	5.78	9.90		
totais parciais	%	8,87	19,97	7,06	35,34	10,38	18,38	26,31	73,69
totais (χ_1)	%	28,84		42,40		28,76		100%	

conexão com a fluorescência resolvida no tempo

Em estudos sobre o decaimento da fluorescência em análogos do Trp, tem se estabelecido a correspondência entre as amplitudes preexponenciais e as populações obtidas por NMR (Colucci et al., 1990; McMahon et al., 1992). Em alguns peptídeos contendo Trp, demonstrou-se que as populações dos três rotâmeros derivadas de experimentos de NMR, estão em excelente concordância com as amplitudes das três componentes do decaimento fluorescente (Ross et al., 1992). As duas conformações para rotação de χ_2 são menos estáveis que as conformações para rotação de χ_1 , como sugerem a Figura-5.2c e um outro estudo por dinâmica molecular (Gordon et al., 1992). Na Figura-5.2c, as interconversões em χ_2 correspondem a um tempo médio de aproximadamente 2,4 nanosegundos para a duração de um microestado conformacional a 300 K, o que é da ordem de grandeza dos tempos de vida para o estado excitado observados em fluorescência. É possível ainda, que o tempo médio de uma conformação, obtido por simulação diminua ao se considerar as colisões com as moléculas do solvente (Gordon e al, 1992). Foi estimado por NMR que as interconversões em torno de χ_1 ocorrem em intervalos da ordem de milisegundos (Ross et al., 1992). As interconversões em χ_2 , que são rápidas o suficiente para não serem resolvidas por NMR também não o seriam por fluorescência com resolução temporal. Esses resultados reforçam o “modelo de rotâmero” para o decaimento da fluorescência do Trp, onde cada tempo de vida de estado excitado estaria associado a uma das conformações *trans*, *gauche*⁻ ou *gauche*⁺ para rotações em torno da ligação C_α-C_β.

Se por um lado em experimentos de NMR é possível identificar as populações de cada um dos três rotâmeros para torções em χ_1 , os parâmetros de fluorescência sozinhos são insuficientes para afirmar a que rotâmero corresponde cada tempo de vida. Mesmo em estudos combinados dessas duas técnicas, a identificação entre amplitudes dos termos preexponenciais na fluorescência e as populações obtidas por NMR pode exigir condições especiais, que favoreçam a desexcitação do cromóforo indol por fluorescência. Há vários processos que competem com a fluorescência do indol, como reações de estado excitado, incluindo transferência de próton, transferência de elétron e fotoionização (Creed, 1984). As coordenadas otimizadas dos seis rotâmeros do Trp zwitteriônico, obtidas no presente trabalho, foram submetidas a cálculos de transferência de elétrons entre o indol e o terminal COO⁻ por Goldman (1995). O objetivo foi verificar o papel dessa fotoreação na supressão da fluorescência

do Trp. Os resultados mostraram que para os rotâmeros *perp- χ_2g^-* e *anti- χ_2g^-* a emissão fluorescente compete com a transferência de elétron, enquanto que para os demais rotâmeros a desexcitação ocorre predominante pela transferência de elétron. Dominando ou não a desexcitação, os processos de decaimento não radiativos se encaixam no “modelo de rotâmeros”, pois atuariam de acordo com a heterogeneidade das vizinhanças do indol atribuindo um tempo de vida para cada rotâmero.

5.2 Estabilidade de hélice- α em polialanina

Espera-se que os grupos polares C-O e N-H do esqueleto peptídico interajam mais favoravelmente com outros grupos polares, como as moléculas de água. Na presença de um solvente apolar porém, o custo energético para a manutenção desses grupos é reduzido satisfazendo-se todas as possíveis pontes de hidrogênio (C-O...H-N) intramoleculares. Localmente, isso acontece nas estruturas secundárias em hélice- α , pelo enrolamento da cadeia e formação de pontes entre os grupos C-O do resíduo aminoácido n e o grupo N-H do resíduo $n + 4$. Na ausência de fatores locais que causam ruptura, a hélice- α seria a conformação mais estável e compacta das proteínas (Richardson & Richardson, 1989). Nas estruturas em folha- β , o estabelecimento de pontes de hidrogênio acontece de maneira mais global, pela associação paralela ou antiparalela de partes distantes da cadeia (ver Figura-1.3 do Capítulo-1). Por essas propriedades essas estruturas são comuns no interior hidrofóbico das proteínas globulares e nas proteínas de biomembranas. Porém, nas proteínas solúveis em meio polar não é rara a ocorrência de hélices- α anfífilas na interface com o solvente (Branden & Tooze, 1991). Com base nas estruturas determinadas de diferentes proteínas integrais de membranas, há uma sugestão de que as porções transmembranares dessa classe de proteína seria formada com predominância de hélices- α (Lemmon & Engelman, 1994). Porém as porinas da membrana externa em bactérias, que são formadas quase exclusivamente por folhas- β antiparalelas atravessando a membrana, estariam entre as exceções a essa regra (Cowan et al., 1992).

A alanina é um aminoácido fundamental, de cadeia lateral curta, apolar, sem reatividade química e sem preferência conformacional isoladamente. Em condições apropriadas, cadeias de alaninas formam hélice- α enquanto algumas hélices em proteínas tem alta concentração de alanina (Richardson & Richardson, 1989; Sung, 1994). A interação eletrostática entre dipolos adjacentes em hélices- α é repulsiva, de maneira

que uma hélice isolada só é estável se for constituída por um número superior a catorze resíduos aminoácidos (Arridge & Cannon; 1964; Rogers, 1989). Assim, para testar a influência do solvente, como um contínuo eletrostático, na estabilidade de uma cadeia de alaninas em hélice- α , no “modelo de átomo unido”, considerou-se um polímero constituído de vinte resíduos.

5.2.1 Métodos

O programa Sequência cria um arquivo de entrada em coordenadas cartesianas, em conformação estendida. Após a pré-otimização, uma tabela em coordenadas internas é gerada pelo programa Thor no final do arquivo de saída com extensão “.OUT”. Esta tabela pode ser convertida em um arquivo de entrada, copiando-a para um arquivo com extensão “.IN” com o cabeçalho contendo as linhas de comandos apropriadas (Apêndice-A). Em coordenadas internas, o arquivo de entrada pode ser manipulado, alterando-se os ângulos de torção para se obter a conformação desejada para o início dos cálculos. Todas as etapas desse procedimento foram aplicadas para gerar as conformações trans, onde todos os diedros do esqueleto peptídico foram colocados em 180° , e hélice- α , onde os diedros C-N-C $_{\alpha}$ -C foram postos em 300° (correspondente a $\phi = -60^\circ$), os diedros N-C $_{\alpha}$ -C-N em 320° (correspondente a $\psi = -40^\circ$) e os diedros C $_{\alpha}$ -C-N-C $_{\alpha}$ em 180° ($\omega = 180^\circ$). O restante dos diedros da molécula foram ajustados como ângulos complementares para os do esqueleto. A conformação trans, com a molécula toda estendida, foi empregada para efeito de comparação com a hélice- α em dinâmicas sob as mesmas condições. As cargas nos terminais foram neutralizadas com a modelagem do peptídeo na forma acetilada, descrita anteriormente.

Com as conformações ajustadas as estruturas foram reotimizadas. Para a conformação em hélice foram empregadas duas constantes dielétricas, 2 e 80, para simular o solvente polar e apolar respectivamente. Para a conformação trans utilizou-se somente $\epsilon = 2$. Após a otimização das geometrias foram atribuídas velocidades para cada átomo conforme o procedimento descrito na seção anterior. A temperatura de referência foi levada a 300 K em 30 picosegundos, permanecendo nesse valor por um nanosegundo, o tempo total de duração de cada dinâmica. A evolução dos 20 ângulos diedrais ϕ e ψ foi registrada em todas as simulações.

5.2.2 Resultados e discussão

A estabilidade da estrutura helicoidal é um efeito cooperativo. Essa pode ser a primeira observação ao se analisar a evolução temporal dos ângulos diedrais ϕ e ψ exposta na Figura-5.7, onde os valores desses ângulos para os resíduos aminoácidos das extremidades não permanecem nos valores previstos (-60° e -40°). Os resultados na Figura-5.7 foram obtidos com a polialanina, iniciando a dinâmica em conformação hélice- α , no meio de $\epsilon = 2$. Os resíduos nas extremidades não se estabilizaram, oscilando entre conformações diversas (Figura 5.7a e 5.7t). Das extremidades para o centro do peptídeo as interconversões vão tornando-se menos freqüentes, até não serem mais observadas. Do sexto ao décimo sétimo resíduo a hélice permaneceu estável, com os diedrais ϕ e ψ flutuando sobre os valores -60° e -40° , respectivamente (Figura 5.7f a 5.7q). Em $\epsilon = 80$ a estrutura em hélice foi rapidamente desfeita, ocorrendo interconversões em todos os diedros durante a dinâmica, atribuindo maior flexibilidade ao peptídeo no meio de alta constante dielétrica (Figura-5.8). Apesar da hélice- α ser a estrutura secundária prevista para a polialanina em meio de baixa constante dielétrica, partindo-se da conformação toda trans, o peptídeo não evoluiu em direção à formação de hélice em um nanosegundo de simulação. (Figura-5.9). Pode-se dizer que somente o terceiro e o quarto resíduo terminaram em conformação helicoidal, sugerindo uma nucleação que poderia propagar-se pela cadeia (Figura 5.9c e 5.9d). Porém esses resíduos estão em uma extremidade, onde a hélice não é estável.

As imagens das três conformações finais para as simulações correspondentes às Figuras 5.7 a 5.9 são apresentadas na Figura-5.10, onde as pontes de hidrogênio estão representadas por bastões e o esqueleto peptídico é marcado por uma barra retangular. A 300 K a hélice é mantida por pontes de hidrogênio múltiplas, ou flutuantes, entre os resíduos n e $n + 3$, $n+4$ ou $n + 5$ (Figura-5.10a). Em $\epsilon = 80$ a maioria das pontes intramoleculares são desfeitas levando ao estiramento da cadeia, simulando assim a blindagem da interação eletrostática entre os grupos polares do peptídeo pela água ou o estabelecimento de pontes intermoleculares com a mesma (Figura-5.10b). Em $\epsilon = 2$ o peptídeo estirado inicialmente torna-se empacotado sob a ação de forças eletrostáticas maiores em solvente de baixa constante dielétrica (Figura-5.10c). Nesse ambiente um grande número de pontes de hidrogênio são estabelecidas no peptídeo, as quais seriam deslocadas nas mudanças conformacionais. A suposta nucleação para a formação de hélice aparece na parte inferior da Figura-5.10c.

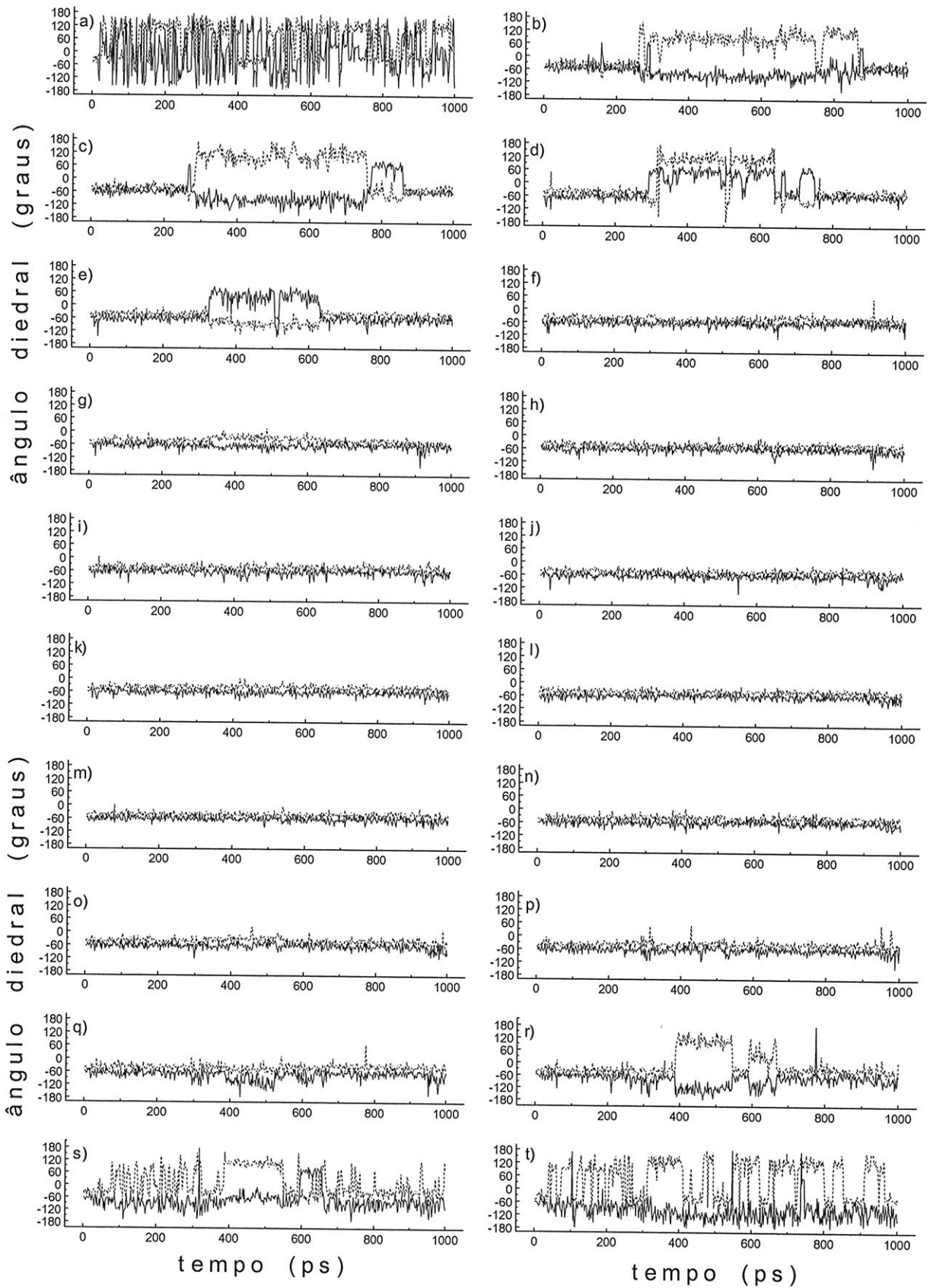


Figura-5.7 Evolução temporal dos ângulos diedrais ϕ (linha contínua) e ψ (linha tracejada) da polianilina em conformação inicial hélice- α , em $\epsilon = 2$.

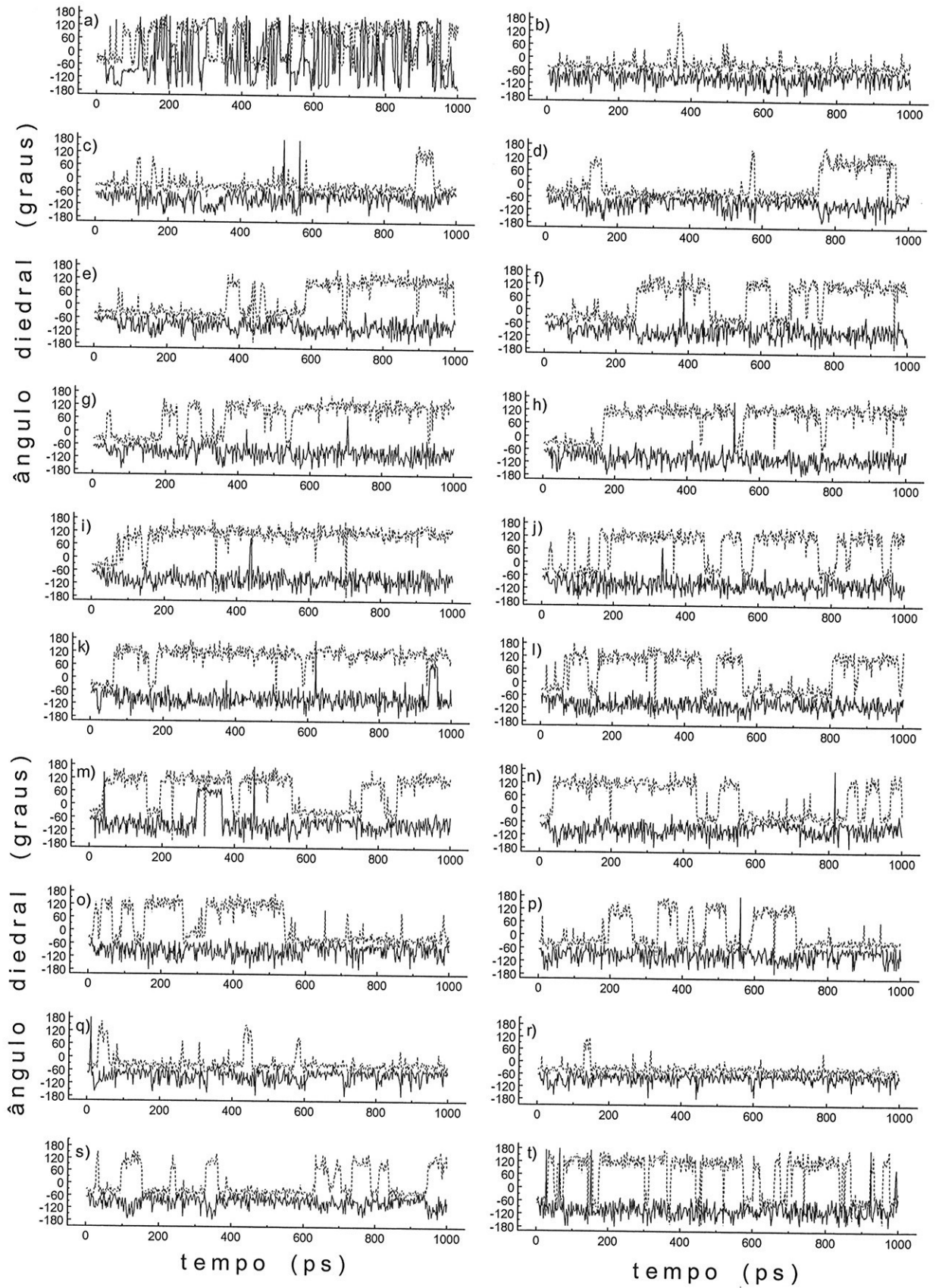


Figura-5.8 Evolução temporal dos ângulos diedrais ϕ (linha contínua) e ψ (linha tracejada) da polialanina em conformação inicial hélice- α , em $\epsilon = 80$.

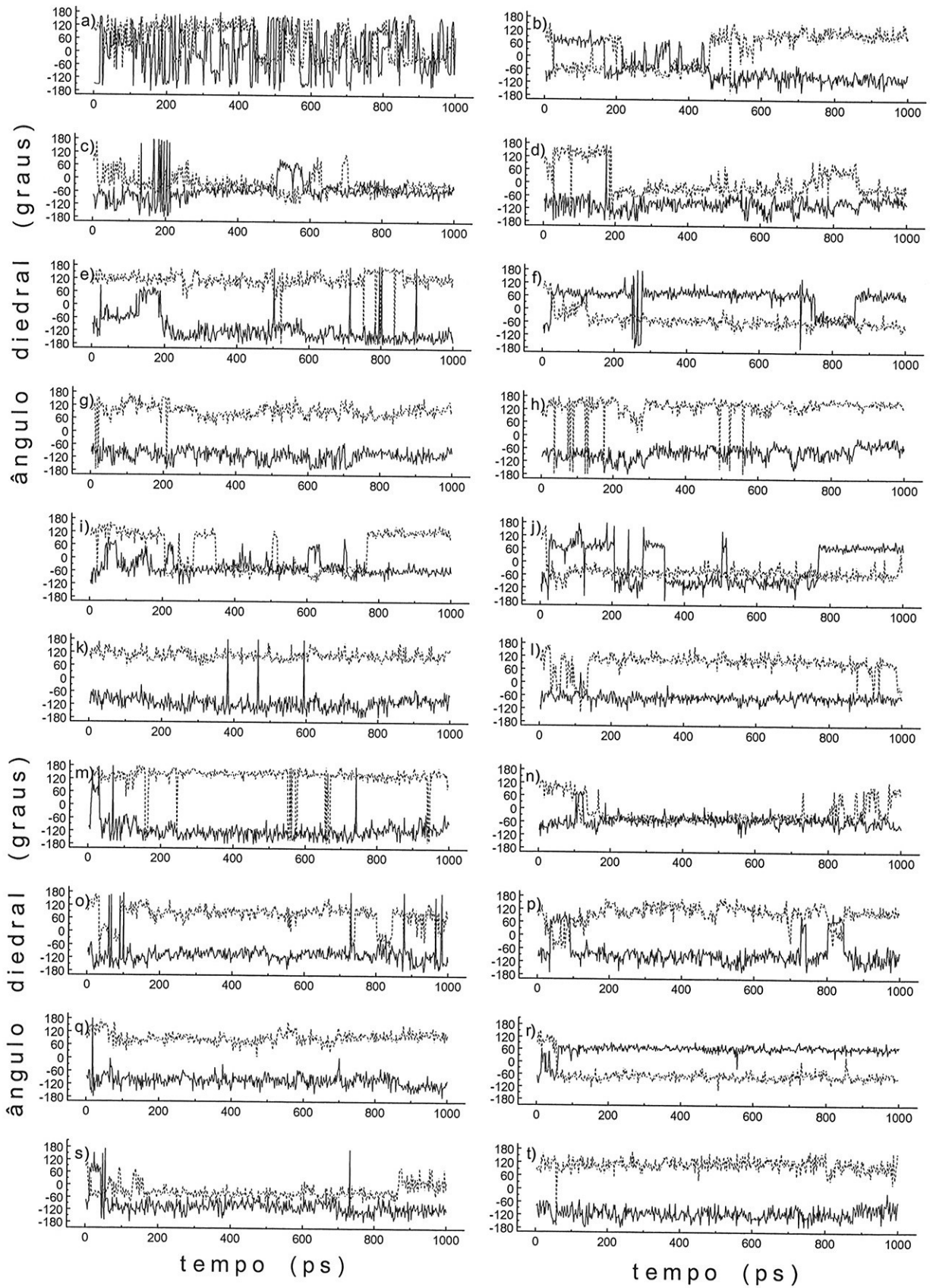


Figura-5.9 Evolução temporal dos ângulos diedrais ϕ (linha contínua) e ψ (linha tracejada) da polialanina em conformação inicial trans, em $\epsilon = 2$.

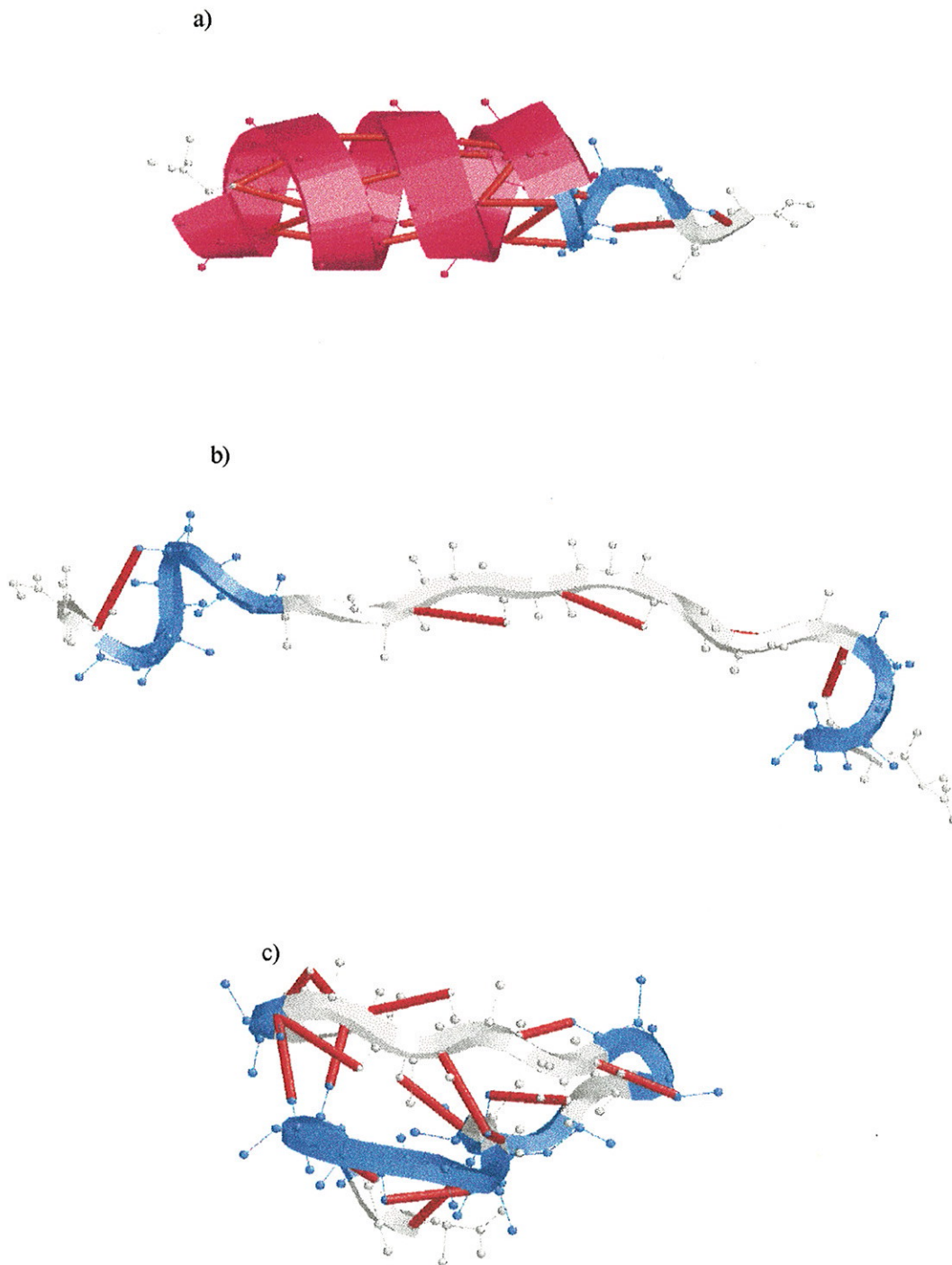


Figura-5.10 Representações gráficas para a polialanina após dinâmicas de 1 nanosegundo. O esqueleto peptídico é marcado por uma barra retangular e as pontes de hidrogênio por bastões. A conformação inicial em hélice- α permaneceu estável após a dinâmica em $\epsilon = 2$ (a), mas desfez-se em $\epsilon = 80$, evoluindo para uma forma estendida (b). A conformação inicial “toda trans” evoluiu para uma conformação mais empacotada em $\epsilon = 2$ (c). (hélice- α : magenta; *loops*: azul; estrutura secundária não definida: branco; pontes de hidrogênio: vermelho)

A estrutura tridimensional de uma cadeia peptídica é determinada por fatores como a seqüência de aminoácidos e o ambiente onde ela está inserida. Dentre as interações que determinam a estabilidade das estruturas secundárias pode-se dizer que duas delas estão entre as principais: a primeira seria a de van der Waals que, pelas restrições estéricas, determinaria os valores permitidos dos ângulos diedrais em torno de C_{α} ; a segunda seria a eletrostática que, de acordo com o campo gerado pela vizinhança, permitiria ou não o estabelecimento intramolecular de pontes de hidrogênio. Se essas interações, juntamente com os outros termos potenciais, levariam uma estrutura aleatória ou estendida a uma conformação esperada, através de um processo dinâmico, é uma questão ainda por responder. Ela poderia ser abordada com dinâmicas de maior duração. Hélices- α em polialaninas têm sido encontradas utilizando-se Simulação por Termalização Generalizada em baixa constante dielétrica (*Generalized Simulated Annealing*; Gonçalves, 1996; Moret et al., 1996) e Metrópolis Monte Carlo (Sung, 1994).

5.3 Peptídeos na interface água-membrana

Tem sido determinada a seqüência de aminoácidos de um grande número de peptídeos biologicamente ativos, os quais usualmente não formam estruturas secundárias, ou terciárias, estáveis em solução aquosa. Porém, na presença da interface biológica onde sua atividade é expressada, esses peptídeos podem apresentar regiões em estruturas secundárias anfífilas, favorecidas por forças que limitariam seu movimento na interface. Uma variedade de peptídeos contém segmentos de sua seqüência de aminoácidos com potencial para formar hélices- α anfífilas, onde os resíduos hidrofóbicos são reunidos, formando um monodomínio em uma face da hélice paralela a seu eixo (Taylor & Kaiser, 1986 e 1987). Na superfície de algumas proteínas são observadas hélices- α anfífilas, onde a seqüência de aminoácidos alterna grupos hidrofóbicos e hidrofílicos com uma periodicidade de três ou quatro resíduos aminoácidos, pois uma volta de hélice- α contém 3,6 resíduos (Finer-Moore et al., 1989; Branden & Tooze, 1991).

A periodicidade que caracteriza as hélices anfífilas foi observada num fragmento da β -endorfina humana, um peptídeo opióide natural de 31 resíduos aminoácidos. Taylor e Kaiser (1987) propuseram um peptídeo modelo para a β -endorfina, para investigar as características importantes e funcionais da provável hélice- α anfífila presente entre os resíduos 13 e 29 do peptídeo natural. A região em

hélice desse peptídeo modelo (H₂N-Pro-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Gln-Lys-Leu-Leu-Leu-Gln-Lys-Leu-Phe-Lys-Gln-Lys-Gln-OH) foi empregada aqui para testar a interface água-membrana.

Pelas suas quatro cargas negativas espera-se um comportamento hidrofílico para o peptídeo tetra-aspártico (Asp-Asp-Asp-Asp), o mesmo sendo esperado para a tetra-lisina (Lys-Lys-Lys-Lys), que possui quatro cargas positivas. Esses peptídeos também são empregados no teste da interface água-membrana, juntamente com o fragmento de quatro aminoácidos, His-Phe-Arg-Trp, responsável pela atividade biológica clássica do peptídeo melanotrópico α -MSH (hormônio estimulador de melanócito), na pigmentação (Hruby et al., 1984 e 1993). Por esse hormônio interagir com fases lipídicas, espera-se um caráter hidrofóbico para este seu tetra-peptídeo central.

5.3.1 Métodos

A conformação inicial para o fragmento de β -endorfina em hélice, foi obtida com um procedimento análogo ao da polialanina, exposto anteriormente. Porém, nesse peptídeo as cadeias laterais, que são mais longas que a da alanina, foram deixadas em conformação aleatória por falta de informação a respeito de suas conformações. Os tetra-peptídeos foram acetilados para evitar o efeito de cargas extras, sendo postos inicialmente em conformação trans. Para o His-Phe-Arg-Trp empregou-se o *annealing* para obter-se uma conformação empacotada e outra mais aberta, com a finalidade de testar o papel da conformação do peptídeo em seu comportamento frente a interface água-membrana.

As simulações com os tetra-peptídeos foram rodadas inicialmente em solvente polar ($\epsilon = 80$), sendo amortecidas as velocidades dos centros de massa, que são resultantes do sorteio inicial, até chegarem a zero. As conformações termalizadas dessas moléculas foram em seguida submetidas à presença da interface água-membrana, representada por uma superfície de descontinuidade dielétrica entre meios com $\epsilon = 80$ e $\epsilon = 2$. Os tempos de duração das dinâmicas foram de algumas dezenas de picosegundos, o suficiente para se observar a ação da interface sobre as trajetórias do centro de massa dos peptídeos. A dinâmica do fragmento de β -endorfina teve início com o peptídeo já instalado com o eixo da hélice paralelo à interface, com as superfícies predominantemente hidrofílicas e hidrofóbicas mergulhadas em seus respectivos meios solventes.

Foram monitoradas as trajetórias do centro de massa de cada molécula pela sua coordenada-X, pois a superfície de descontinuidade dielétrica é perpendicular a esse eixo, interceptando-o em $X = 0$. Para confrontar as trajetórias com a variação da energia potencial das moléculas na interface, as estruturas foram otimizadas com o centro de massa sendo posicionado em intervalos de 0,5 ângstrons em ambos os lados da superfície de descontinuidade.

5.3.2 Resultados e discussão

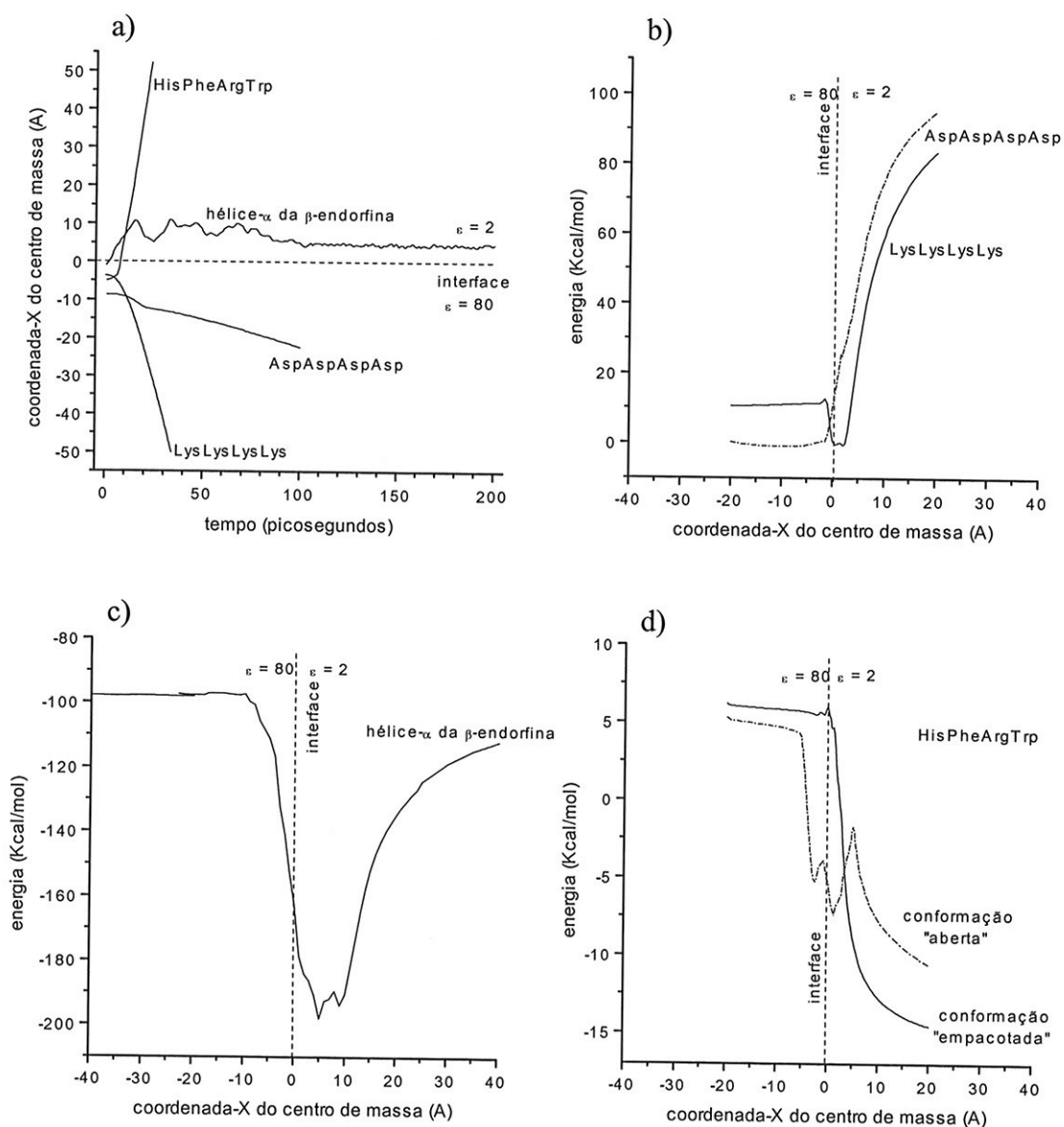


Figura-5.11 Trajetórias dos centros de massa (a) e perfis de potencial para os peptídeos: (b) Asp-Asp-Asp-Asp e Lys-Lys-Lys-Lys, (c) hélice- α de β -endorfina e (d) Hys-Phe-Arg-Trp.

As trajetórias dos centros de massa moleculares podem ser observadas na Figura-5.11a. Os peptídeos carregados, para os quais esperava-se um comportamento hidrofílico, confirmaram sua afinidade pelo meio polar com suas trajetórias afastando-se da interface em direção ao interior do meio de $\epsilon = 80$. O perfil de potencial para o tetra-aspártico (Figura-5.11b) está em perfeita concordância com sua trajetória. Para a tetra-lisina porém, o perfil de potencial apresenta um mínimo na interface. Isso está em concordância com o fato de a cadeia lateral da lisina poder ser tratada como anfifílica, pois é formada por uma seqüência hidrocarbonada com uma carga positiva na extremidade, a pH neutro (Taylor & Kaiser, 1987). Por ser uma cadeia lateral longa ela pode curvar-se sob a ação da atração eletrostática entre o grupo NH_3^+ da extremidade e os átomos de oxigênio do esqueleto peptídico, que têm carga parcial negativa. A força atrativa é maior no solvente de menor constante dielétrica, enquanto a energia potencial é menor para dipolos nesse meio. Pode ser esse o efeito causador do mínimo na interface.

O peptídeo anfifílico teve sua trajetória inicialmente flutuando entre as posições 5 e 10 ângstrons, estabilizando-se em seguida em torno de 5 ângstrons. No seu perfil de potencial pode ser observada a existência de dois mínimos, um em 10 e outro, o menor deles, em 5 ângstrons (Figura-5.11c). Barreiras de aproximadamente 100 Kcal/mol confinam o peptídeo na região da interface. É interessante notar que embora a hélice seja anfifílica o esqueleto peptídico pode estar inserido completamente no meio apolar, com o eixo da hélice a aproximadamente 5 ângstrons da superfície de descontinuidade. Esse comportamento vem de encontro à maior facilidade com que um ambiente apolar estabiliza hélices- α . As imagens do peptídeo antes e após a aplicação da dinâmica estão na Figura-5.12. A hélice otimizada é mais compacta e retilínea (Figura-5.12a) enquanto a termalizada é menos uniforme, pois a estrutura flutua termicamente, mostrando a imagem um instante da dinâmica (Figura-5.12b). Houve ruptura da hélice na região terminal-C, podendo significar somente uma flutuação da cadeia ou ainda, que o tempo simulado da dinâmica do peptídeo foi insuficiente para uma completa estabilização da hélice. As extremidades de hélices porém são instáveis devido ao efeito cooperativo entre as pontes de hidrogênio do esqueleto peptídico, conforme discussão na seção anterior.

A trajetória do peptídeo His-Phe-Arg-Trp, mostrou que o mesmo pode mergulhar em direção ao interior hidrofóbico da membrana. Comparando-se os dois meios as energias são mais altas em $\epsilon = 80$ porém, o perfil de potencial na interface

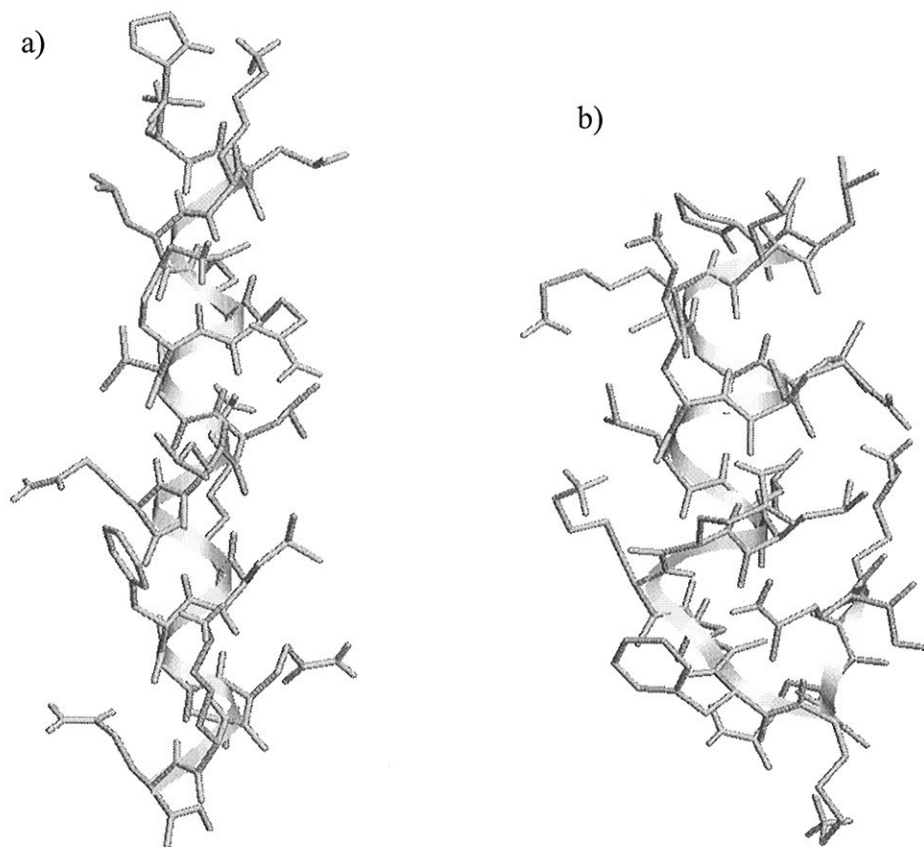


Figura-5.12 Fragmento da β -endorfina modelo (a) no início e (b) no final da dinâmica.

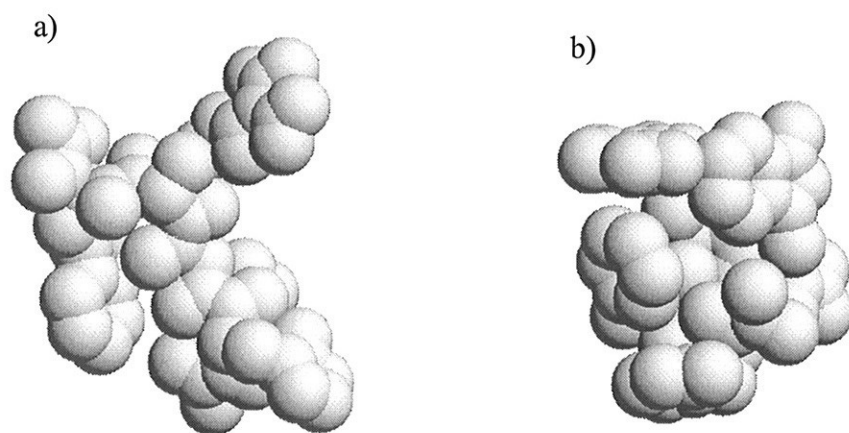


Figura-5.13 Peptídeo His-Phe-Arg-Trp em conformação (a) aberta e (b) empacotada.

depende da conformação, podendo apresentar mínimos de energia (Figura-5.11d). O particionamento na membrana seria acompanhado de um arranjo conformacional do peptídeo, pois uma conformação mais estendida pode ter menor energia potencial em meio aquoso que uma forma mais empacotada, enquanto no interior hidrofóbico das biomenbranas esse comportamento pode inverter-se (Figura-5.11d). As imagens para essas duas formas do peptídeo encontram-se na Figura-5.13, onde foi utilizada a representação da superfície de van der Waals para a visualização do grau de empacotamento. Uma conformação mais estendida em água é esperada para peptídeos com poucas dezenas de aminoácidos ou menos (Taylor & Kaiser, 1986). Os resultados para a polialanina apontam nessa direção. Pode-se dizer que a interface água-membrana imporia mudanças conformacionais em peptídeos com ação biológica no interior da fase lipídica, além de estabilizar estruturas anfífilas na interface.

6 Estudo de uma Sequência Sinal na Interface Água-membrana

Após ser sintetizada pelo organismo uma proteína necessita encontrar o caminho para a sua correta localização na célula. Dependendo da função, algumas proteínas são lançadas diretamente no citossol celular, irão para as diferentes organelas, serão secretadas para o exterior da célula ou serão inseridas em uma membrana celular para funcionarem como proteínas de transporte ou como enzimas de membrana. As seqüências sinalizadoras são encontradas na extremidade amino-terminal de proteínas destinadas à secreção ou inserção em membranas e servem para ajudar a direcionar essas proteínas aos seus destinos. Essas seqüências guias ou pré-sequências são peptídeos de 15 a 36 resíduos aminoácidos, a maioria dos quais hidrofóbicos. Nos eucariontes a atividade das seqüências sinais é catalisada por um complexo formado pela partícula de reconhecimento de sinal, ligada ao ribossomo e ao receptor dessa partícula na superfície do retículo endoplasmático rugoso (Gierasch, 1989; Voet & Voet, 1990).

Resumidamente, a parte hidrofóbica da seqüência sinal, que é lipo-solúvel, penetra através da membrana nas cisternas do retículo endoplasmático seguida pelo restante da cadeia polipeptídica a medida que esta vai sendo sintetizada no ribossomo. No momento seguinte a seqüência sinal é removida pela ação de uma enzima específica na cisterna. O restante da cadeia sofre enrolamento e processamento, podendo ser dirigido ao aparelho de Golgi, tornando-se encapsulado numa vesícula e finalmente excretado da célula como uma proteína madura. Nas bactérias ocorre um processo semelhante. As proteínas da membrana externa da *escherichia coli*, são sintetizadas por ribossomos ligados à superfície interna da membrana interna. Seqüências sinalizadoras nas extremidades amino-terminal destas proteínas guiam-nas através da membrana interna e da parede celular ao seu destino na membrana externa (Voet & Voet, 1990).

Seja em procariontes, eucariontes ou levedura, a parte hidrofóbica das seqüências sinais é decisiva para a exportação da proteína através de membranas e embora ainda não inteiramente elucidada, a maneira como isto ocorre apresenta os mesmos aspectos em qualquer desses organismos. Apesar disso, há quase total falta de homologia na seqüência de aminoácidos desses peptídeos sinalizadores, mesmo para proteínas estreitamente relacionadas. Como característica geral a estrutura primária consiste de uma cadeia de 7 a 13 resíduos aminoácidos hidrofóbicos, ladeada por

diversos resíduos hidrofílicos que incluem um ou mais resíduos positivamente carregados próximos ao terminal-N (Gierasch, 1989; Voet & Voet, 1990).

Tem-se estabelecido a interação entre peptídeos sinalizadores sintéticos e bicamadas lipídicas sugerindo para estas um possível papel no processo de translocação de proteínas através de membranas (Snel et al. 1995). Postula-se que a inserção da seqüência sinal na fase lipídica seja necessária para se ter acesso a um sítio receptor em uma proteína integral de membrana e que o aparato de translocação, formado por proteínas solúveis e integrais, seja dependente de energia (Jones & Gierasch, 1994).

Para a maior parte das estruturas secundárias estudadas em peptídeos sinalizadores isolados não se observa preferência conformacional em meio aquoso, enquanto que em meio apolar ou em presença de solução micelar há uma tendência para a formação de hélice- α , a qual tem sido também proposta a partir de métodos para a predição de estrutura (Rosenblatt et al., 1980; Emr & Silhavy, 1983; Briggs et al., 1986; Gierasch, 1989). A estabilidade dessas hélices- α seria um outro requisito para a função sinalizadora biológica (Emr & Silhavy, 1983; Bruch & Gierasch, 1990).

Neste capítulo o modelo de interface água-membrana é empregado no estudo da seqüência sinal para o receptor- λ , uma proteína de membrana externa da *e. coli*, também conhecida como LamB ou maltoporina (Arêas et al., 1994 e 1995). Essa seqüência (de 25 resíduos: Met-Met-Ile-Thr-Leu-Arg-Lys-Leu-Pro-Leu-Ala-Val-Ala-Val-Ala-Ala-Gly-Val-Met-Ser-Ala-Gln-Ala-Met-Ala) contém dois resíduos carregados positivamente na região terminal-N, a arginina-6 e a lisina-7, e um resíduo polar, a treonina-4. Na região terminal-C aparecem dois resíduos polares, a serina-20 e a glutamina-22, sendo o restante da cadeia apolar. A afinidade desse peptídeo e alguns de seus mutantes por lipídeos, bem como a capacidade destes em formar hélices- α em ambientes que mimetizam o interior de membranas biológicas tal como certos solventes orgânicos, tem sido estabelecida (Wang et al., 1993). Alguns trabalhos usando espectroscopias de infravermelho, dicroísmo circular e NMR sobre esses sistemas indicam que as seqüências funcionais apresentam uma forte preferência por estrutura secundária em conformação hélice- α (Bruch et al., 1989; Bruch & Gierasch, 1990; Jones et al., 1990; Landry & Gierasch, 1991). Estudos por fluorescência sobre peptídeos análogos contendo triptofano como fluoróforo intrínseco, substituído em diversas posições, mostram que a parte central da cadeia fica completamente imersa em bicamadas lipídicas (McKnight et al., 1991; Jones & Gierasch, 1994).

6.1 Métodos

O peptídeo foi modelado em dois diferentes estados de protonação para os terminais: um na forma zwitteriônica ($\text{NH}_3^+ \dots \text{COO}^-$) e outro na forma neutra ($\text{NH}_2 \dots \text{COOH}$). A forma zwitteriônica foi usada para concordar com a ionização esperada para os grupos terminais N e C a fim de reproduzir as condições em que os dados experimentais de NMR foram obtidos (Bruch & Gierasch, 1990). A forma neutra foi usada para se estudar o efeito das cargas-terminais na estabilidade da conformação hélice- α . Os grupos Arg^+ e Lys^+ foram mantidos protonados.

Inicialmente a geometria do peptídeo na forma zwitteriônica foi otimizada no meio polar ($\epsilon = 80$), convergindo para um mínimo de energia local, numa conformação aleatória. Em seguida foram atribuídas velocidades para os átomos da molécula, dentre uma distribuição de Maxwell-Boltzmann de velocidades, sendo sorteada uma direção para o movimento de cada átomo. Uma simulação inicial de 50 ps da dinâmica foi efetuada para permitir a termalização a 300 K no meio aquoso. Coordenadas e velocidades foram salvas e a molécula foi então submetida à presença da interface para o meio apolar ($\epsilon = 2$). Foram registradas a trajetória da molécula pela coordenada-X de seu centro de massa e a variação das energias cinética, potencial e total no decorrer da simulação. Minimizações sucessivas de energia a diversas distâncias da superfície de descontinuidade, possibilitaram traçar o perfil do potencial molecular em relação a superfície de descontinuidade.

Na etapa seguinte, foi tomada como conformação inicial a proposta na literatura com base em resultados de NMR (Bruch & Gierasch, 1990). De acordo com a mesma, uma hélice- α se forma do resíduo aminoácido Leu8 ao Met24. A conformação em hélice foi imposta, manipulando-se o arquivo de entrada em coordenadas internas para o programa, escolhendo os valores -60 e -40 graus para os diedrais ϕ e ψ respectivamente para todos os resíduos aminoácidos envolvidos. Para manter tal estrutura secundária durante o período de termalização e estabilização da molécula foi adotado um potencial diedral harmônico extra, com uma constante elevada e um mínimo de energia situado sobre a posição angular desejada. Este procedimento é sugerido na literatura de campos de forças (Brooks et al., 1983). Tanto a forma zwitteriônica como a de terminais neutros foram otimizadas em meio aquoso ($\epsilon = 80$) nas condições acima, sendo submetidas em seguida a um procedimento análogo ao utilizado com a molécula em conformação aleatória descrito anteriormente. Além

disso, essas duas estruturas foram otimizadas também no meio hidrofóbico ($\epsilon = 2$), sendo submetidas igualmente à termalização e dinâmica na presença da interface, agora para o meio aquoso ($\epsilon = 80$). São portanto, quatro situações nesta etapa: duas estruturas em conformação parcialmente helicoidal com terminais em estados de cargas diferentes, zwitteriônica e neutra, partindo ambas de dois meios contínuos diferentes, em lados opostos da interface membrana-água.

6.2 Resultados e discussão

conformação inicial aleatória

Partindo de uma forma estendida, o peptídeo evoluiu para uma conformação aleatória durante a termalização em água (o meio contínuo de $\epsilon = 80$). Na presença da interface para o meio apolar o centro de massa da molécula, que estava anteriormente em repouso, passa a se deslocar e atravessa a superfície de descontinuidade dielétrica que intercepta o eixo-X na posição 0.0 (Figura-6.1b). A afinidade do peptídeo por membrana pode ser observada pela diminuição da sua energia potencial (Figura-6.1a) a partir do momento (aproximadamente em $t = 210$ ps) em que ele atravessa para o meio de $\epsilon = 2$.

Na Figura-6.1a são apresentadas as variações das energias cinética e potencial, bem como a soma dessas, durante a simulação. A conservação da energia é verificada quando a energia total é uma reta paralela ao eixo dos tempos. A queda na energia potencial quando da entrada da molécula na membrana não é compensada por um aumento na energia cinética para que a temperatura seja mantida em 300 K. A correção das velocidades atômicas representa a troca de calor com um banho térmico externo num ensemble canônico. Essa correção é feita com maior frequência no início da dinâmica para favorecer a termalização e quando o peptídeo encontra a interface água-membrana.

Na conformação aleatória a molécula apresenta um comportamento hidrofóbico, migrando para o interior da fase apolar. Tal comportamento pode ser melhor compreendido pela análise do perfil de potencial para essa conformação. A otimização da geometria com o centro de massa a diversas distâncias da superfície de descontinuidade mostra uma curva que decresce de maneira quase contínua quando se vai do meio polar para o apolar (Figura-6.1c). O mesmo não acontece com as

estruturas parcialmente em hélice- α , para as quais o perfil de potencial apresenta um mínimo de energia pronunciado o bastante para estabilizar a molécula na interface.

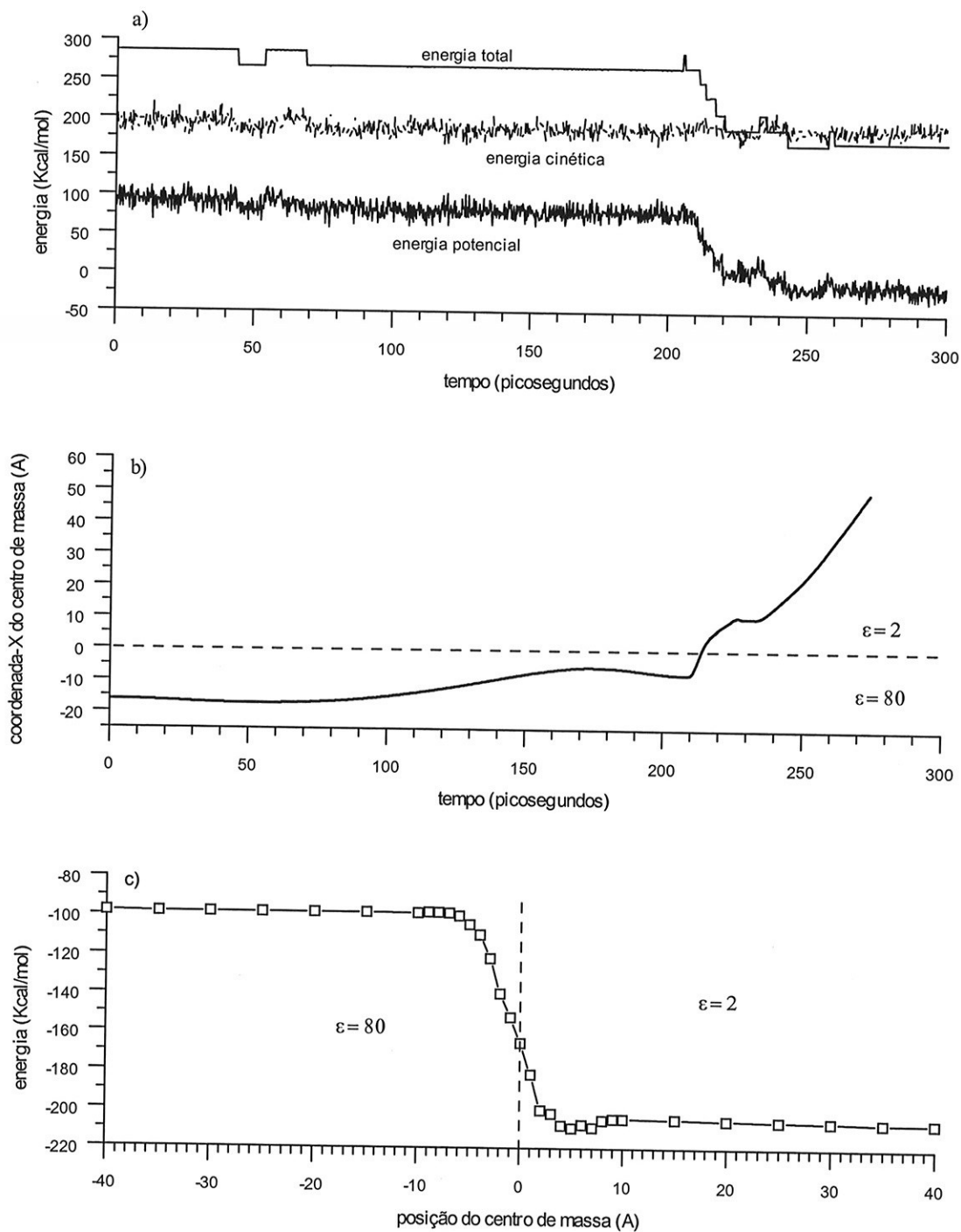


Figura-6.1 (a) Variação das energias cinética, potencial e total; (b) trajetória do centro de massa; e (c) perfil de potencial para a sequência sinal do receptor- λ , em conformação aleatória, atravessando a interface água-membrana.

conformação inicial restringida parcialmente em hélice- α

A conformação em hélice- α foi imposta entre os resíduos Leu8 e Met24 confinando os ângulos torcionais ϕ e ψ em poços de potenciais com o mínimo nas posições de equilíbrio para esta conformação. O ângulo torcional ω , entre os átomos C e N no esqueleto peptídico, não necessita restrições pois se inicialmente em conformação "trans", assim o diedro correspondente permanecerá durante a dinâmica. À temperatura ambiente a probabilidade para sua passagem para a conformação "cis" é muito baixa devido à barreira de 16 kcal/mol que ele deverá transpor e às colisões entre as cadeias laterais, que são mais frequentes quando ω está em "cis".

Um comportamento anfífilo foi agora observado para a sequência sinal em estudo. As trajetórias dos centros de massa na Figura-6.2a para ambas estruturas químicas, a zwitteriônica e a de terminais neutros, são determinadas pelos respectivos perfis de potencial apresentados nas Figuras 6.2b e 6.2c. Cada estrutura teve a dinâmica iniciada em cada um dos dois meios. As trajetórias para a forma zwitteriônica, com inícios em meios diferentes não convergiram devido às posições iniciais do centro de massa e à barreira de potencial de cerca de 14 kcal/mol situada em torno da posição -10 ângstrons no meio aquoso (Figura-6.2b). A convergência dar-se-ia para o poço de potencial que surge no meio apolar de dimensões aproximadas a 15 ângstrons de largura por 20 kcal/mol de profundidade e centrado próximo a $X = 8$ ângstrons (Figura-6.2b). Este poço pode capturar o peptídeo na forma zwitteriônica e levar à sua estabilização nessa região próxima à interface, como a trajetória para esse peptídeo no meio de $\epsilon = 2$ indica (Figura-6.2a, linha ponto-tracejada). A imagem dessa estrutura estabilizada na interface, obtida a partir das coordenadas no instante $t = 200$ ps, é mostrada na Figura-6.3a. Para comparação, na Figura-6.3b é apresentada a imagem do peptídeo no final da dinâmica ($t = 300$ ps), após o relaxamento da restrição para manter a hélice.

Uma análise semelhante pode ser feita para o peptídeo não-zwitteriônico comparando-se suas trajetórias na Figura-6.2a (linhas contínuas) com o perfil de potencial na Figura-6.2c. Nesse caso as trajetórias iniciadas nas fases polar e apolar convergem pois não há uma barreira de potencial como para a conformação em hélice no peptídeo zwitteriônico. A convergência ocorre para o poço de potencial com cerca de 30 kcal/mol de profundidade, o qual leva à estabilização da molécula com o centro de massa a aproximadamente 5 ângstrons da superfície de descontinuidade, no meio apolar (Figura-6.2c). A imagem para esta estrutura, obtida em $t = 100$ ps, é mostrada

na Figura-6.3c (e no final da dinâmica, após o relaxamento da hélice na Figura-6.3d). Para ambas estruturas com hélice restrita os resíduos aminoácidos carregados e o terminal-N tendem a permanecer mais próximos da superfície de descontinuidade dielétrica, enquanto que a região terminal-C tende a mergulhar para o interior da membrana (Figuras 6.3a e 6.3c), concordando com um modelo para a conformação desta sequência sinal proposto na literatura (Jones & Gierasch, 1994).

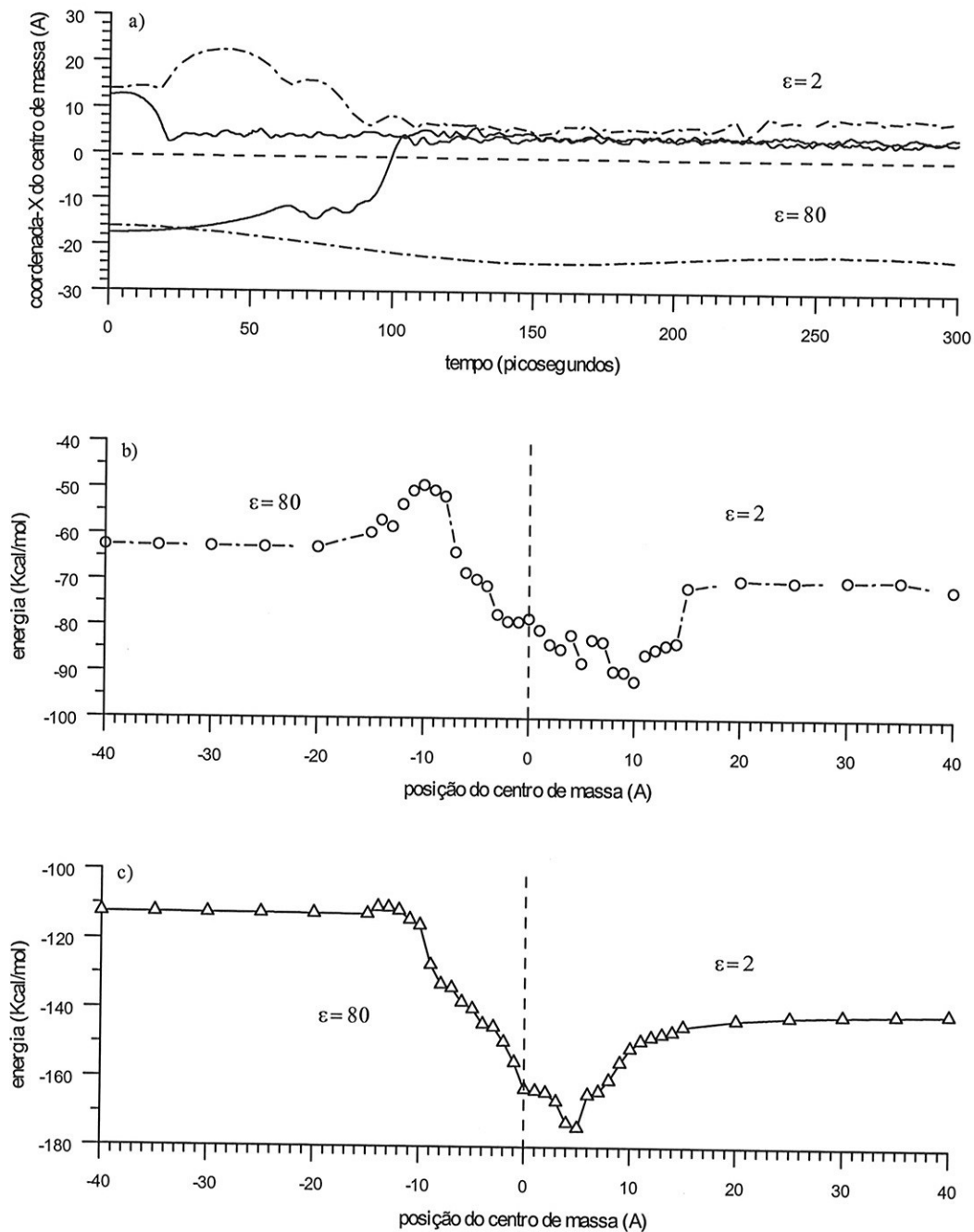


Figura-6.2 (a) Trajetórias do centro de massa da seqüência sinal do receptor- λ da *E. Coli*, na forma zwitteriônica (linha ponto-tracejada) e com os terminais neutralizados (linha contínua) e respectivos perfis de potencial (b) e (c) para a estrutura em conformação parcial hélice- α , na presença da interface água-membrana.

estabilidade das hélices- α na ausência de restrições

Transcorrido algum tempo após estabilizada a posição da molécula com relação à interface água-membrana as restrições ao movimento para os ângulos diedrais, que mantinham a conformação helicoidal, foram retiradas e a estabilidade das hélices- α foi monitorada. Para a forma com terminais neutros a suspensão das restrições se deu em $t = 100$ ps e para a forma zwitteriônica em $t = 200$ ps. A análise conformacional é feita a partir do gráfico ϕ versus ψ . Uma distribuição dos resíduos para a região em hélice do peptídeo é mostrada nas Figuras 6.4a a 6.4d, onde foram tomadas as médias sobre os valores de cada ângulo diedral num intervalo de 50 ps. O diagrama de Ramachandran (Voet & Voet, 1990) foi sobreposto às Figuras 6.4b, 6.4c e 6.4d para possibilitar comparações com as regiões permitidas para as estruturas secundárias.

A conformação restringida em hélice- α para a forma zwitteriônica do peptídeo é mostrada na Figura-6.4a, onde foram tomadas as posições médias dos ângulos diedrais envolvidos na hélice entre os instantes $t = 150$ e 200 ps. A evolução dessa estrutura no intervalo entre $t = 250$ e 300 ps, quando as restrições já haviam sido removidas, é mostrada na Figura-6.4b. Para a forma não-zwitteriônica foram tomadas médias dos ângulos diedrais em dois intervalos após serem retiradas as restrições, entre $t = 150$ e 200 ps (Figura-6.4c) e entre $t = 250$ e 300 ps (Figura-6.4d).

Alguns resíduos saem da posição na hélice- α , tendendo à dobra- β na região da prolina-9 a qual não assume estrutura secundária definida devido a sua cadeia lateral pirrolidínica cíclica que costumeiramente interrompe a propagação de conformações em hélice- α (Voet & Voet, 1990). Por ter somente dois átomos de hidrogênio no lugar da cadeia lateral, a glicina tem liberdade para se posicionar em qualquer quadrante do gráfico ϕ versus ψ , desestabilizando estruturas secundárias. Na presente simulação a Gly17 tende a sair das hélices no sentido dos valores mais negativos dos diedros. Porém, a hélice nas duas formas da molécula não se dissolve totalmente. Uma considerável parte dos ângulos diedrais mantêm a posição inicial, permanecendo dentro da região permitida para hélices- α (Figuras 6.4b, 6.4c e 6.4d).

As imagens das conformações finais para ambas estruturas zwitteriônica e de terminais neutros (em $t = 300$ ps), são mostradas na Figura-6.3b e 6.3d respectivamente. Como observado nos diagramas de Ramachandran anteriores, a hélice- α tende a se manter da metade para o terminal-C nas duas estruturas. A molécula dobra-se ao meio, na região da Val12. Na forma com terminais carregados

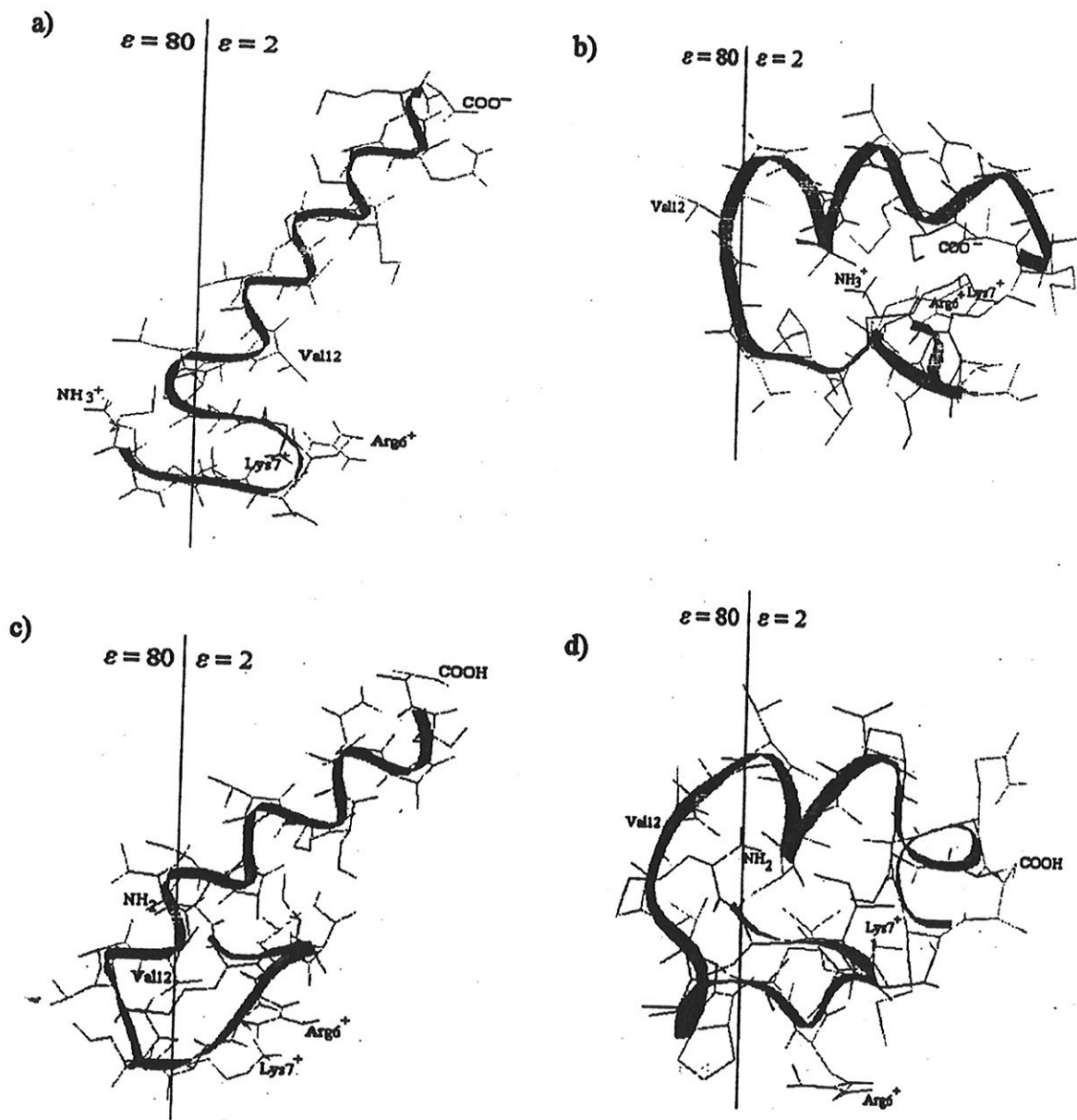


Figura-6.3 Conformações para a seqüência sinal para o receptor- λ na forma zwitteriônica:
 (a) em conformação parcial hélice- α restringida (coordenadas geradas em $t = 200$ ps) e
 (b) após a remoção das restrições para a hélice (coordenadas geradas em $t = 300$ ps);
 e com os terminais neutralizados:
 (c) em conformação parcial hélice- α restringida (coordenadas geradas em $t = 100$ ps) e
 (d) após a remoção das restrições para a hélice (coordenadas geradas em $t = 300$ ps)

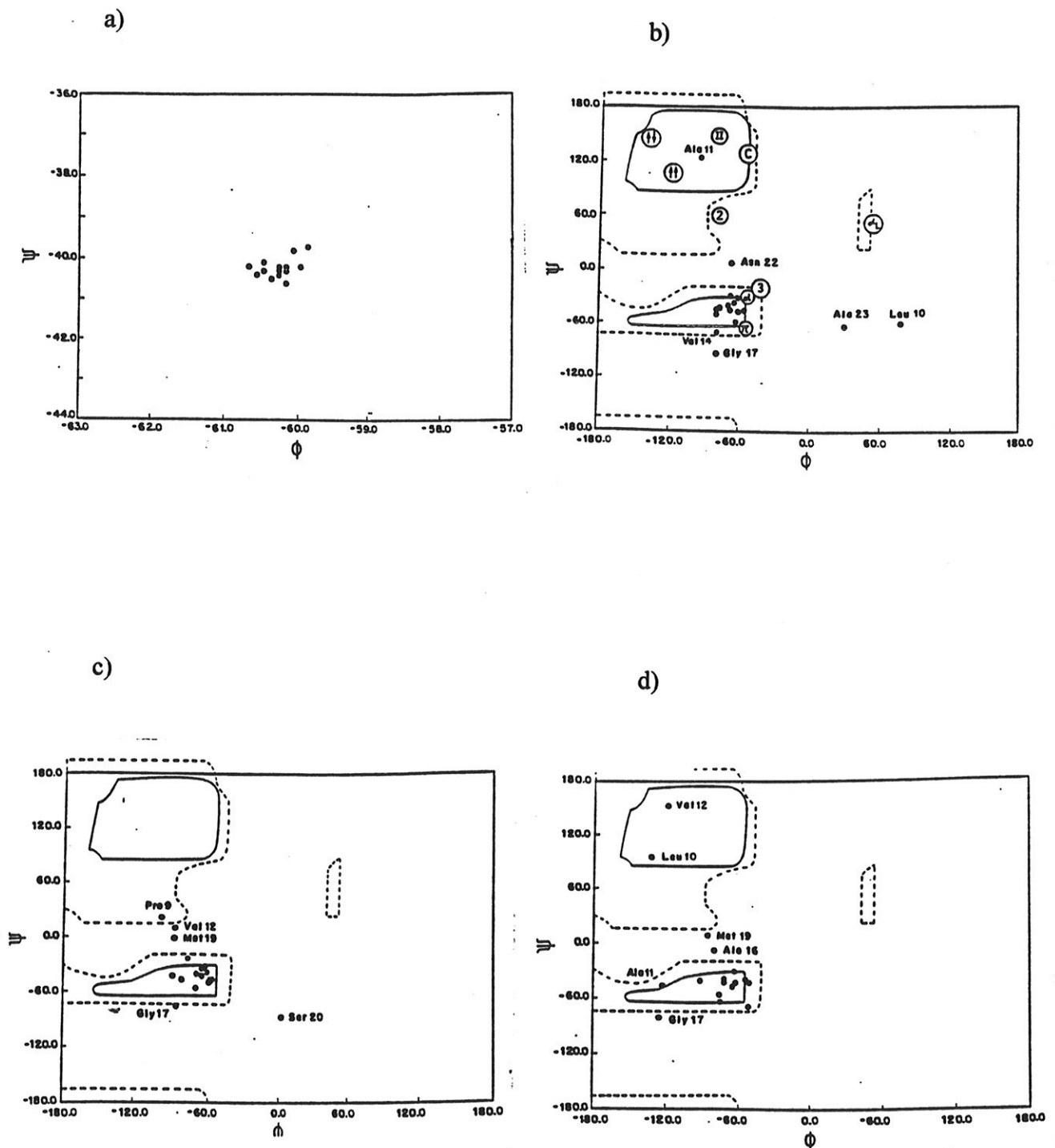


Figura-6.4 Conformação média para intervalos de 50 ps, da região em hélice do esqueleto peptídico na seqüência sinal: (a) na forma zwitteriônica com o uso de restrições e (b) após removidas as restrições para a hélice, entre $t = 250$ e 300 ps; e com os terminais neutralizados, para dois intervalos sem o uso de restrições, (c) entre $t = 150$ e 200 ps e (d) entre $t = 250$ e 300 ps. São sobrepostos o diagrama de Ramachandran (em b, c e d) com as regiões estericamente permitidas na poli-L-alanina para comparação. As estruturas secundárias definidas (b) segundo Voet & Voet (1990), são marcadas por um círculo e o respectivo símbolo.

aparece uma ponte salina entre o grupo terminal COO^- , e os resíduos Arg^+ e Lys^+ (Figura-6.3b), enquanto que na de terminais neutros esses resíduos separam-se sob a ação da repulsão eletrostática (Figura-6.3d).

estabilidade conformacional em dinâmica de longa duração

As coordenadas e as velocidades no final da dinâmica referente à Figura-6.3b, para a forma zwitteriônica, foram armazenadas possibilitando a retomada daquela simulação. A continuidade daquela dinâmica é apresentada na Figura 6.5a e 6.5b, onde a evolução de cada par diedral ϕ e ψ , do resíduo aminoácido Leu8 a Met24, foi monitorada durante 4 nanosegundos.

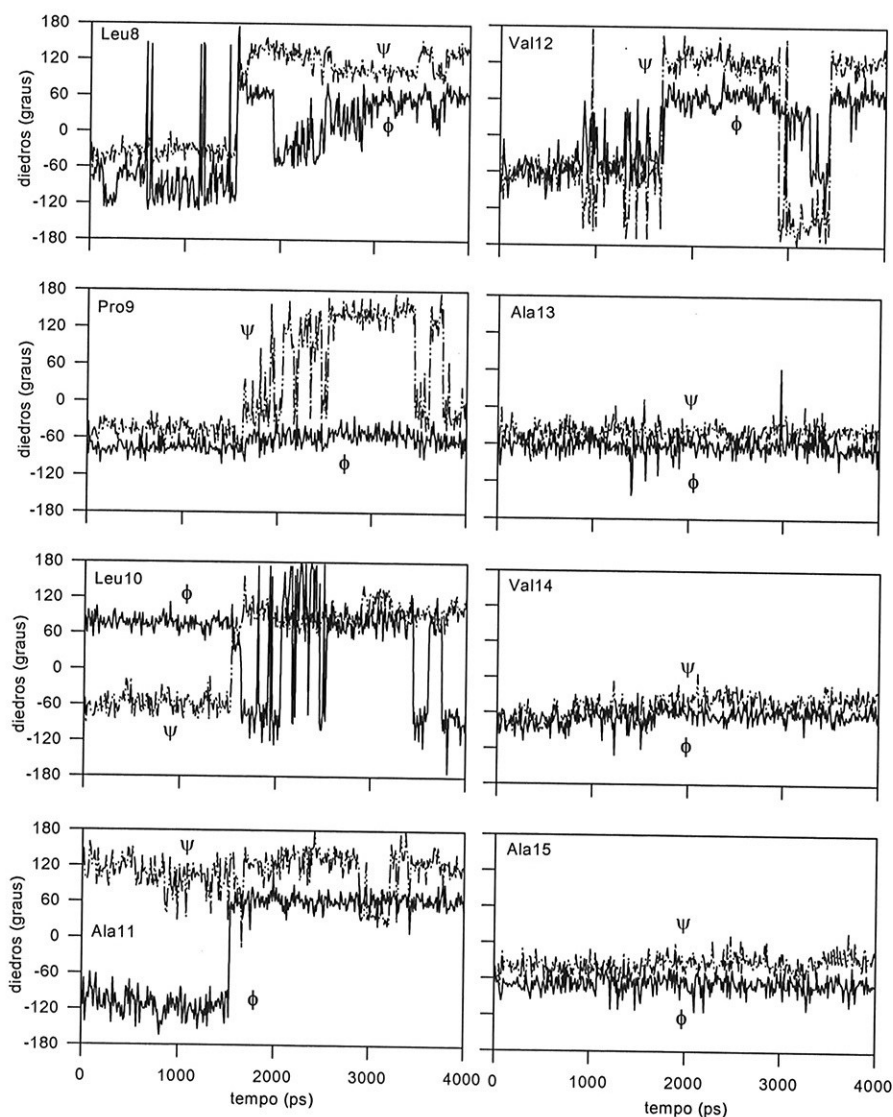


Figura-6.5a Extensão da dinâmica para o peptídeo na forma zwitteriônica, estabilizado em conformação hélice- α parcial, sobre a interface água-membrana. É registrada a evolução temporal dos ângulos ϕ e ψ do resíduo Leu8 a Ala15.

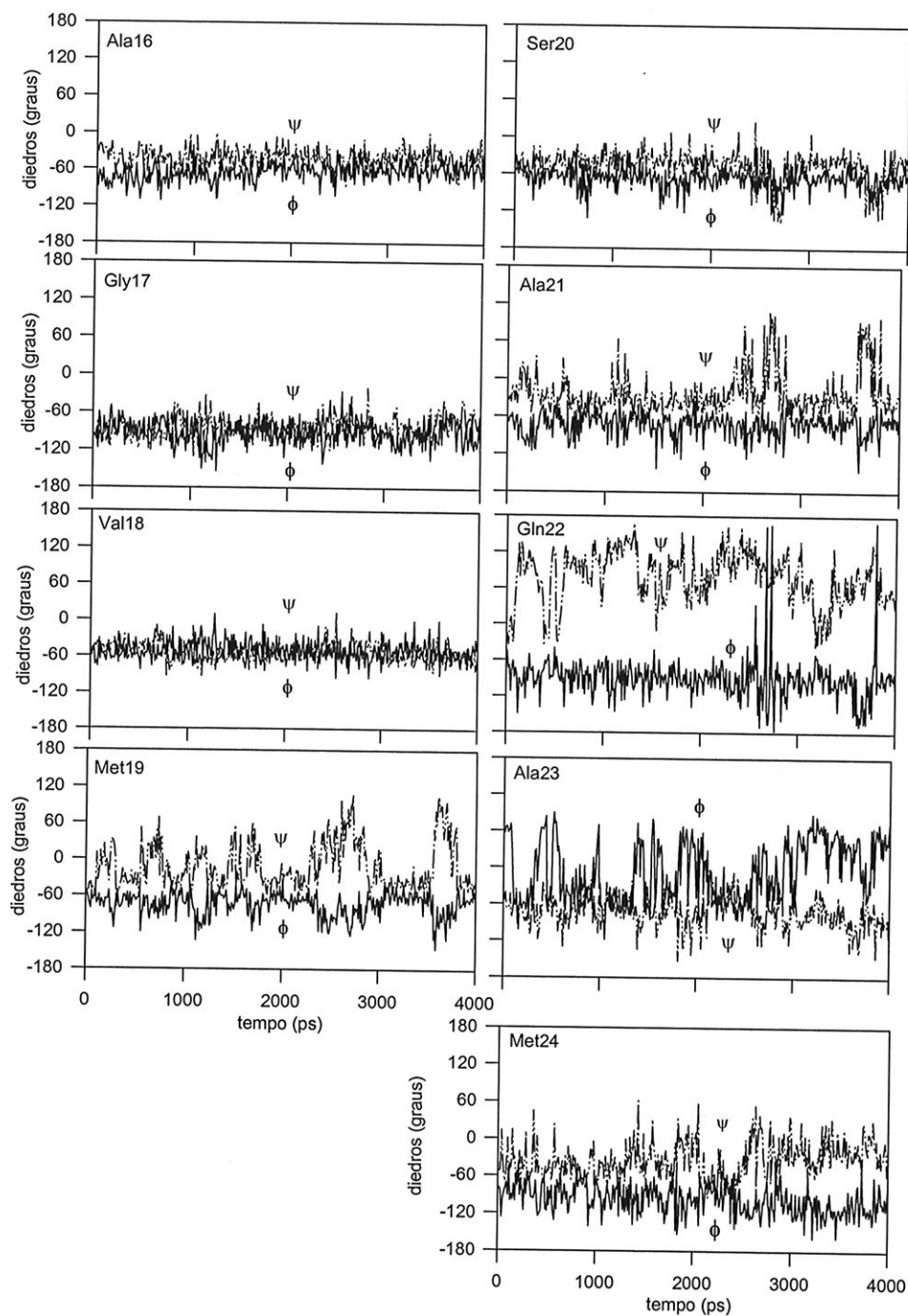
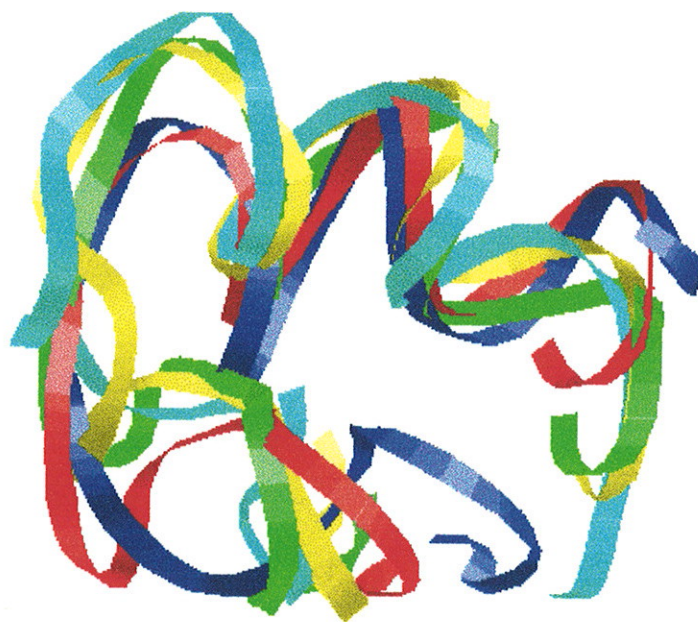


Figura-6.5b Continuação da Figura-6.5a, com o registro da evolução temporal dos ângulos ϕ e ψ do resíduo Ala16 a Met24.

A região compreendida pelos resíduos Leu10, Ala11 e Val12 é exposta ao solvente polar e é onde a molécula se dobra, como pode se observar na Figura-6.3b. Na presente dinâmica é confirmada a instabilidade conformacional para essa região, e também para a dos vizinhos Leu8 e Pro9. Para esses 5 resíduos ocorrem interconversões entre estruturas secundárias meta-estáveis, permanecendo, na maioria das vezes, nessas conformações por intervalos acima de 1 nanosegundo (Figura-6.5a).

a)



b)

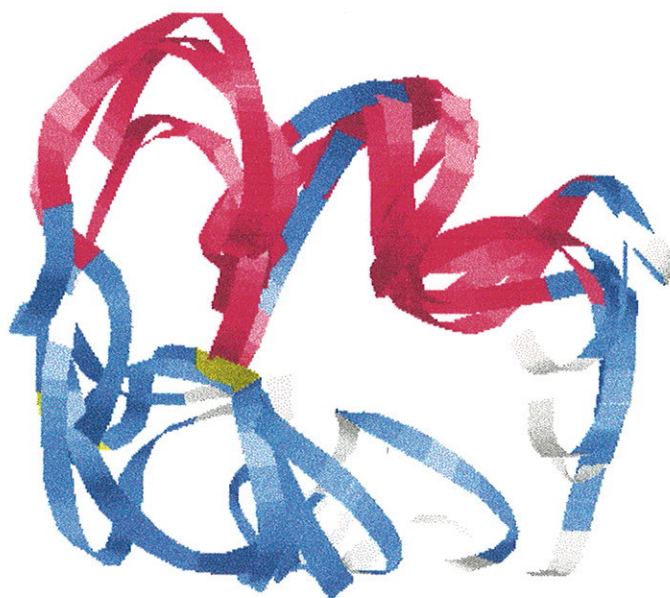


Figura-6.6 Imagens sobrepostas representando a dinâmica do esqueleto peptídico da seqüência sinal para o receptor- λ , tomadas em intervalos de 1 nanosegundo. Na figura superior (a) as cores estão associadas a instantes de tempo: em azul, $t = 0$; azul claro, $t = 1$; verde, $t = 2$; amarelo, $t = 3$; e vermelho, $t = 4$ nanosegundos. Na figura inferior (b) as cores estão associadas a estruturas: magenta, hélices- α ; azul, *turns*; e amarelo, folhas- β .

As mudanças conformacionais ocorrem em um curto intervalo de tempo e é um fenômeno cooperativo. Próximo ao instante $t = 1500$ ps quase todos os 5 resíduos mudaram sua conformação.

Como pode-se observar no diagrama de Ramachandran (Figuras 6.4b-6.4d), ϕ e ψ podem oscilar em torno de -60 graus em uma conformação hélice- α . Com exceção do resíduo Gln22, que permaneceu na posição dobra- β a maior parte do tempo, o restante da cadeia (Ala13 a Met24) se estabilizou em hélice- α como é mostrado na Figura-6.5. Os resíduos Met19, Ala21, Ala23 e Met24 apresentaram maior flexibilidade nos diedros ϕ e ψ enquanto que o segmento entre Ala13 e Val18 mostrou-se uma hélice bastante rígida. Apesar da flexibilidade atribuída a Gly17 a mesma permaneceu nas vizinhanças da posição hélice- α o tempo todo.

As imagens tomadas a cada nanosegundo são apresentadas sobrepostas na Figura-6.6a, onde a fita azul refere-se ao esqueleto peptídico no início desta simulação (que é o mesmo da Figura-6.3b), enquanto que a fita vermelha refere-se à conformação em $t = 4$ nanosegundos. As 3 cores intermediárias, passando pelo verde, referem-se aos instantes $t = 1, 2$ e 3 nanosegundos. A Figura-6.6b foi gerada com as mesmas coordenadas, porém as cores nesse caso destacam as estruturas secundárias: *turns* em azul, dobras- β em amarelo e hélices- α em vermelho.

O conjunto desses resultados são compatíveis com uma situação em que a seqüência sinal em uma conformação aleatória no solvente aquoso, teria acesso ao meio hidrofóbico do interior da membrana, onde estabilizaria em uma conformação anfifílica, com uma região em hélice- α mergulhada no meio hidrofóbico.

7 Dinâmica Molecular do α -MSH em Presença de Membrana.

Melanotropinas são hormônios peptídeos envolvidos em vários processos fisiológicos e neurológicos, sendo conhecidos pela sua capacidade em estimular células pigmentares. O interesse em seu estudo vem crescendo devido aos seus efeitos sobre os sistemas nervoso e imune e à possibilidade de suas aplicações clínicas no tratamento de distúrbios pigmentares e do câncer melanoma. A α -Melanotropina, α -MSH (hormônio estimulador de melanócito; Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂), foi um dos primeiros hormônios peptídicos a ser extraído da glândula pituitária e a ter sua seqüência de aminoácidos determinada. O grupo acetil, ligado ao terminal-N do peptídeo durante a biossíntese, é importante para potencializar a ação do hormônio na pigmentação (Hruby et al., 1993). O α -MSH deriva de uma proteína precursora, a proopiomelanocortina (POMC), que é clivada por enzimas proteolíticas gerando famílias de peptídeos, incluindo adrenocorticotropinas, melanotropinas e endorfinas. Além da pituitária, a POMC é expressada em quantidades limitadas no hipotálamo, no sistema imune e em outros tecidos. Seu processamento ocorre de maneira específica em cada um desses tecidos, dependendo da “maquinaria” enzimática disponível em cada tipo de célula. Assim, enquanto o α -MSH produzido na pituitária é acetilado, o produzido no hipotálamo não o é, em concordância com a diversidade de funções biológicas atribuída ao peptídeo (Cone et al., 1993). Descoberto como um hormônio que afeta a pigmentação em tecidos periféricos, especialmente a pele, há crescentes evidências de que o α -MSH atua como neurotransmissor e/ou neuromodulador em processos como aprendizado, memória, atenção e motivação (Jegou et al., 1993).

Estudos relacionando estrutura química e atividade biológica têm encontrado análogos agonistas, superpotentes e de atividade prolongada pela resistência à degradação enzimática (Sawyer et al., 1980; Hruby et al., 1983; Al-Obeidi et al., 1989a e 1989b), bem como antagonistas para α -MSH (Jayawickreme et al., 1994; Hruby et al., 1995). Uma das principais descobertas nos primeiros estudos nessa linha foi o fato de o tetrapeptídeo central His-Phe-Arg-Trp ser suficiente para o estímulo de melanócitos na pigmentação, ficando o restante dos resíduos com o papel de modular a potência do hormônio (Hruby et al., 1984). A exploração da região central do α -MSH levou ao desenvolvimento do agonista [Nle⁴,D-Phe⁷] α -MSH, no qual a metionina na posição 4

é substituída pela norleucina e a fenilalanina levógira na posição 7 é substituída pela fenilalanina destrógira (Sawyer et al., 1980). Esse peptídeo é um dos análogos mais potentes conhecidos, além de ter efeito biológico prolongado, tanto sobre a pigmentação de pele como sobre a atividade de enzimas em melanoma (potência 22:1 em pele de rã, 2:1 em pele de lagarto e 100:1 na ativação da tirosinase de melanoma em relação ao α -MSH; Hruby et al., 1993). Atribui-se essas características à conformação em volta- β reversa (β -turn), que poderia ser estabilizada pela D-Phe7 e por uma ponte salina entre o resíduo carregado negativamente Glu5 e um dos carregados positivamente, Arg8 ou Lys11 (Sugg et al., 1988; Al-Obeidi et al., 1989c; Hruby et al., 1988; Hruby et al., 1993).

Vários análogos cíclicos foram usados para verificar a importância da possível estabilização de uma dobra- β na região central do peptídeo, resultando geralmente em agonistas mais potentes e de ação prolongada. A ciclização por ponte dissulfídrica produziu o agonista [Cys⁴Cys¹⁰] α -MSH superpotente em alguns ensaios de pigmentação de pele, enquanto alguns lactam cíclicos como Ac-[Nle⁴,Asp⁵,D-Phe⁷,Lys¹⁰] α -MSH₄₋₁₀-NH₂ (potência 0,5:1 em pele de rã, 90:1 em pele de lagarto e 100:1 na ativação da tirosinase em melanoma em relação ao α -MSH; Hruby et al., 1993), são superpotentes também para a atividade da tirosinase em melanoma. Fatores estruturais para cadeias laterais têm sido também propostos, para a região central do α -MSH, a partir de estudos por NMR (Sugg et al., 1986 e 1988). Sugeriu-se que a atividade melanotrópica seria somente observada no análogo em que os grupos imidazol, fenil e indol (dos resíduos His, Phe e Trp) estivessem próximos no espaço, localizados em uma mesma superfície do peptídeo, enquanto a cadeia lateral da arginina estivesse em outra superfície (Sugg et al., 1988; Hruby et al., 1993).

Foram clonados recentemente uma série de receptores para o α -MSH em membranas, os quais foram identificados como pertencentes à superfamília de receptores acoplados a proteína-G, cujas estruturas consistem normalmente em sete hélices transmembranares acopladas por alças extra e intracelulares (Mountjoy et al., 1992; Chhajlani & Wikberg, 1992; Grantz et al., 1994). Ao mesmo tempo, tem-se estabelecido a afinidade do α -MSH e alguns agonistas por membranas lipídicas carregadas negativamente, através de espectroscopias de fluorescência (Ito et al., 1993; Macêdo et al., 1996), EPR (ressonância paramagnética eletrônica) e NMR (Biaggi et al., 1996). Sugeriu-se que a passagem do α -MSH para fases lipídicas leva à estabilização de uma dobra- β

no centro do peptídeo (Ito et al., 1993). Com esses trabalhos tem-se observado ainda que quanto maior é a penetração na membrana maior é a potência biológica atribuída ao análogo ($[\text{Nle}^4, \text{D-Phe}^7]\alpha\text{-MSH}$ e $\text{Ac-}[\text{Nle}^4, \text{Asp}^5, \text{D-Phe}^7, \text{Lys}^{10}]\alpha\text{-MSH}_{4-10}\text{-NH}_2$), sugerindo uma correlação entre o grau de penetração na membrana e a atividade biológica do peptídeo. A partir dessa correlação é possível supor a existência de sítios importantes em receptores, para a interação com esses ligantes, situados próximo a região central da membrana. Porém, alguns resíduos aminoácidos importantes para a interação receptor-ligante foram identificados nas alças extracelulares do receptor do $\alpha\text{-MSH}$, melanocortina-1, em células de melanoma humano (Chhajlani et al., 1996).

No presente trabalho pretende-se simular o possível papel da membrana, ou das interfaces entre a membrana e o solvente polar, na estabilização de conformações para o $\alpha\text{-MSH}$ que atendam os requisitos para o desempenho de sua função biológica, levantados através de seus análogos. O meio de baixa constante dielétrica intramembranar, aliado às variações no potencial eletrostático nas interfaces limitariam o número de conformações acessíveis ao peptídeo, sendo portanto um candidato a promover sua estabilização conformacional, o que poderia favorecer a sua interação com o receptor e a ativação do mesmo.

7.1 Métodos

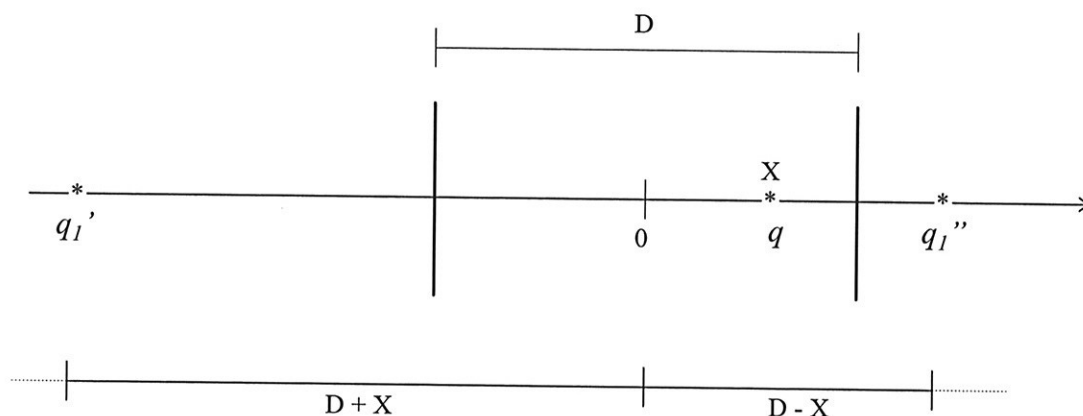
Em simulações preliminares do $\alpha\text{-MSH}$ em várias conformações na presença da interface água-membrana, observou-se que o mesmo não é estável na interface, migrando sempre para o que seria o interior hidrofóbico da biomembrana. A fim de estudar sua estabilização conformacional no interior da membrana, além das mudanças conformacionais induzidas pela passagem do peptídeo pela interface, estabeleceu-se uma segunda interface para simular uma membrana com espessura finita. São consideradas portanto, duas superfícies de descontinuidade dielétrica separadas entre si por uma distância de 30 ângstrons, valor geralmente estimado para o “caroço” hidrofóbico de biomembranas, tendo o meio interior $\epsilon = 2$ e os externos $\epsilon = 80$. A solução para o problema da dupla interface foi a mais simples encontrada, algébrica e numericamente. O método das “imagens eletrostáticas” foi empregado considerando somente a carga-imagem mais próxima a cada superfície de descontinuidade, desprezando-se as imagens das imagens quando cargas estão entre as duas superfícies. Nessa situação cada interface foi tratada independentemente,

utilizando-se as equações desenvolvidas no Capítulo-2, sendo somadas as contribuições de cada interface para compor o potencial. Para as cargas fora da região entre as interfaces foram consideradas somente as imagens causadas pela interface mais próxima, aplicando-se diretamente as equações para a interface água-membrana desenvolvidas no Capítulo-2.

Tomando-se como referência o ponto central entre duas superfícies de descontinuidade dielétrica separadas por uma distância D , as $2N$ cargas-imagem (q_n' e q_n'') de uma carga na posição X entre as superfícies posicionam-se, com respeito à origem, às distâncias:

$$N'D + X \quad \text{e} \quad N''D - X$$

com N' e N'' variando de 1 a infinito.



Com base nos resultados para cargas-teste do Capítulo-2, Figuras 2.3 e 2.4, assumiu-se que a distância de separação de 30 ângstrons torna significativo somente o efeito das primeiras cargas-imagem (q_1' e q_1''). Em $\epsilon = 2$, onde o efeito da interface tratada pelo “método das imagens” é maior, a energia potencial aproxima-se da obtida sem o emprego do método a 30 ângstrons de distância da superfície de descontinuidade (Figuras 2.3 e 2.4). Como o α -MSH é um peptídeo de dimensões inferiores a 30 ângstrons, tomar somente as primeiras imagens pode ser comparado a introduzir um raio de corte de 30 ângstrons para os potenciais de cargas-imagem no espaço entre as interfaces. Continuando nessa linha de aproximações, para as cargas fora da região entre as superfícies de descontinuidade, ao tomar somente as imagens causadas pela presença da superfície mais próxima despreza-se a contribuição das

imagens causadas pela segunda superfície, as quais estariam além de 30 ângstrons de distância.

Para obter uma conformação inicial para a dinâmica do α -MSH utilizou-se o programa Prelude desenvolvido por Rooman (1991). Nesse método a conformação do esqueleto peptídico é descrita como uma combinação de 7 estados estruturais, baseados no diagrama de Ramachandran e em um campo médio, derivado do tratamento estatístico de um banco de dados de proteínas com estruturas conhecidas. É considerada, no método, a estatística de estados conformacionais de resíduos aminoácidos individuais e de dipeptídeos. As probabilidades para um dado resíduo adotar os 7 estados conformacionais discretos são então convertidas em potenciais de campo médio (Sippl, 1990; Rooman et al., 1991). Uma componente de campo de força, devido à interações locais, é assim obtida e usada para prever conformações de baixas energias em uma dada seqüência de aminoácidos, considerando as influências de cada resíduo ao longo da cadeia. Os valores angulares para os diedros ϕ e ψ , do esqueleto peptídico, definidos para os 7 estados conformacionais A, C, B, P, G, E e O no programa Prelude encontram-se na Tabela-7.1, juntamente com os valores para as respectivas conformações em coordenadas internas no programa Thor. O sétimo estado, o estado O, é definido para conformações em que o ângulo diedral ω do esqueleto é igual a zero.

Tabela-7.1 Ângulos diedrais ϕ e ψ definidos para estados conformacionais no programa Prelude e coordenadas internas de torção definidas no programa Thor para os mesmos ângulos.

estados conformacionais			coordenadas internas de torção para os átomos do esqueleto peptídico (graus)					
	ϕ (graus)	ψ (graus)	C_α	C_β	C	O	N	H
A	-65	-40	180	175	295	140	320	0
C	-89	-1	180	151	271	179	359	0
B	-117	142	180	123	243	322	142	0
P	-69	140	180	171	291	320	140	0
G	78	20	180	318	78	200	20	0
E	103	-176	180	343	103	4	184	0
O	-82	133	0	158	278	313	133	180

O método de Rooman fornece somente conformações para o esqueleto peptídico. Para obter as posições das cadeias laterais do α -MSH, fixou-se o esqueleto na conformação proposta com um potencial harmônico extra (como no capítulo

anterior), deixando as cadeias laterais em conformação aleatória. Aplicou-se então o *annealing*, aquecendo a molécula gradualmente, em 30 ps, até 900 K e resfriando-a lentamente em seguida, em 150 ps, com a constante dielétrica $\epsilon = 80$. A estrutura foi reotimizada e velocidades foram atribuídas a cada átomo para simular a temperatura 10 K, a qual foi elevada a 300 K em 150 picosegundos, ajustando-se a temperatura de referência T_0 . Após mais 250 picosegundos de dinâmica a 300 K retirou-se as restrições que mantinham o esqueleto peptídico na conformação proposta pelo método de Rooman. Em seguida rodou-se mais 100 picosegundos de dinâmica para equilíbrio do conjunto, totalizando a simulação de 500 picosegundos nessa fase inicial, passando à fase de coleta de dados.

Tomando-se o peptídeo com a conformação equilibrada, aplicou-se 10 nanosegundos de dinâmica em $\epsilon = 80$. Em seguida o peptídeo foi submetido à presença da membrana modelo, representada pelas duas interfaces de descontinuidade dielétrica por mais 7,4 nanosegundos de dinâmica. O arquivo contendo as coordenadas no final dos 10 primeiros nanosegundos em $\epsilon = 80$ foi utilizado para traçar o perfil de potencial atravessando a membrana, ao qual essa conformação seria submetida. Durante os 17,4 nanosegundos de duração total da dinâmica foram registradas as variações nas energias e nos ângulos diedrais ϕ e ψ do esqueleto peptídico e χ_1 e χ_2 da cadeia lateral do triptofano, bem como a trajetória do centro de massa da macromolécula. Diversas imagens foram geradas com as coordenadas obtidas em vários instantes da dinâmica para a visualização das mudanças conformacionais. Outra dinâmica de 6 nanosegundos foi efetuada para comparação, iniciando com o peptídeo já no interior da membrana, na conformação após o *annealing*.

7.2 Resultados e discussão

obtenção de uma estrutura inicial para a dinâmica

O método de Rooman usa o critério de energia para selecionar e ordenar um número arbitrário de conformações de baixa energia, descritas por uma combinação linear de estados estruturais de resíduos aminoácidos individuais. Nesse método a energia está relacionada com probabilidades estatísticas de ocorrências conformacionais no banco de dados e vem dada em unidades arbitrárias. Para

Tabela-7.2 Conformações de baixa energia para o α -MSH propostas pelo método de Rooman (1991)

Seqüência de aminoácidos (na representação de uma letra):
SYSMEHFRWGKPV

Conformações*:		energia (unidades arbitrárias)
1	CBAAACACCGPP	-1.87
2	CBAAACABCGPP	-1.86
3	CBAAACGCCGPP	-1.82
4	CBAAACGBCGPP	-1.80
5	CBAACCACCGPP	-1.79
6	CBAAACAACGPP	-1.78
7	CBAACCABCGPP	-1.78
8	CBAAACACCEPP	-1.74
9	CBAACCGCCGPP	-1.74
10	CBAAACABCEPP	-1.73
11	CBAAACGACGPP	-1.72
12	CBAACCGBCGPP	-1.72
13	CBAAACBBCGPP	-1.70
14	CBBAACACCGPP	-1.70
15	BBAAACACCGPP	-1.69
16	CBAAACGCCEPP	-1.69
17	CBBAACABCGPP	-1.68
18	BBAAACABCGPP	-1.68
19	CBAAACGBCEPP	-1.67
20	CBAACCACCEPP	-1.66
21	CBAAACAACEPP	-1.65
22	CBAACCABCEPP	-1.65
23	CBAACCGACGPP	-1.65
24	CBAAAAACCGPP	-1.65
25	CBBAACGCCGPP	-1.64
26	BBAAACGCCGPP	-1.64
27	CBAAACABCGBP	-1.63
28	CBAAAAABC GPP	-1.63
29	CBAAACBACGPP	-1.62
30	CBAACCBBCGPP	-1.62
31	BBAAACGBCGPP	-1.62
32	CBBAACCACCGPP	-1.62
33	BBAACCACCGPP	-1.61
34	CBAACCGCCEPP	-1.61
35	CBBAACAACGPP	-1.61
36	CBBAACCABCGPP	-1.60
36	BBAAACAACGPP	-1.60
38	BBAACCABCGPP	-1.60
39	CBAAACGACEPP	-1.60
40	CBAACCGBCEPP	-1.59
41	CBAAACGCCGBP	-1.59
42	CBAAAAGCCGPP	-1.59
43	CBAAACBCCEPP	-1.59
44	CBAAACGBCGBP	-1.58
45	PBAAACACCGPP	-1.58
46	CBAAACCCCGPP	-1.58
47	CBAAAAGBCGPP	-1.58
48	CBAAACBBCEPP	-1.57
49	CBAACCAACEPP	-1.57
50	CBAACCACCGBP	-1.57

(*valores angulares na Tabela-7.1)

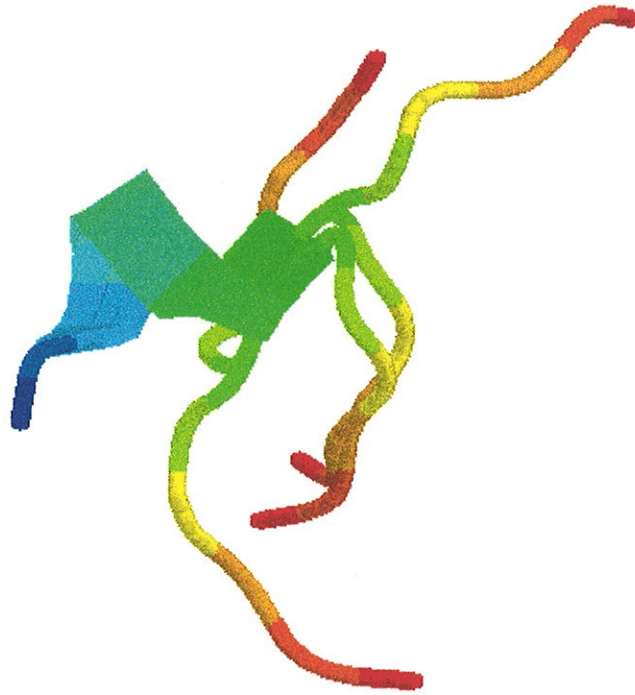


Figura-7.1 As cinco conformações de mais baixa energia, sobrepostas, para o esqueleto peptídico do α -MSH, propostas pelo método de Rooman (1991). (terminal-N em azul e terminal-C em vermelho; a parte em hélice é comum para às cinco estruturas).

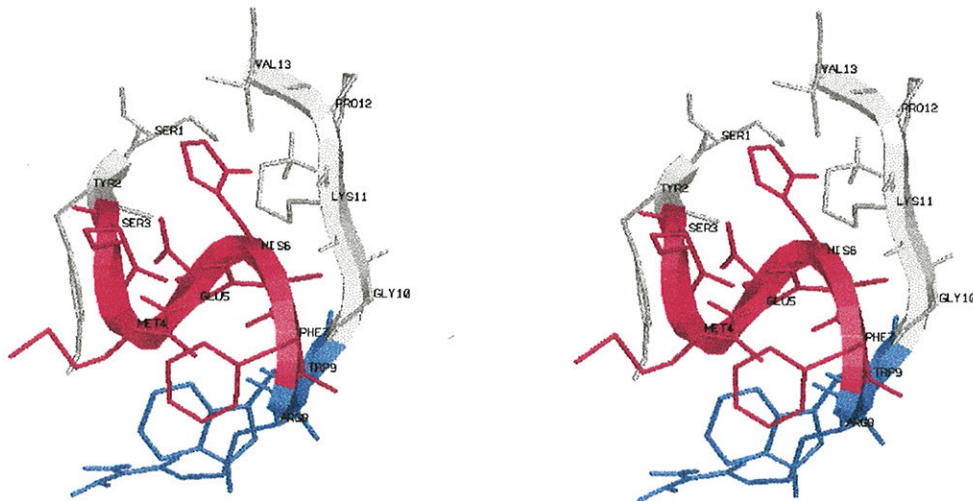


Figura-7.2 Estéreo-imagem para a conformação de mínima energia do α -MSH termalizada, proposta pelo método de Rooman (1991). (Focalizando no espaço atrás da página é possível a visualização da estrutura em três dimensões).

peptídeos que adotam uma conformação bem definida em solução aquosa é esperado um *gap* de energia entre a conformação de energia mínima e as outras conformações preditas. Para peptídeos flexíveis são obtidas várias conformações com valores de energias próximos (Rooman et al., 1991). Na Tabela-7.2 estão ordenadas as 50 conformações de mais baixa energia obtidas para o α -MSH. Não há previsões para a valina-13 por ela estar no terminal-C do peptídeo, que é fora de alcance para o método. Os valores de energia são próximos entre si, crescendo contínua e gradualmente, não sendo observado um *gap* de energia entre a primeira conformação e as demais ou entre qualquer conformação e as seguintes, sugerindo que o α -MSH seja um peptídeo flexível em meio aquoso. Há porém conformações para resíduos individuais que se repetem em toda, ou quase toda, a seqüência de 1 a 50 (Tabela-7.2). Esses resíduos são: tirosina-2 na posição B, região das folhas- β ; serina-3 e metionina-4 na posição A, região das hélices- α ; histidina-6 e triptofano-9 na posição C, região das hélices-3₁₀ que é de transição entre hélice- α e folha- β ; Lisina-11 e prolina-12 na posição P, região das hélices tipo poli-prolina ou região de conformações estendidas como a da posição B. A serina-1 é freqüente na posição C, porém é um resíduo da extremidade da cadeia, região geralmente mais flexível. O ácido glutâmico-5 é mais freqüente na posição A, aparecendo também na posição intermediária C. Os resíduos fenilalanina-7 e arginina-8 não apresentam conformações preferenciais, indicando estarem em uma região mais flexível da cadeia. Finalmente a glicina-10 prefere a posição G que corresponde a região das hélices- α para a esquerda, aparecendo também na posição E que, como a posição G, é visitada principalmente pela glicina pelo fato desse resíduo não possuir cadeia lateral.

aplicação da dinâmica em água

Na Figura-7.1 são apresentadas as imagens sobrepostas das 5 conformações de mais baixa energia para o esqueleto peptídico, correspondentes às 5 primeiras linhas da Tabela-7.2. A região em hélice, comum aos resíduos 3, 4, 5 e 6, é marcada por uma barra retangular. Nos resíduos 7 e 8 ocorre a ruptura da hélice e a partir daí as conformações não mais coincidem na representação, variando entre estruturas dobradas e estendidas. Os resíduos 11 e 12, como indicado na Tabela-7.2, conferem estiramento para a região terminal-C da cadeia. A conformação de mais baixa energia foi utilizada na simulação da dinâmica do α -MSH. Após dinâmica de equilíbrio de

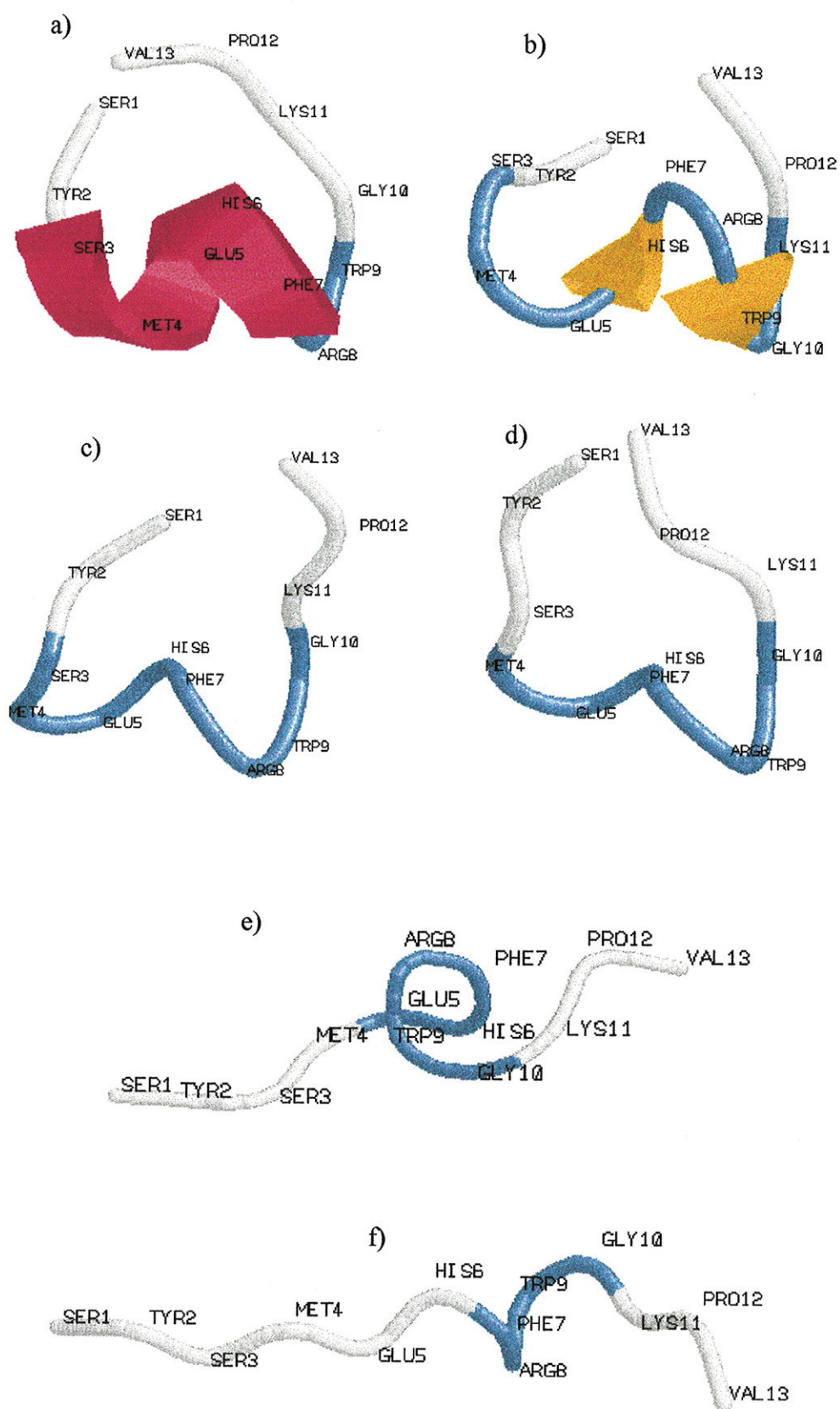


Figura-7.3 Conformações do esqueleto peptídico do α -MSH obtidas, em dinâmica molecular em solvente polar, a partir das coordenadas atômicas em intervalos de 2 nanossegundos:
a) $t = 0$, b) $t = 2$, c) $t = 4$, d) $t = 6$, e) $t = 8$ e f) $t = 10$ nanossegundos.

500 picosegundos em $\epsilon = 80$, essa conformação inicial evoluiu para a que aparece em estereo-imagem na Figura-7.2. A estrutura do esqueleto praticamente coincide com a proposta na primeira linha da Tabela-7.2. Os resíduos carregados positivamente Arg8 e Lys11 aparecem expostos ao que seria o solvente polar, em lados opostos da cadeia. O resíduo negativamente carregado Glu5 aparece também mais exposto, do mesmo lado que a Lys11 porém sem estabelecer ponte salina com a mesma. Os resíduos centrais não carregados His6, Phe7 e Trp9 aparecem menos expostos ao solvente. Essa distribuição de resíduos é compatível com o esperado para cadeias peptídicas em meio polar.

Em um estudo utilizando o “método das matrizes” para a procura de famílias conformacionais em peptídeos no espaço de configurações, Jacchieri (1995) obteve três conformações de baixa energia para o α -MSH, uma para cada rotâmero do Trp associado à torções do diedro χ_1 . As conformações do esqueleto com os rotâmeros *gauche*⁻ e *gauche*⁺ do Trp apresentaram uma volta de hélice na região dos resíduos 3 a 7, a mesma região em hélice na Tabela-7.2 e Figura-7.2. Pelos fatores estruturais presentes nessas conformações, propôs-se que o peptídeo as assumiria quando estivesse em solução aquosa (Jacchieri & Ito, 1995).

A evolução da dinâmica por 10 nanosegundos, em $\epsilon = 80$ a 300 K, sugere porém que essa conformação para o α -MSH não é estável em solvente aquoso (Figura-7.3), como apontado pela variação contínua de energia na Tabela-7.2. Na Figura-7.3a é apresentada a conformação para o início da dinâmica de 10 nanosegundos, que é a mesma após a dinâmica inicial de 500 picosegundos para equilíbrio. As imagens para o esqueleto nas Figuras 7.3b-7.3f seguintes, foram obtidas a partir das coordenadas tomadas em intervalos de 2 nanosegundos (Figura-7.3b, $t = 2$ ns; 7.3c, $t = 4$ ns; 7.3d, $t = 6$ ns; 7.3e, $t = 8$ ns; 7.3f, $t = 10$ ns). A estrutura, que é mais empacotada inicialmente, evoluiu para uma forma estendida. A conformação em hélice desfez-se nos primeiros nanosegundos da simulação, dando lugar a um *loop* (Figura-7.3e) que foi reduzido e deslocado para os resíduos 7, 8, 9 e 10 (Figura-7.3f). Esse comportamento está em concordância com a instabilidade de hélices em solvente contínuo, de alta constante dielétrica, abordada no Capítulo-5 (seção 5.2). Nas condições dessa simulação, as pontes de hidrogênio intramoleculares, que estabilizariam a hélice, são enfraquecidas pela alta constante dielétrica do meio.

o perfil de potencial através da membrana

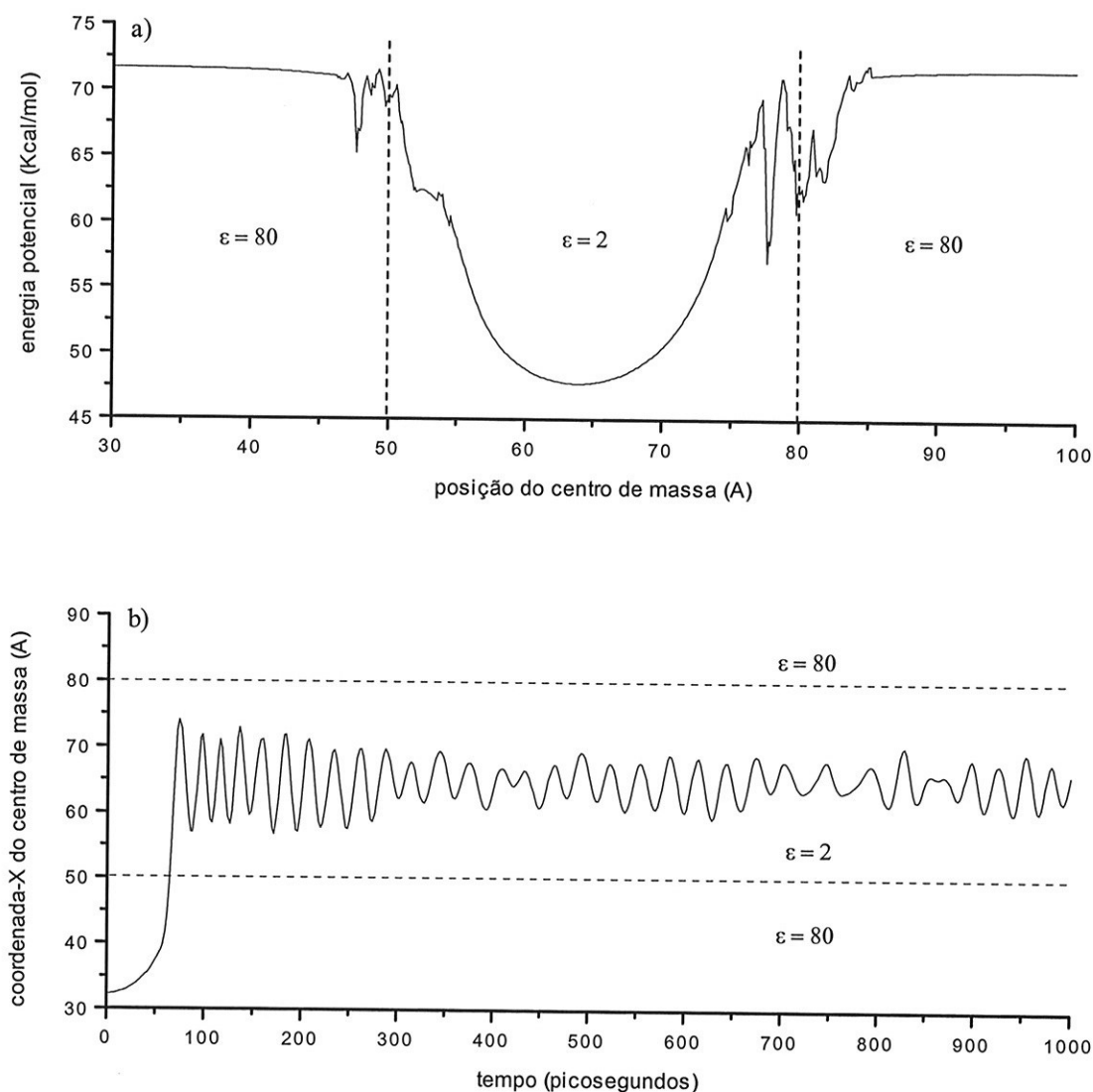


Figura-7.4 Poço de potencial para o α -MSH na membrana (a) e a trajetória do centro de massa da molécula capturada por ele (b).

A conformação estendida, do final da dinâmica no meio polar (Figura-7.3f), foi utilizada para o cálculo do perfil de potencial através da membrana. As superfícies de descontinuidade dielétrica foram posicionadas em $X = 50$ e 80 ângstrons. O centro de massa da molécula foi deslocado em intervalos de $0,1$ ângstron no eixo X, entre as posições 30 e 100 ângstrons, sendo calculada a energia potencial da molécula em cada ponto. O resultado foi um poço de potencial simétrico na região central da membrana e assimétrico nas interfaces (Figura-7.4a). Alguns mínimos locais apareceram nas interfaces em número e posições diferentes, comparando-se as duas interfaces, pelo

fato de a molécula ter sido deslocada pela membrana sempre com a mesma orientação.

As coordenadas e velocidades armazenadas no final da dinâmica no solvente contínuo de $\epsilon = 80$ foram recuperadas para reinicializar a dinâmica na presença da membrana. O centro de massa do α -MSH, que inicialmente estava em repouso próximo a $X = 32$ ângstrons, passou a deslocar-se em direção a membrana, acelerado inicialmente pelo declive suave da energia potencial do meio extra-membranar e posteriormente pela parede do poço no interior da membrana (Figura-7.4b). O peptídeo não foi retido nos mínimos locais da interface indo direto para a região central da membrana, onde seu centro de massa adquiriu um movimento oscilatório, centrado no eixo da membrana paralelo às interfaces.

análise das dinâmicas (em água e membrana)

As variações nas energias potencial, cinética e total para os 17,4 nanosegundos, o tempo total de duração da dinâmica (água + membrana), são apresentados na Figura-7.5a. A energia cinética é mantida sempre constante pelo acoplamento com o reservatório térmico, de maneira que a queda na energia potencial com a entrada do peptídeo na membrana leva à queda na energia total da molécula. A energia total para o peptídeo no meio aquoso não é uma reta, como é para o triptofano observada no Capítulo-5 (seção 5.1). É possível atribuir isto às grandes mudanças conformacionais sofridas pelo peptídeo e à maior diferença em energia entre os estados conformacionais visitados, em comparação com o triptofano cujas diferenças em energia entre os rotâmeros não excederam 1 Kcal/mol. Pode ser essa uma das razões em considerar-se satisfatória a flutuação da energia total em um por cento, com relação à energia cinética, em macromoléculas (Brooks et al., 1983). As flutuações na energia total no interior da membrana podem ter contribuições devidas ao movimento do centro de massa da molécula, que permaneceu oscilatório até o final da dinâmica (Figura-7.5b). A energia total no interior da membrana ainda decresce com o passar do tempo, o que pode ser atribuído à tendência das moléculas em buscar conformações mais estáveis e em parte ao amortecimento do movimento de seu centro de massa.

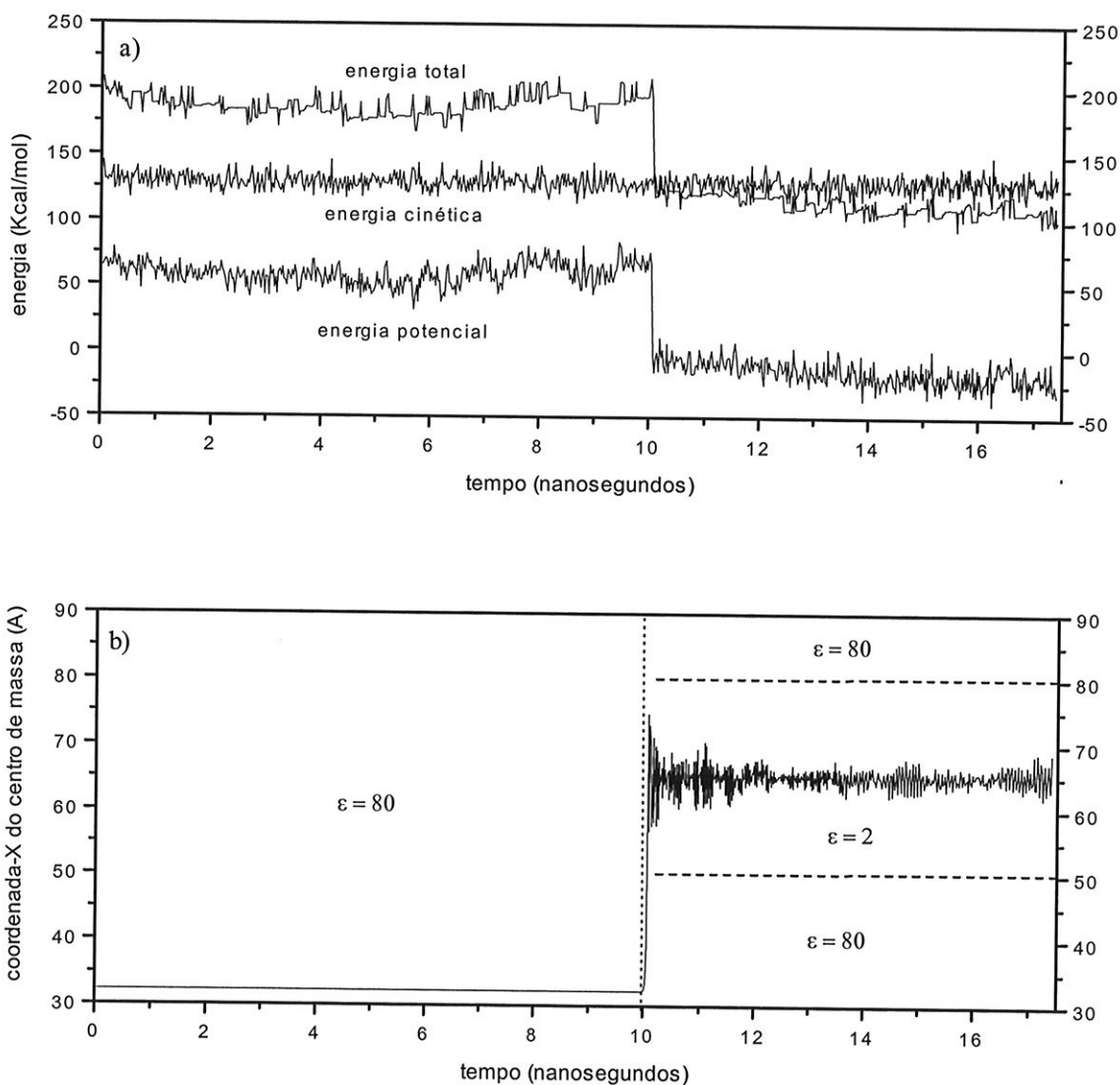


Figura-7.5 Variação das energias potencial, cinética e total para o α -MSH em meio polar e no interior da membrana (a) e o comportamento do seu centro de massa durante toda a dinâmica (b): em repouso no meio contínuo de $\epsilon = 80$ e oscilatório entre as interfaces. (o intervalo entre 10 e 11 nanosegundos em “b” corresponde à Figura-7.4b).

As trajetórias de todos os ângulos diedrais ϕ e ψ durante os 17,4 nanosegundos de duração da dinâmica completa encontram-se na Figura-7.6. A Tyr2, que na Tabela-7.2 aparece sempre na região β , visitou também a região das hélices no meio aquoso e passou cerca de 1 nanosegundo em uma região desfavorável ($\phi \sim 60$, $\psi \sim -60$) do diagrama de Ramachandran após entrar na membrana, terminando a dinâmica na região das hélices. A Ser3, que aparece principalmente na região de hélice- α na Tabela-7.2, saiu rapidamente dessa conformação na água mas voltou a ela nos 5 nanosegundos finais da dinâmica.

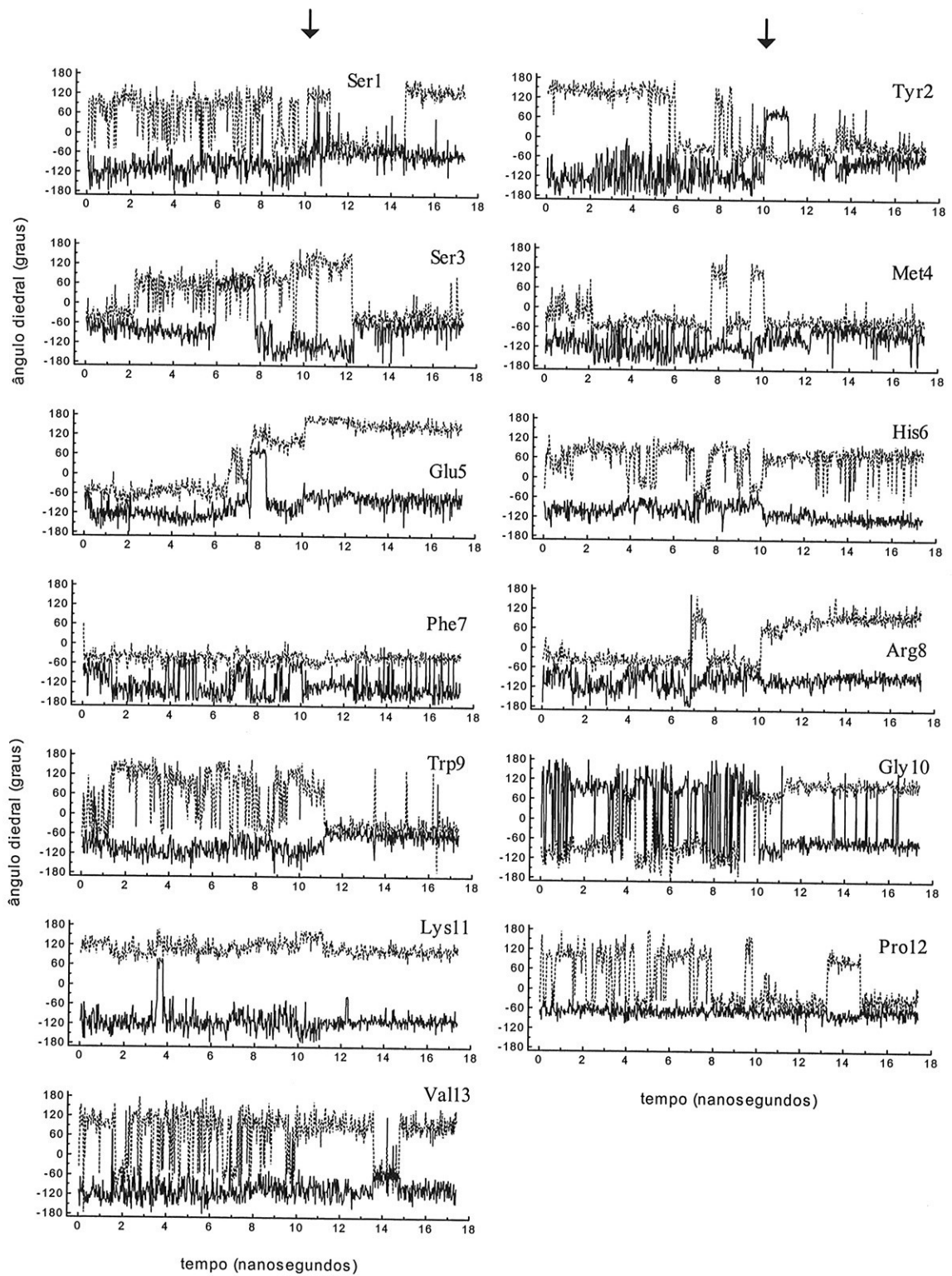


Figura-7.6 Evolução temporal dos ângulos diedrais ϕ (linha contínua) e ψ (linha tracejada) do α -MSH (as setas indicam o instante da passagem para o interior da membrana)

Os diedros da Met4 ficaram a maior parte do tempo na conformação hélice- α , como previsto na Tabela-7.2, visitando a região β em $t = 8$ e 10 nanosegundos

(Figura-7.6). Apesar do Glu5 ter ficado a maior parte do tempo em hélice- α , sua conformação mais provável, próximo a 8 nanosegundo ele saiu dessa conformação, indo para folha- β e aí estabilizando-se na membrana. A His6 permaneceu em sua conformação prevista quase todo o tempo. Embora não tenha sido prevista uma posição preferencial para a Phe7, ela permaneceu em hélice- α todo o tempo. A Arg8, que também não teve conformação prevista, ficou em hélice a maior parte do tempo em água, mas estabilizou-se próximo a região β no interior da membrana. O Trp9 ficou em média na sua região prevista, entre hélice- α e folha- β , mas praticamente estabilizou-se em hélice- α na membrana. Por não possuir cadeia lateral e portanto não sofrer restrições conformacionais, a Gly10 alterou várias vezes sua conformação em água, preferindo porém a região β no meio hidrofóbico. A Lys11 ficou próxima à sua conformação prevista para o esqueleto praticamente o tempo todo, enquanto a Pro12 esteve na sua posição em água, ficando mais tempo em hélice- α na membrana.

De um modo geral, a Figura-7.6 mostra que houve estabilização conformacional do esqueleto, entre os resíduos 2 a 11, no interior da membrana. Porém, somente os resíduos Ser3, Met4, His6 estabilizaram-se em posições mais frequentes na Tabela-7.2 enquanto Tyr2, Glu5 e Trp9 estabilizaram-se em conformações não previstas. As trajetórias dos diedros ϕ e ψ do triptofano estão juntas com a dos diedros χ_1 e χ_2 na Figura-7.7, para comparação. Em dois instantes parece haver maior correlação entre os diedros, em mudanças conformacionais: próximo a $t = 1$ nanosegundo o esqueleto passa da conformação hélice- 3_{10} para folha- β enquanto a cadeia lateral passa de *anti* χ_2g^- para *perp* χ_2g^+ e após a entrada na membrana, próximo a $t = 11$ nanosegundo, o esqueleto passa de folha- β para hélice- α enquanto a cadeia lateral passa de *anti* χ_2g^+ a *perp* χ_2g^- .

Pelos resultados para o diedro χ_1 do Trp no Capítulo-5 (Figura-5.2c), de acordo com as três populações de rotâmeros encontradas para o Trp em experimentos de NMR e com o “modelo de rotâmero” para o decaimento fluorescente, são inesperadas as interconversões conformacionais observadas para o ângulo diedral χ_1 na Figura-7.7. Foram três mudanças conformacionais em água e uma logo após a entrada na membrana, em um intervalo de 11 nanosegundos. A mudança logo após a entrada na membrana pode ser explicada levando-se em conta as mudanças globais na conformação do peptídeo com sua entrada e acomodação no meio hidrofóbico. A primeira mudança pode estar associada à ruptura da hélice no início da dinâmica,

enquanto as mudanças próximas a $t = 7$ e 9 nanosegundos estariam ligadas ao estiramento da cadeia. Vários resíduos sofrem mudanças conformacionais entre 7 e 9 nanosegundos, sendo o Glu5 o que mais se alterou, registrando o estiramento da cadeia pela sua passagem da conformação compacta hélice- α para a estendida folha- β (Figuras 7.3 e 7.6). Supondo que a conformação estendida seja a preferida para o α -MSH em solução aquosa, como parece ser a regra para peptídeos com suas dimensões (ver polialanina: Capítulo-5, seção 5.2; Taylor & Kaiser, 1987), é possível que não mais ocorram mudanças globais como ruptura de hélice e estiramento. O peptídeo passaria a flutuar entre conformações estendidas e o resíduo triptofano estabilizaria em um rotâmero ao redor do diedro χ_1 em água.

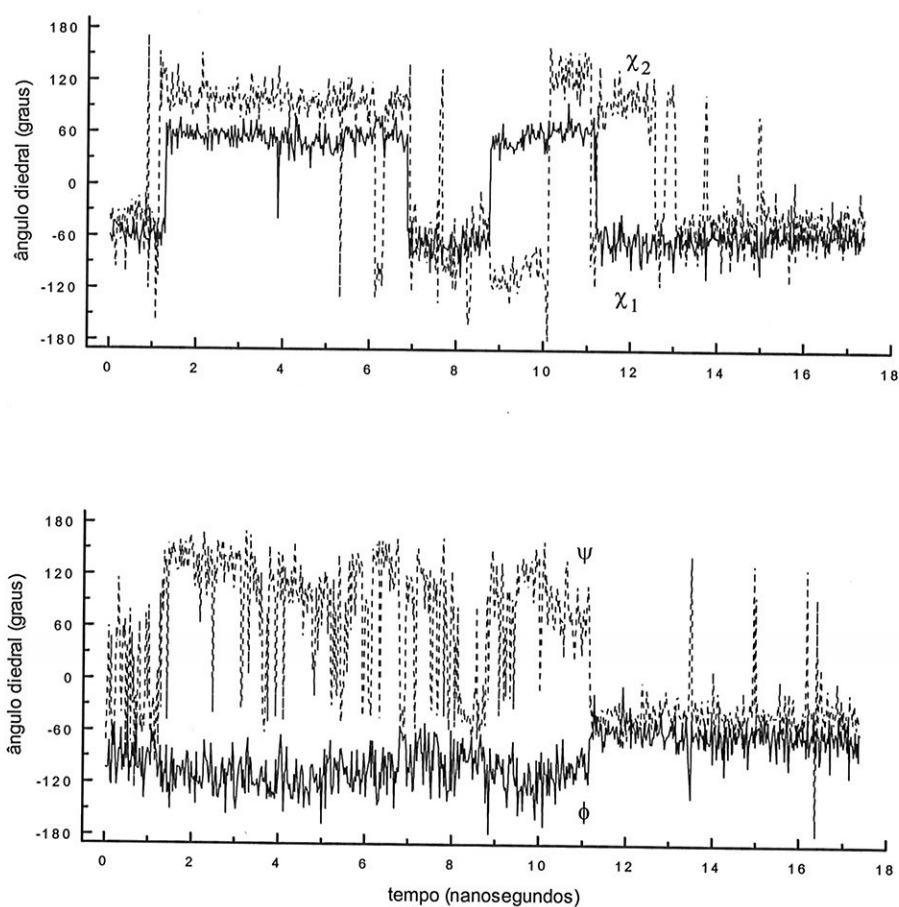


Figura-7.7 (a) Trajetórias dos diedros χ_1 e χ_2 da cadeia lateral e (b) ϕ e ψ do esqueleto do triptofano.

O método de Rooman pode não ser adequado para a previsão conformacional de qualquer peptídeo em solução aquosa por basear-se em um banco de proteínas, onde a maioria dos resíduos aminoácidos estariam empacotados no interior hidrofóbico das mesmas. Esse método foi criado baseando-se no fato de haver enrolamentos e empacotamentos locais, anteriores ao empacotamento global das

proteínas. Em tais regiões as interações locais seriam de grande importância na estabilização prévia de estruturas secundárias, de forma que peptídeos com a mesma seqüência de aminoácidos teriam estruturas estáveis em água, apresentando um *gap* de energia entre a conformação mais provável e as demais (Rooman, 1991). Como exposto anteriormente, não é o caso do α -MSH, ele não apresenta *gaps* de energia na Tabela-7.2 e assume uma conformação diferente das propostas em água.

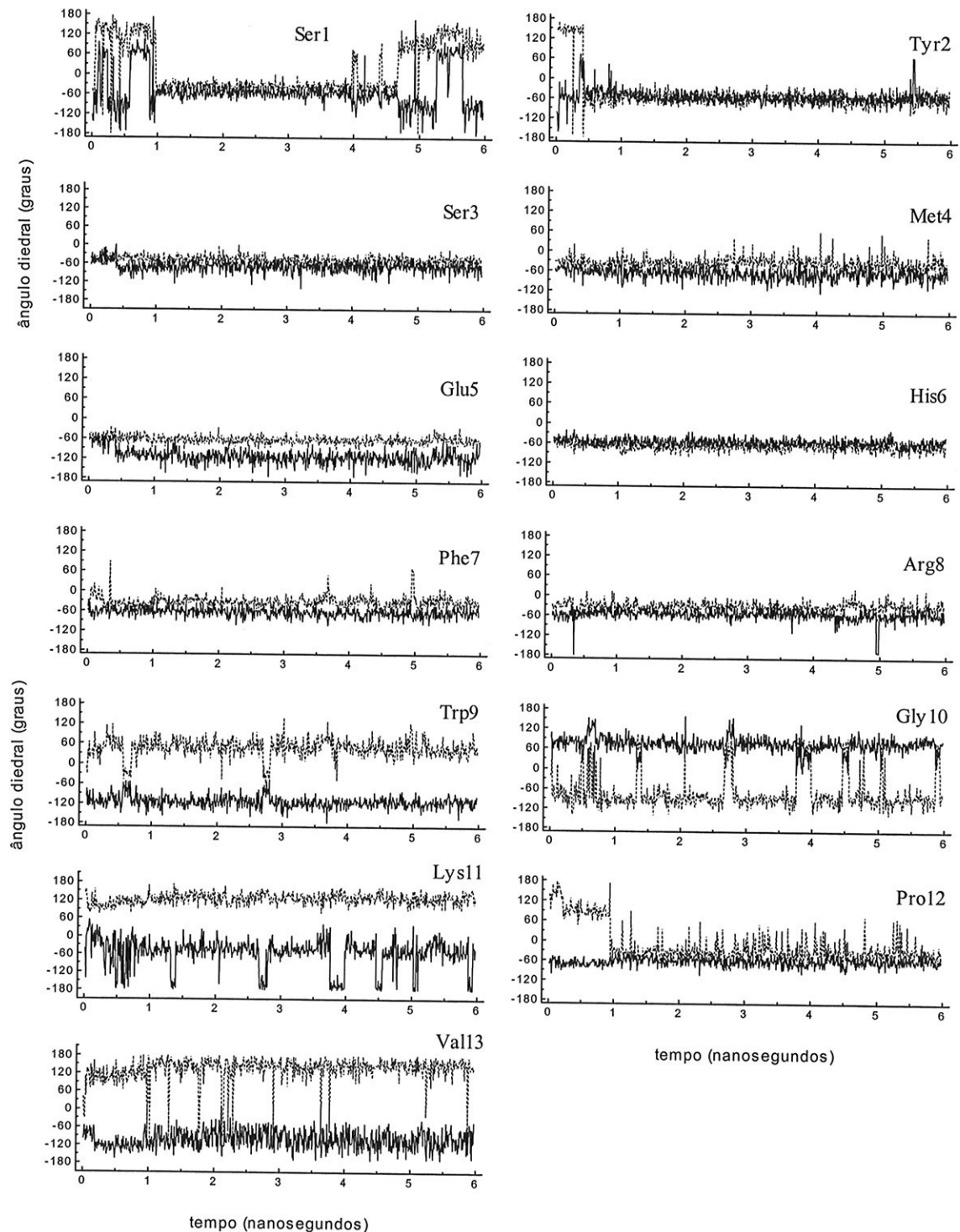
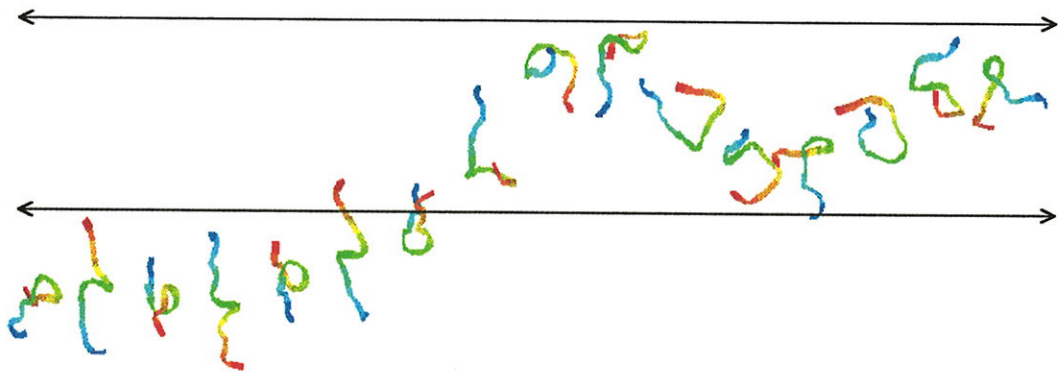


Figura-7.8 Evolução temporal dos diedros ϕ e ψ do α -MSH para a dinâmica iniciada na membrana.

A conformação proposta para o α -MSH, pelo método de Rooman, mostrou ser estável quando a dinâmica inicia com o peptídeo já no interior da membrana, nessa conformação (Figura-7.8). Foram rodados 6 nanosegundos de dinâmica e a molécula permaneceu centrada na membrana. Não ocorreu praticamente mudanças conformacionais entre os resíduos 3 e 11, ficando estável uma hélice entre a Tyr2 e a Arg8. Porém, entre o local da síntese e seu destino no sítio ativo do receptor, espera-se que esse peptídeo seja exposto ao solvente polar extracelular, onde a conformação helicoidal seria instável. Além disso, para a estimulação de melanócitos é mais compatível uma conformação em dobra- β do que em hélice- α na região mais relevante para a atividade biológica, His6-Phe7-Arg8-Trp9, como sugerem estudos de estrutura-função com o α -MSH e seus análogos (Sugg et al., 1988; Al-Obeidi et al., 1989c; Hruby et al., 1993). A Figura-7.6 sugere que quando o peptídeo estendido no meio aquoso é incorporado na membrana, ocorre a estabilização de uma dobra- β na Arg8.

O momento da entrada do α -MSH na membrana é registrado por uma seqüência de imagens na Figura-7.9a, geradas a partir das coordenadas atômicas tomadas em intervalos de 2 picosegundos. É possível a visualização do peptídeo vindo pelo meio aquoso estendido, em movimento rotacional, entrando em seguida na membrana. Na primeira interface o mesmo dobra-se ao meio e seu centro de massa passa a oscilar entre as duas interfaces. O instante da dobra foi próximo a $t = 10$ nanosegundos, como pode-se observar na evolução dos diedros ϕ e ψ da Arg8 na Figura-7.6. A conformação do esqueleto, estabilizada no final da dinâmica, pode ser visualizada na seqüência de imagens da Figura-7.9b, tomadas em intervalos de 50 picosegundos. Na Figura-7.10 são apresentados mais detalhes das conformações finais em água e na membrana. São destacados os resíduos carregados Glu5⁻, Arg8⁺ e Lys11⁺, que não formaram pontes salinas no solvente polar devida a alta constante dielétrica do meio (Figura-7.10a). Porém, no interior da membrana, a baixa constante dielétrica propicia maior atração eletrostática favorecendo a estabilização dessas pontes, sendo talvez o principal motivo da dobra do peptídeo ao meio (Figura-7.10b). Cria-se então um “caroço” hidrofílico e uma superfície hidrofóbica no peptídeo, com a segregação dos resíduos pelas suas cargas. Na Figura-7.10c esse “caroço” hidrofílico pode ser visto em detalhe e em outro ângulo, com o resíduo Glu5 ladeado pela Arg8 e Lys11 a distâncias entre 3 e 4 ângstrons. No detalhe também podem ser vistos os

a)



b)

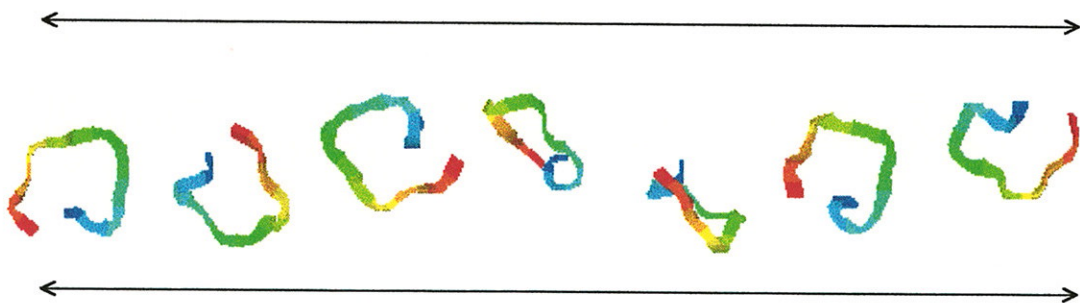


Figura 7.9 Representações gráficas para o esqueleto peptídico do α -MSH (a) migrando para o interior da membrana (coordenadas geradas em intervalos de 2 picosegundos) e (b) após estabilização conformacional na membrana (coordenadas geradas em intervalos de 50 picosegundos).
As setas delimitam a membrana

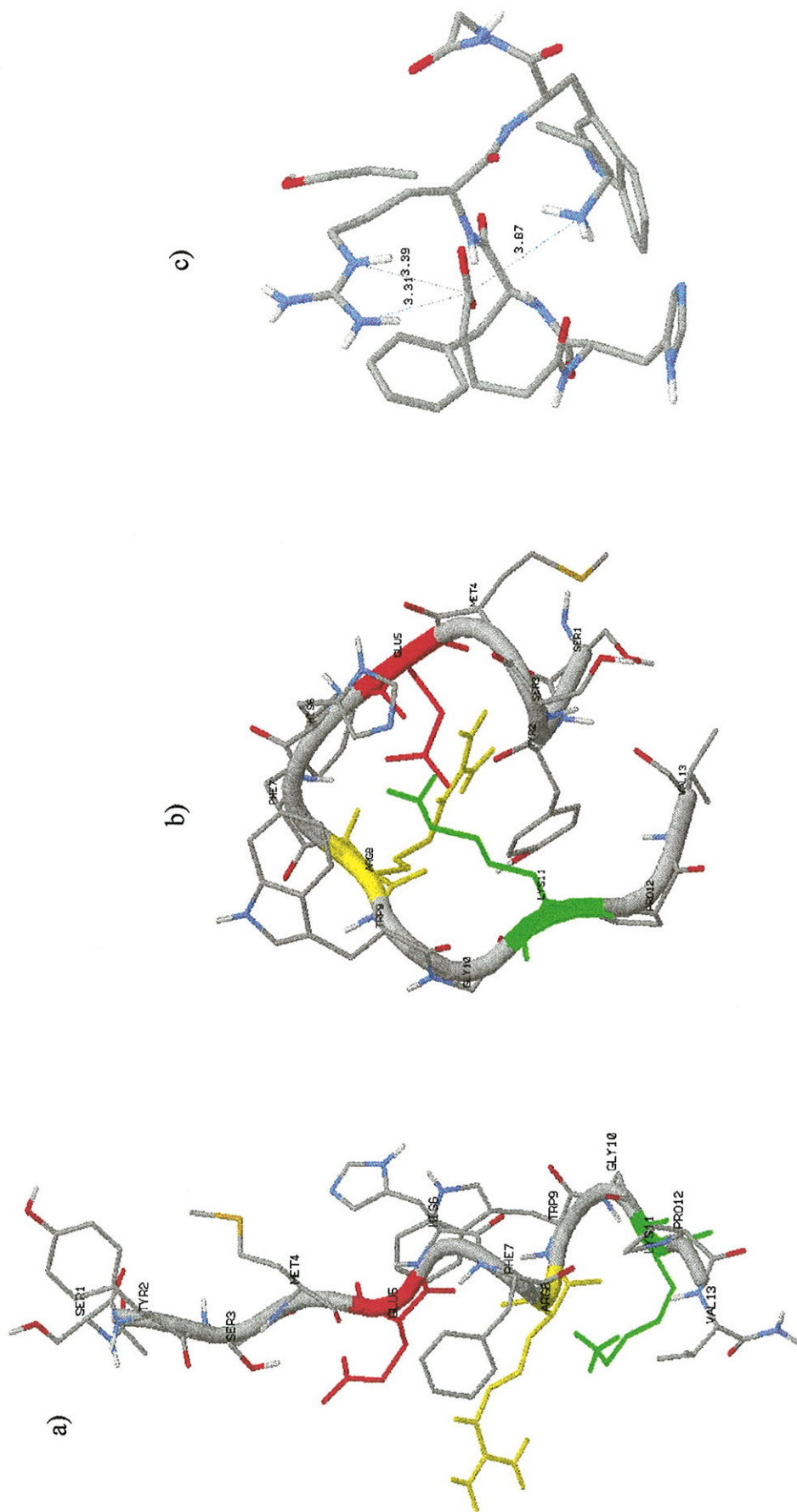


Figura-7.10 Representações gráficas para o α -MSH: (a) após 10 nanosegundos em solvente polar e (b) após 7,4 nanosegundos no interior de membrana. No detalhe (c), o “caroço” hidrofílico formado na membrana por Glu5⁻, Arg8⁺ e Lys11⁺ e a distância, em ângstroms, entre alguns de seus átomos.

resíduos His6, Phe7 e Trp9 formando parte de uma superfície hidrofóbica circundando o núcleo hidrofílico.

Esse arranjo estrutural para o α -MSH está em pleno acordo com a conformação biologicamente ativa proposta na literatura. Os ensaios de estrutura-função encontraram análogos superpotentes pela seleção de peptídeos que se estabilizam em conformações bastante próximas a esta.

8 Conclusões

validade dos modelos e métodos utilizados

Na escolha da função energia potencial utilizada no programa Thor procurou-se atender ao compromisso entre acurácia e simplicidade, para a análise estrutural e dinâmica de macromoléculas, tanto em meios homogêneos como no meio inhomogêneo das interfaces biológicas. A aproximação de “átomo unido”, que agrupa os átomos da ligação C-H em pseudoátomos, não levou a perdas observáveis na descrição de estruturas e, ao mesmo tempo, reduziu para próximo da metade o número de átomos dos sistemas estudados, resultando no ganho em tempo de computação. Com essa aproximação não há variações no número ou posições de mínimos de energia, tanto em cadeias laterais como em esqueletos de peptídeos. Os rotâmeros do triptofano foram encontrados nas posições previstas, enquanto os esqueletos peptídicos obedeceram o diagrama de Ramachandran. O comportamento dinâmico do triptofano, bem como a distribuição populacional de seus rotâmeros foram concordantes com o observado experimentalmente. A modelagem explícita somente dos átomos de hidrogênio polares, descreveu satisfatoriamente as pontes de hidrogênio e a estabilização de estruturas secundárias em baixa constante dielétrica. O tratamento do solvente como um contínuo eletrostático foi satisfatório na descrição das conformações estendidas para peptídeos em água e no empacotamento dos mesmos em meio apolar.

O resultado obtido com o emprego do “método das imagens eletrostáticas”, para a descrição da descontinuidade dielétrica na interface água-membrana, tende ao mesmo resultado sem o emprego do método em regiões distantes da interface, mostrando a coerência do modelo. Na região da interface, o degrau de potencial sobre a superfície de descontinuidade entre os dois meios é suavizado com o emprego do método, evitando a descontinuidade no potencial. Além de gerar forças que direcionam as moléculas para o meio intra ou extramembranar, a suavização do potencial é um pré-requisito para a aplicabilidade da Dinâmica Molecular. É necessário que a energia potencial seja uma função contínua das posições e que o passo de tempo seja pequeno, para que as posições atômicas possam ser previstas em cada passo a partir das posições nos passos anteriores.

estudos conformacionais do triptofano

Na utilização do método *annealing* mostrou-se que a configuração que confere o mínimo global de energia potencial para uma dada estrutura, não é necessariamente a mais visitada ou a mais populada. Em um sistema termodinâmico espera-se que o mínimo global seja calculado através da energia livre de Gibbs, incluído-se contribuições entrópicas. Por exemplo, nas populações de rotâmeros do triptofano, as conformações de menor energia potencial não foram as mais visitadas e a conformação *gauche*⁺, que foi a menos visitada, em geral não apresentou a maior energia potencial. Ao mesmo tempo, enquanto as conformações *trans* e *gauche*⁻ possuem maior liberdade de movimento a conformação *gauche*⁺ é mais restringida em seus movimentos. Uma concordância entre a distribuição populacional calculada e a energia livre de Gibbs seria possível, atribuindo-se menor entropia à conformação *gauche*⁺ e maior entropia às duas outras conformações.

A dinâmica do triptofano mostrou que suas mudanças conformacionais ao redor do diedro χ_2 podem ser muito mais frequentes do que ao redor de χ_1 , concordando com o fato de as populações associadas aos dois microestados conformacionais ao redor de χ_2 não serem resolvidas por NMR ou fluorescência com resolução temporal. A menor população para a conformação *gauche*⁺ está em concordância com o frequentemente observado em NMR. Em experimentos de fluorescência em que observa-se três tempos de vida para o triptofano, a conformação *gauche*⁺ é candidata a ser a de menor fator pré-exponencial.

estabilização de hélices- α

Mostrou-se que a estabilidade de hélices- α é um efeito cooperativo pois as flutuações conformacionais diminuíram gradualmente partindo das extremidades em direção ao centro da polialanina, ficando a maioria dos resíduos centrais estabilizados em hélice- α . A estabilização foi atribuída às pontes de hidrogênio múltiplas ou flutuantes entre os resíduos n e $n + 3$, $n + 4$ ou $n + 5$, como consequência de flutuações térmicas. A possibilidade das pontes de hidrogênio deslocarem-se entre resíduos vizinhos é importante para o *folding* de cadeias polipeptídicas. Mostrou-se ainda que a baixa constante dielétrica é importante para a estabilização de hélices- α mesmo para as hélices anfífilicas que, apesar de estarem na interface entre o meio

aquoso e a membrana, ou entre o meio aquoso e o interior hidrofóbico de proteínas globulares, seu eixo pode estar deslocado para o interior do meio apolar.

mudanças conformacionais na interface água-membrana

A passagem de peptídeos para o interior de biomembranas, ou sua retenção na interface com o meio hidrofílico, pode ser acompanhada de empacotamento e estabilização conformacional da cadeia. Isso seria causado pela redução dos graus de liberdade, imposta pela baixa constante dielétrica do interior hidrofóbico ou pela variação do potencial na interface. A hélice anfifílica de uma β -endorfina modelo foi parcialmente conservada na interface e o tetrapeptídeo His-Phe-Arg-Trp mostrou perfis de potencial diferentes, conforme o grau de empacotamento. Uma região da seqüência sinal para o receptor- λ na *e. coli*, teve conformação em hélice- α estabilizada perpendicularmente à interface como proposto na literatura.

A trajetória dessa seqüência sinal perante a interface água-membrana mostrou que a passagem através da interface ou sua retenção na mesma depende de fatores como conformação e distribuição de cargas. Uma conformação randômica na forma zwitteriônica do peptídeo atravessou livremente a interface, acompanhando uma curva de potencial decrescente para o interior da membrana, sem barreiras ou mínimos de energia significativos. Quando a conformação em hélice- α foi imposta para uma parte do peptídeo, sua passagem para o meio apolar foi impedida por uma barreira de potencial. Porém, quando instalado inicialmente do outro lado da barreira, sua trajetória foi capturada por um mínimo de energia na interface. Supos-se portanto que a hélice seria formada após a entrada do peptídeo na membrana, concordando com a instabilidade sugerida para essa estrutura em meio polar. Para a forma não zwitteriônica com a conformação parcialmente em hélice- α observou-se também um mínimo na região da interface porém, nenhuma barreira significativa foi observada para reter o peptídeo no meio aquoso.

O estiramento do α -MSH no meio de alta constante dielétrica é também compatível com a instabilidade de peptídeos de porte médio em conformações empacotadas ou em hélice em meio aquoso. Nesse caso porém, o desenrolamento da estrutura foi mais lento que o da polialanina, de maneira que após 10 nanosegundos em água, um resquício de *loop* foi ainda observado. É possível que essa região em *loop* seja estável em água. Ao entrar em contato com a membrana o α -MSH dobrou-se

ao meio imediatamente, estabilizando-se em seguida em dobra- β no interior da membrana. A estabilização dessa dobra foi reforçada por pontes salinas entre os resíduos Arg8, Glu5 e Lys11, os quais formaram um “caroço” hidrofílico segregado de uma superfície hidrofóbica. A estabilização dessa dobra e a exposição dos resíduos His6, Phe7 e Trp9 está em pleno acordo com o esperado para a conformação biologicamente ativa do peptídeo.

contribuição para o efeito hidrofóbico

Com a aplicação do “método das imagens eletrostáticas”, alguns peptídeos carregados com cargas do mesmo sinal mostraram um comportamento hidrofílico. No caso da tetralisina houve um mínimo na interface ao lado de uma barreira para o meio hidrofóbico, concordando com a anfifilicidade atribuída a esse aminoácido. O fragmento modelo para a hélice anfifílica da β -endorfina comportou-se da maneira esperada. Uma inspeção na seqüência de aminoácidos dessa estrutura mostra que todos os resíduos carregados são lisinas. A seqüência mensageira mínima do α -MSH, His-Phe-Arg-Trp, atravessou para o interior do meio hidrofóbico, o que se poderia esperar pelo arranjo estrutural desse segmento no hormônio na conformação biologicamente ativa. A seqüência sinal estudada comportou-se como o previsto, incorporando-se à membrana e aí estabilizando em uma conformação parcial em hélice- α . Quanto ao α -MSH, a observação experimental é que o mesmo interage com membranas lipídicas carregadas negativamente, instalando-se próximo às interfaces com o meio polar, como resultado de sua carga líquida positiva. Tem se observado ainda que a interação com membranas lipídicas zwitteriônicas é mais fraca. O papel da membrana seria porém relevante para a estabilização da conformação biologicamente ativa.

A hidrofobicidade tem contribuições entálpicas e entrópicas intermoleculares, vindas de interações soluto-solvente, solvente-solvente e soluto-soluto, bem como intramoleculares, vindas de interações internas nas moléculas do soluto e do solvente. No presente trabalho considerou-se somente a renormalização das interações eletrostáticas intramoleculares, perante um contínuo eletrostático representando o solvente, ou uma superfície de descontinuidade dielétrica representando a interface água-membrana. Apesar de cobrir somente uma parte das interações que contribuem

para a hidrofobicidade, pode-se dizer que no modelo aqui proposto o comportamento anfifílico, hidrofóbico ou hidrofílico de alguns peptídeos foi reproduzido.

Referências Bibliográficas

- Al-Obeidi F, Hrubby VJ, Castrucci AM, and Hadley ME (1989a), Design of potent linear α -melanotropin 4-10 analogue modified in position 5 and 10, *J. Med. Chem.*, **32**, 174-179.
- Al-Obeidi F, Hadley ME, Pettitt BM, and Hrubby VJ (1989b), Design of a new class of superpotent cyclic α -melanotropins based on quenched dynamics simulations, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 3413-3416.
- Al-Obeidi F, Castrucci AM, Hadley ME, and Hrubby VJ (1989c), Potent and prolonged acting cyclic lactam analogues of α -melanotropin: design based on molecular dynamics, *J. Med. Chem.*, **32(12)**, 2554-2561.
- Allen MP & Tildesley DJ (1987), *Computer Simulation of Liquids*, Clarendon Press, Oxford.
- Arêas EPG, Pascutti PG, Schreier S, Mundim KC, and Bisch PM (1994), Molecular dynamics at a cytoplasm/membrane interface of a signal sequence from an *E.coli* maltoporin, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **27**, 527-533.
- Arêas EPG, Pascutti PG, Schreier S, Mundim KC, and Bisch PM (1995), Molecular dynamics simulations of signal sequences at a membrane/water interface, *J. Phys. Chem.*, **99**, 14882-14892.
- Arridge RGC & Cannon CG (1964), Calculation of CONH dipole contribution to lattice energies of amides, polyamides and polypeptides, *Proc. R. Soc. Lond.*, **A278**, 91-109.
- Barrow MG (1976), *Química Física*, Ed. Reverté S. A., Barcelona.
- Beechem JM & Brand L (1985), Time-resolved fluorescence in proteins, *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 43-71.
- Berendsen HJC, Postma JPM, van Gunsteren WF, DiNola A, and Haak JR (1984), Molecular dynamics with coupling to an external bath, *J. Chem. Phys.* **81(8)**, 3684-3690.
- Berendsen HJC & van Gunsteren WF (1986), Practical algorithms for dynamic simulations. in *Molecular Dynamics Simulation of Statistical Mechanical Systems, Proceedings of the International School of Physics "Enrico Fermi"*, Ed. by Ciccotti G & Hoover HG, North-Holland Phys. Publishing, Amsterdam.
- Biaggi MH, Pinheiro TJT, Watts A, and Lamy-Freund MT (1996), Spin label and ^2H -NMR studies on the interaction of melanotropic peptides with lipid bilayers, *Eur. Biophys. J.*, accepted.
- Branden C & Tooze J (1991), *Introduction to Protein Structure*, Garland Pub. Inc. NY.
- Brigs MS, Cornell DG, Dluhy RA, and Gierasch LM (1986), Conformations of signal peptides induced by lipids suggest initial steps in protein export, *Science*, **233**, 206-208.
- Brooks BR, Brucoreli RE, Olafson BD, States DJ, Swaminathan S, and Karplus M (1983), CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations, *J. Comp. Chem.*, **4(2)**, 187-217.
- Brooks III CL, Karplus M, and Pettitt BM (1988), *Proteins: A Theoretical Perspective of Dynamics, Structure, and Thermodynamics*, Advances in chemical physics, Vol. LXXI, John Wiley & Sons, New York
- Brooks III CL (1995), Methodological advances in molecular dynamics simulation of biological systems, *Cur. Op. Struc. Biol.*, **5**, 211-215.
- Bruch MD, McKnight CJ, and Gierasch LM (1989), Helix formation and stability in a signal sequence, *Biochemistry*, **28**, 8554-8561.
- Bruch MD & Gierasch LM (1990) Comparison of helix stability in wild-type and mutant LamB signal sequences, *J. Biol. Chem.*, **265**, 3851-3858.
- Chhajlani V & Wikberg JES (1992), Molecular cloning and expression of the human melanocyte stimulating hormone receptor cDNA, *FEBS Lett.*, **309**, 417-420.
- Chhajlani V, Xu X, Blauw J, and Sudarshi S (1996), Identification of ligand binding residues in extracellular loops of melanocortin 1 receptor, *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **219**, 521-525.
- Clark M, Cramer RD, and van Opdenbosch N (1989), Validation of the general purpose Tripos 5.2 force field, *J. Comp. Chem.*, **10 (8)**, 982-1012.

- Colucci WJ, Tistra L, Sattler MC, Fronczek FR, and Barkley MD (1990), Conformational studies of a constrained tryptophan derivative: implications for the fluorescence quenching mechanism, *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 9182-9190.
- Cone RD, Mountjoy KG, Robbins LS, Nadeau JH, Johnson KR, Roselli-Rehffuss L, and Mortrud MT (1993), Cloning and functional characterization of a family of receptors for the melanotropic peptides, in *The Melanotropic Peptides, Annals of the New York Academy of Sciences*, ed. by H. Vaudry & AN. Eberle, New York.
- Cowan SW, Schirmer T, Rummel G, Steirt M, Ghosh R, Pauptit RA, Joansonius JN, and Rosenbuch JP (1992), Crystal structures explain the functional properties of two *E. Coli* porins, *Nature*, **358**, 727-734.
- Creed D (1984), The photophysics and photochemistry of the near-UV absorbing aminoacids-1, tryptophan and its simple derivatives, *Photochem. Photobiol.*, **39**, 537-562.
- Dezube B, Dobson CM, and Teague CE (1981) Conformational analysis of triptophan in solution using nuclear magnetic resonance methods, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2**, 730-735.
- Engh RA, Chen LXQ, and Fleming GR (1986), Conformational dynamics of tryptophan: a proposal for the origin of the non-exponential florescence decay, *Chem. Phys. Letters*, **126 (3,4)**, 365-372.
- Emr SD & Silhavy TJ (1983), Importance of secondary structure in the signal sequence for protein secretion, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 4599-4603.
- Finer-Moore J, Bazan JF, Rubin J, and Stroud RM (1989), Identification of membrane proteins and soluble proteins secondary structural elements, domains structure, and packing arrangements by Fourier-transform amphipathic analysis, in *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation*, Ed. by Gerald D. Fasman, Plenum Press, New York.
- Friedman HL (1975), Image approximation to the reaction field, *Mol. Physiol.*, **29**, 1533-1543.
- Gierasch LM (1989), Signal Sequences, *Biochemistry*, **28**, 923-930.
- Gilson MK (1995), Theory of electrostatic interactions in macromolecules, *Cur. Op. Struc. Biol.*, **5**, 216-223.
- Goldman C, Pascutti PG, Piquini P, and Ito AS (1995), On the contribution of electron transfer reactions to the quenching of tryptophan fluorescence, *J. Chem. Phys.*, **103(24)**, 10614-10620.
- Goldstein H (1980), *Classical Mechanics*, 2nd ed, Addison-Wesley, London.
- Gonçalves MAMS (1996), *Modelagem Molecular Clássica Usando o Método Estocástico: Simulação por Termalização-GSA*, Dissertação de Mestrado, Instituto de Física - Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- Gordon HL, Jarrell HC, Szabo AG, Willis KJ, and Somorjai RL (1992), Molecular dynamics simulations of the conformational dynamics of tryptophan, *J. Phys. Chem.*, **96 (4)**, 1915-1921.
- Grantz I, Shimoto Y, Konda Y, Miwa H, Dickinson CJ, and Yamada T (1994), Molecular cloning, expression and characterization of a fifth melanocortin receptor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **200**, 1214-1220.
- Halgren TA (1995), Potential energy functions, *Cur. Op. Struc. Biol.*, **5**, 205-210.
- Hruby VJ, Knittel JJ, Mosberg HI, Rockway TW, Wilkes BC, and Hadley ME (1983), Conformational considerations in the design of highly potent and long-acting peptide hormone agonists and antagonists, in *Peptides 1982*, ed. by Blaha K & Malon P, Walter de Gruyter & Co, Berlin.
- Hruby VJ, Wilkes BC, Cody, WL, Sawyer TK, and Hadley ME (1984), Melanotropins: structural, conformational, and biological considerations in the development of superpotent and superprolonged analogues, *Pept. Protein Rev.*, **3**, 1-64.
- Hruby VJ, Cody WL, Castrucci AML, and Hadley ME (1988), Conformational and biological analysis of α -MSH fragment analogues with sterically constrained amino acid residues, *Collection Czechoslovak Chem. Commun.*, **53**, 2549-2566.
- Hruby VJ, Sharma SD, Toth K, Jaw JY, Al-Obeidi F, Sawyer TK, and Hadley ME (1993), Design, synthesis, and conformation of superpotent and prolonged acting melanotropins, in *The Melanotropic Peptides, Annals of the New York Academy of Sciences*, ed. by H. Vaudry & AN. Eberle, New York.
- Hruby VJ, Lu D, Sharma SD, Castrucci AL, Kesterson RA, Al-Obeidi FA, Hadley ME, and Cone RD (1995), Cyclic lactam α -melanotropin analogues Ac-Nle⁴-cyclo[Asp⁵,D-Phe⁷,Lys¹⁰] α -melanocyte-

- stimulating hormone-(4-10)-NH₂ with bulky aromatic amino acids at position 7 show high antagonist potency and selectivity at specific melanocortin receptors, *J. Med. Chem.*, **38**, 3454-3461.
- Ito AS, Castrucci AML, Hrubby VJ, Hadley ME, Krajcarski DT, and Szabo AG (1993), Structure-activity correlations of melanotropin peptides in model lipids by tryptophan fluorescence studies, *Biochemistry*, **32** (45), 12264-12272.
- Jäckle H & Luisi PL (1984), Conformational study of histidine- and tryptophan-containing peptides in solution based upon the combination of nuclear magnetic resonance, circular dichroism, and fluorescence measurements, *J. Phys. Chem.*, **88**, 1767-1777.
- Jackson JD (1983), *Eletrodinâmica Clássica*, Guanabara Dois, Rio de Janeiro.
- Jacchieri SG & Ito AS (1995), Characterization of structural transitions from aqueous solution to a lipid phase for α -MSH, *Int. J. Quantum Chem.*, **53**, 335-341.
- Jayawickreme CK, Quillan JM, Graminski GF, and Lerner MR (1994), Discovery and structure-function analysis of α -melanocyte-stimulating hormone antagonists, *J. Biol. Chem.*, **269**(47), 29846-29854.
- Jegou S, Blazques C, Delbende C, Bunel DT, and Vaudry H (1993), Regulation of α -melanocyte stimulating hormone release from hypothalamic neurons, in *The Melanotropic Peptides, Annals of the New York Academy of Sciences*, ed. by H. Vaudry & AN. Eberle, New York.
- Jones JD, McKnight CJ, and Gierasch LM (1990), Biophysical studies of signal peptides: implications for signal sequence functions and the involvement of lipid in protein export, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **22**, 213-232.
- Jones JD & Gierasch LM (1994), Effect of charged residue substitutions on the membrane-interactive properties of signal sequences of *Escherichia coli* LamB protein, *Biophysical Journal* **67**, 1534-1545.
- Juffer AH, Botta EFF, van Keulen BAM, van der Ploeg A, and Berendsen HJC (1991), The electric potential of a macromolecule in a solvent: a fundamental approach, *J. Comp. Phys.*, **97**, 144-171.
- Karplus M & Petsko AG (1990), Molecular dynamics simulations in biology, *Nature*, **347**, 631-639.
- Kim, P. S., & Baldwin, R. L. (1982) Specific intermediates in the folding reactions of small proteins and the mechanism of protein folding, *Annu. Rev. Biochem.*, **51**, 459-489.
- Landry SJ & Gierasch LM (1991), Recognition of nascent polypeptides for targeting and folding, *Trends. Biochem. Sci.*, **16**, 159-163.
- Lehninger AL (1986), A síntese das proteínas e sua regulação, em *Princípios de Bioquímica*, Sarvier ed. Ltda, São Paulo, 621-648.
- Lemmon MA & Engelman DM (1994), Specificity and promiscuity in membrane helix interactions, *Quarterly Reviews of Biophysics*, **27**(2), 157-218.
- Macêdo ZS, Furquim TA, and Ito AS (1996), Estimation of average depth of penetration of melanotropins in dimyristoylphosphatidylglycerol vesicles, *Biophysical Chemistry*, **59**, 193-202.
- Mackay DH, Cross AJ, and Hagler AT (1989), The role of energy minimization in simulation strategies of biomolecular systems, in *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation*, Ed. by Gerald D. Fasman, Plenum Press, New York.
- McKnight CJ, Rafalsk M, and Gierasch LM (1991), Fluorescence analysis of triptophan-containing variants of LamB signal sequence upon insertion into a lipid bilayer, *Biochemistry*, **30**, 6241-6246.
- McMahon LP, Colucci WJ, McLaughlin ML, and Barkley MD (1992), Deuterium isotope effects in constrained tryptophan derivatives: implications for tryptophan photophysics, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 8442-8448.
- Moret MASG, Pascutti PG, Bisch PM, and Mundim KC (1996), Stochastic molecular optimisation using generalized simulated annealing, *J. Com. Chem.*, submitted.
- Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT, and Cone RD (1992), The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors, *Science*, **257**, 1248-1251.
- Mundim KC, Pascutti PG, and Bisch PM (1992), *THOR - Force Field and Molecular Dynamics Simulations, Library manual, in preparation*
- Nilsson L & Karplus M (1986), Empirical energy functions for energy minimization and dynamics of nucleic acids, *J. Comp. Chem.*, **7**, 591-616.

- Pathria RK (1985), *Statistical Mechanics*, Pergamon Press, Oxford.
- Pethig R (1979), *Dielectric and Electronic Properties of Biological Materials*, John Wiley & Sons, New York.
- Petrich JW, Chang MC, McDonald DB, and Fleming GR (1983), On the origin of nonexponential fluorescence decay in tryptophan and its derivatives, *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 3824-3832.
- Ponder JW & Richards FM (1987), Tertiary templates for proteins. Use of packing criteria in the enumeration of allowed sequences for different structural classes, *J. Mol. Biol.*, **193**, 775-791.
- Press WH, Vetterling WT, Teukolsky SA, and Flannery BP (1992), *Numerical Recipes in Fortran*, 2d ed., Cambridge University Press.
- Ramachandran GN, Ramakrishnan C, and Sasisekharan V (1963), Stereochemistry of polypeptide chain configurations, *J. Mol. Biol.*, **7**, 95-99.
- Reitz JR, Milford FJ e Christy RW (1982), *Fundamentos da Teoria Eletromagnética*, Editora Campus Lt, Rio de Janeiro.
- Richardson JS & Richardson DC (1989), Principles and patterns of protein conformation, in *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation*, Ed. by Gerald D. Fasman, Plenum Press, New York.
- Rogers NK (1989), The role of electrostatic interactions in the structure of globular proteins, in *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation*, Ed. by Gerald D. Fasman, Plenum Press, New York.
- Rooman MJ, Kocher J-PA, and Wodak SJ (1991), Prediction of protein conformation based on seven structure assignments, *J. Mol. Biol.*, **221**, 961-979.
- Rosenblatt M, Beaudette NV, and Fasman GD (1980), Conformational studies of the synthetic precursor-specific of preproparathyroid hormone, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**, 3983-3987.
- Ross JBA, Wyssbroard HR, Poter RA, Schwartz GP, Michaels CA, and Laws WR (1992), Correlations of triptophan fluorescence intensity decay parameters with ¹H NMR - determined rotamers conformations: [tryptophan²]oxytocin, *Biochemistry*, **31**, 1585-1594.
- Sawyer TK, Sanfilipo PJ, Hruby VJ, Engel MH, Heward CB, Burnett JB, and Hadley ME (1980), 4-Norleucine, 7-D-phenylalanine- α -melanocyte-stimulating hormone: A highly potent α -melanotropin with ultralong biological activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77(10)**, 5754-5758.
- Schmidt MW, Baldrige KK, Boatz JA, Elbert ST, Gordon MS, Jensen JH, Koseki S, Matsunaga N, Nguyen KA, Su SJ, Windus TL, Dupuis M, and Montgomery JA (1993), *J. Com. Chem.*, **14**, 1347-1363.
- Sharp KA (1994), Electrostatic interactions in macromolecules, *Cur. Op. Srtuc. Biol.*, **4**, 234-239.
- Sipl M (1990), Calculation of conformational ensembles from potential of mean force. An approach to the knowledge-based prediction of local structures in globular proteins, *J. Mol. Biol.*, **213**, 859-883.
- Snel MME, Kroon AIPM, and Marsh D (1995), Mitochondrial presequence inserts differently into membranes containing cardiolipin and phosphatidylglycereol, *Biochemistry*, **34**, 3605-3613.
- Sugg EE, Castrucci AML, Hadley ME, van Binst G, and Hruby VJ (1988), Cyclic lactan analogues of Ac-[Nle⁴] α -MSH₄₋₁₁-NH₂, *Biochemistry*, **27**, 8181-8188.
- Sung S-S (1994), Helix folding simulations with various initial conditions, *Biophysical J.*, **66**, 1796-1803.
- Swaminathan R, Krishnamoorthy G, and Periasamy N (1994), Similarity of fluorescence lifetime distributions for single triptophan proteins in the random coil state, *Biophys. J.*, **67**, 2013-2023.
- Szabo AG & Rayner DM (1980), Fluorescence decay of tryptophan conformers in aqueous solution, *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 9270-9278.
- Taylor JW & Kaiser ET (1986), The structural characterization of β -endorphin and related peptide hormones and neurotransmitters, *Pharmacol. Rev.*, **38(4)**, 291-319.
- Taylor JW & Kaiser ET (1987), Structure-function analysis of proteins through the design, syntesis and study of peptide models, *Meth. Enz.*, **154**, 473-498.
- van Belle D (1992), *Computer Studies of Electronic Polarization Effects in Biological Systems*, Tese de Doutorado, Universidade Livre de Bruxelas, Bélgica.

- van Gunsteren WF & Berendsen HJC (1987), *Groningen Molecular Simulation (GROMOS) Library Manual*, Biomos, Groningen.
- van Gunsteren WF & Berendsen HJC (1990), Computer simulation of molecular dynamics: methodology, applications and perspectives in chemistry, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **29**, 992-1023.
- van Gunsteren WF, Luque FJ, Timms D and Torda AE (1994), Molecular mechanics in biology: from structure to function, taking account of solvation, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **23**, 847-863.
- Verlet L (1967), Computer 'experiments' on classical fluids I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules, *Phys. Rev.*, **159**, 98-103.
- Voet D & Voet JG (1990), *Biochemistry*, John Wiley & Sons, New York.
- Wang Z, Jones JD, Rizo J and Gierasch LM (1993), Membrane-bond conformation of a signal peptide: a transferred nuclear Overhauser effect analysis, *Biochemistry*, **32**, 13991-13999.
- Weiner SJ, Kollman PA, Case DA, Singh UC, Ghio C, Alagone G, Profeta SJ, and Weiner P (1984), A new force field for molecular simulation of nucleic acid and proteins, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 765-784.
- Weiner SJ, Kollman P, Nguyen DT, and Case D (1986), An all atom force field for simulations of proteins and nucleic acids, *J. Comp. Chem.*, **7**, 230-252.
- Wiberg KB (1965), A scheme for strain energy minimization. Application to the cycloalkanes, *J. Am. Chem. Soc.*, **87** (5), 1070-1078.

Apêndice-A Coordenadas, ligações e cargas atômicas para o triptofano (arquivo de entrada "trp.IN").

molecula: triptofano (antiX2g+)
MECANICA MOLECULAR
MD HOOK FTHET FDHP FDHI FVDW COULOMB

```

.1000000000 Valor inicial do passo DELTA-X usado na minimizacao.
.0000100000 Valor da precisao no calculo do potencial.
.0000000000 Posicao da interface no eixo X.
80.0000000000 Valor de EPSLON1, correspondente ao meio aquoso.
2.0000000000 Valor de EPSLON2, correspondente ao meio apolar.
1  H  3.47747  -1.95887  -1.59791  3  0  0  0  0  0  .248  2H  INI  0
2  H  2.49418  -1.92043  -.31870  3  0  0  0  0  0  .248  3H  INI  0
3  NL  2.54666  -1.97427  -1.29246  1  2  4  5  0  0  .129  N  TRP  1
4  H  2.23592  -2.85200  -1.58402  3  0  0  0  0  0  .248  1H  TRP  1
5  CH1  1.78646  -.91332  -2.00885  3  6  17  0  0  0  .127  CA  TRP  1
6  CH2  .27771  -1.14213  -1.79926  5  7  0  0  0  0  .000  CB  TRP  1
7  CB  -.21057  -1.04886  -.32155  6  8  9  0  0  0  -.140  CG  TRP  1
8  CR51  .02239  -1.88818  .65487  7  10  0  0  0  0  .000  CD1  TRP  1
9  CB  -.94057  -.07121  .26351  7  12  13  0  0  0  .000  CD2  TRP  1
10 NR5*  -.51688  -1.49649  1.80856  8  11  12  0  0  0  -.050  NE1  TRP  1
11  H  -.46384  -1.93195  2.73640  10  0  0  0  0  0  .190  HE1  TRP  1
12  CB  -1.15538  -.34457  1.60086  9  10  14  0  0  0  .000  CE2  TRP  1
13  CR61  -1.52898  1.03026  -.44036  9  15  0  0  0  0  .000  CE3  TRP  1
14  CR61  -2.03783  .45061  2.33617  12  16  0  0  0  0  .000  CZ2  TRP  1
15  CR61  -2.40306  1.83752  .32137  13  16  0  0  0  0  .000  CZ3  TRP  1
16  CR61  -2.62987  1.56094  1.69239  14  15  0  0  0  0  .000  CH2  TRP  1
17  C  2.21517  .53544  -1.82574  5  18  19  0  0  0  .270  C  TRP  1
18  OM  1.94345  1.06987  -.74958  17  0  0  0  0  0  -.635  O  TRP  1
19  OM  2.64362  1.16414  -2.84999  17  0  0  0  0  0  -.635  OXT  TRP  1
0  XXXX  0.00000  0.00000  0.00000  0  0  0  0  0  0  0.000

```

VELOCIDADES APOS A DINAMICA MOLECULAR

```

1  H  25.28828  4.18129  5.04510
2  H  4.72704  6.39863  10.58678
3  NL  5.07626  5.51143  -8.75521
4  H  13.61323  5.82527  -.25389
5  CH1  .84878  3.65659  -3.97250
6  CH2  -.11025  3.52343  -7.54867
7  CB  -3.61886  -4.04717  .54293
8  CR51  2.91537  -4.90476  -1.30143
9  CB  3.11310  -2.89009  2.12650
10 NR5*  3.58088  -6.06034  -3.85442
11  H  9.84792  -2.47258  -23.20363
12  CB  3.48301  -5.03461  2.74116
13  CR61  -1.01825  -.89884  6.97340
14  CR61  -.71486  -3.42041  5.78256
15  CR61  -1.64549  -3.44586  6.86972
16  CR61  -3.07056  -3.41955  7.07224
17  C  -2.92918  10.93414  -8.49117
18  OM  -2.07300  -.62445  1.31563
19  OM  -6.62963  8.03401  1.71416

```

As duas primeiras linhas do arquivo de entrada ".IN" acima são para comentários. A terceira e quarta linha são para comandos: MD para simulação de Dinâmica Molecular; HOOK para o cálculo das forças de Hooke; FTHET para as forças envolvendo os ângulos θ ; FDHP para as forças diedrais próprias; FDHI para as

impróprias; FVDW para as de Van der Waals; e COULOMB para as eletrostáticas. Outros comandos são: OTMZ para a otimização de geometria; ANIL para o *annealing*; INTERFACE para uma interface água-membrana; MEMBRANE para as interfaces água-membrana-água; XSUPER para traçar o perfil de potencial; e INTERNAL para a entrada em coordenadas internas (tabela abaixo). As linhas seguintes são: o valor do deslocamento nas coordenadas para iniciar a otimização de geometria; o fator de convergência ΔV para o término da otimização; a posição da interface água-membrana no eixo X quando se usa o comando INTERFACE ou MEMBRANE (no caso desse último a segunda interface é colocada automaticamente a 30 ângstrons a direita da primeira); e os valores para as constantes dielétricas para o meio aquoso e apolar. As colunas são: o número I de cada átomo; o símbolo atômico do GROMOS; as coordenadas X, Y e Z, a matriz de conectividade; as cargas parciais; os símbolos PDB para átomos e resíduos aminoácidos; e o número do resíduo aminoácido. Nesse mesmo arquivo aparecem em seguida as componentes das velocidades de cada átomo, armazenadas juntamente com as coordenadas em uma dinâmica anterior. No arquivo de entrada em coordenadas internas abaixo, as colunas significam: o símbolo GROMOS; a distância r , o ângulo θ e a torção ϕ com relação aos átomos nas colunas seguintes respectivamente; as cargas parciais; e a matriz de conectividade.

```

molecula: triptofano (antiX2g+) em coordenadas internas
MECANICA MOLECULAR
INTERNAL OTMZ HOOK FTHET FDHP FDHI FVDW COULOMB

.1000000000 Valor inicial do passo DELTA-X usado na minimizacao.
.0000000001 Valor da precisao no calculo do potencial.
.0000000000 Posicao da interface no eixo X.
80.0000000000 Valor de EPSLON1, correspondente ao meio aquoso.
2.0000000000 Valor de EPSLON2, correspondente ao meio apolar.
H .000 0 .00 0 .00 0 0 0 0 .248 3 0 0 0
H 1.630 0 .00 0 .00 0 1 0 0 0 .248 3 0 0 0
NL .999 0 35.43 0 .00 0 2 1 0 0 .129 1 2 4 5
H 1.001 0 110.35 0 119.97 0 3 2 1 0 .248 3 0 0 0
CH1 1.478 0 109.96 0 240.51 0 3 2 1 0 .127 3 6 17 0
CH2 1.540 0 111.05 0 50.35 0 5 3 2 0 .000 5 7 0 0
CB 1.537 0 114.95 0 57.29 0 6 5 3 0 -.140 6 8 9 0
CR51 1.337 0 127.22 0 100.05 0 7 6 5 0 .000 7 10 0 0
CB 1.383 0 129.57 0 273.80 0 7 6 5 0 .000 7 12 13 0
NR5* 1.344 0 111.75 0 175.33 0 8 7 6 0 -.050 8 11 12 0
H 1.000 0 124.97 0 179.80 0 10 8 7 0 .190 10 0 0 0
CB 1.334 0 110.05 0 359.83 0 10 8 7 0 .000 9 10 14 0
CR61 1.412 0 127.07 0 4.22 0 9 7 6 0 .000 9 15 0 0
CR61 1.410 0 135.33 0 180.72 0 12 10 8 0 .000 12 16 0 0
CR61 1.411 0 117.86 0 180.53 0 13 9 7 0 .000 13 16 0 0
CR61 1.412 0 118.22 0 179.10 0 14 12 10 0 .000 14 15 0 0
C 1.545 0 114.90 0 179.63 0 5 3 2 0 .270 5 18 19 0
OM 1.255 0 119.65 0 280.51 0 17 5 3 0 -.635 17 0 0 0
OM 1.252 0 116.06 0 105.35 0 17 5 3 0 -.635 17 0 0 0
#### .000 0 .00 0 .00 0 0 0 0 0 .000 0 0 0 0

```

Apêndice-B Tabelas de parâmetros para o triptofano
(arquivo de entrada "trp.TOP").

PARAMETROS PARA O POTENCIAL DE HOOKE (I-J, atomos, Kb, b(0))

1) --	1	3		H - NL	895.0000	1.0000
2) --	2	3		H - NL	895.0000	1.0000
3) --	3	4		NL - H	895.0000	1.0000
4) --	3	5		NL - CH1	900.0000	1.4700
5) --	5	6		CH1 - CH2	800.0000	1.5300
6) --	5	17		CH1 - C	800.0000	1.5300
7) --	6	7		CH2 - CB	800.0000	1.5300
8) --	7	8		CB - CR51	1000.0000	1.3300
9) --	7	9		CB - CB	1000.0000	1.3900
10) --	8	10		CR51 - NR5*	1000.0000	1.3300
11) --	9	12		CB - CB	1000.0000	1.3900
12) --	9	13		CB - CR61	1000.0000	1.3900
13) --	10	11		NR5* - H	895.0000	1.0000
14) --	10	12		NR5* - CB	1000.0000	1.3300
15) --	12	14		CB - CR61	1000.0000	1.3900
16) --	13	15		CR61 - CR61	1000.0000	1.3900
17) --	14	16		CR61 - CR61	1000.0000	1.3900
18) --	15	16		CR61 - CR61	1000.0000	1.3900
19) --	17	18		C - OM	1000.0000	1.2500
20) --	17	19		C - OM	1000.0000	1.2500

PARAMETROS PARA O POTENCIAL THETA (I-J-K, atomos, Ktheta, THETA(0))

1) --	1	3	2	H - NL - H	80.0000	109.0000
2) --	1	3	4	H - NL - H	80.0000	109.0000
3) --	1	3	5	H - NL - CH1	90.0000	109.0000
4) --	2	3	4	H - NL - H	80.0000	109.0000
5) --	2	3	5	H - NL - CH1	90.0000	109.0000
6) --	4	3	5	H - NL - CH1	90.0000	109.0000
7) --	3	5	6	NL - CH1 - CH2	110.0000	109.5000
8) --	3	5	17	NL - CH1 - C	110.0000	109.5000
9) --	6	5	17	CH2 - CH1 - C	110.0000	109.5000
10) --	5	6	7	CH1 - CH2 - CB	110.0000	111.0000
11) --	6	7	8	CH2 - CB - CR51	100.0000	126.0000
12) --	6	7	9	CH2 - CB - CB	100.0000	126.0000
13) --	8	7	9	CR51 - CB - CB	100.0000	108.0000
14) --	7	8	10	CB - CR51 - NR5*	100.0000	108.0000
15) --	7	9	12	CB - CB - CB	100.0000	120.0000
16) --	7	9	13	CB - CB - CR61	100.0000	120.0000
17) --	12	9	13	CB - CB - CR61	100.0000	120.0000
18) --	8	10	11	CR51 - NR5* - H	90.0000	126.0000
19) --	8	10	12	CR51 - NR5* - CB	100.0000	108.0000
20) --	11	10	12	H - NR5* - CB	90.0000	126.0000
21) --	9	12	10	CB - CB - NR5*	100.0000	108.0000
22) --	9	12	14	CB - CB - CR61	100.0000	120.0000
23) --	10	12	14	NR5* - CB - CR61	100.0000	132.0000
24) --	9	13	15	CB - CR61 - CR61	100.0000	120.0000
25) --	12	14	16	CB - CR61 - CR61	100.0000	120.0000
26) --	13	15	16	CR61 - CR61 - CR61	100.0000	120.0000
27) --	14	16	15	CR61 - CR61 - CR61	100.0000	120.0000
28) --	5	17	18	CH1 - C - OM	120.0000	117.0000
29) --	5	17	19	CH1 - C - OM	120.0000	117.0000
30) --	18	17	19	OM - C - OM	120.0000	126.0000

PARAMETROS PARA O POTENCIAL DIEDRAL IMPROPRIO (I-X-Y-L, atomos, Kchi, CHI(0))

1) --	3	5	2	1	NL - X - Y - H	80.0000	35.2644
2) --	3	5	1	4	NL - X - Y - H	80.0000	35.2644
3) --	17	5	18	19	C - X - Y - OM	40.0000	0.0000

4)	--	5	3	17	6	CH1 - X - Y -	CH2	80.0000	35.2644
5)	--	7	8	9	6	CB - X - Y -	CH2	40.0000	0.0000
6)	--	9	7	8	10	CB - X - Y -	NR5*	40.0000	0.0000
7)	--	12	9	7	8	CB - X - Y -	CR51	40.0000	0.0000
8)	--	7	8	10	12	CB - X - Y -	CB	40.0000	0.0000
9)	--	7	9	12	10	CB - X - Y -	NR5*	40.0000	0.0000
10)	--	9	12	10	8	CB - X - Y -	CR51	40.0000	0.0000
11)	--	10	8	12	11	NR5* - X - Y -	H	40.0000	0.0000
12)	--	9	12	13	7	CB - X - Y -	CB	40.0000	0.0000
13)	--	12	9	14	10	CB - X - Y -	NR5*	40.0000	0.0000
14)	--	13	9	12	14	CR61 - X - Y -	CR61	40.0000	0.0000
15)	--	9	12	14	16	CB - X - Y -	CR61	40.0000	0.0000
16)	--	12	9	13	15	CB - X - Y -	CR61	40.0000	0.0000
17)	--	12	14	16	15	CB - X - Y -	CR61	40.0000	0.0000
18)	--	9	13	15	16	CB - X - Y -	CR61	40.0000	0.0000
19)	--	13	15	16	14	CR61 - X - Y -	CR61	40.0000	0.0000

PARAMETROS PARA O POTENCIAL DIEDRAL PROPRIO (X-J-K-Y, atomos, Kfhi, DELTA, Nminimos)

1)	--	5	6	7	9	X -	CH2 -	CB -	Y	0.1000	0.0000	6 *
2)	--	17	5	3	1	X -	CH1 -	NL -	Y	0.9000	0.0000	3 *
3)	--	18	17	5	3	X -	C -	CH1 -	Y	0.1000	0.0000	6 *
4)	--	3	5	6	7	X -	CH1 -	CH2 -	Y	1.4000	0.0000	3 *

VIZINHOS EXCLUIDOS NO CALCULO DE VAN DER WAALS E COULOMB (I, Nexcluidos, vizinhos)

1	4	3	2	4	5	
2	3	3	4	5		
3	4	4	5	6	17	
4	1	5				
5	5	6	7	17	18	19
6	4	17	7	8	9	
7	5	8	10	9	12	13
8	4	9	10	11	12	
9	5	12	10	14	13	15
10	3	11	12	14		
11	1	12				
12	3	13	14	16		
13	2	15	16			
14	2	16	15			
15	1	16				
16	0					
17	2	18	19			
18	1	19				
19	0					

MASSAS ATOMICAS (I, codigo atomico, atomo, massa atomica)

1	18	H	1.00800
2	18	H	1.00800
3	7	NL	14.00670
4	18	H	1.00800
5	12	CH1	13.01900
6	13	CH2	14.02700
7	17	CB	12.01100
8	15	CR51	13.01900
9	17	CB	12.01100
10	9	NR5*	14.00670
11	18	H	1.00800
12	17	CB	12.01100
13	16	CR61	13.01900
14	16	CR61	13.01900
15	16	CR61	13.01900
16	16	CR61	13.01900
17	11	C	12.01100
18	2	OM	15.99940
19	2	OM	15.99940

Apêndice-C Tabela de dados para a Dinâmica Molecular

PARAMETROS REFERENTES AO CALCULO MD

10.0000	TEMPER	: Temperatura (Kelvin) inicial p/ Termalizacao.
10.0000	DELTA_T	: Incremento na Temperatura.
30.0000	TEMPSCAL	: Re-escalona as veloc. quando $T - T_0 > \text{TempScal}$.
300.0000	TEMPERMAX	: Temperatura maxima.
0.0005	HTIME	: Incremento no tempo de integracao em ps.
20000000	NSTEP	: Numero de passos no calculo MD.
50	ISCALING	: Limite para re-escalonamento das velocidades.
0	INVEL	: Zero utiliza MB, outro N veloc. anteriores.

TEMPER é a temperatura inicial para o sorteio das velocidades. Ela sofre o incremento de DELTA_T por picosegundo até atingir a temperatura máxima TEMPERMAX. TEMPER é ainda a temperatura de referência T_0 . TempScal é o desvio permitido na temperatura do sistema, acima do qual as velocidades são corrigidas. HTIME é o passo de tempo e NSTEP é o número total de passos da dinâmica. A multiplicação de HTIME por NSTEP dá o tempo total de dinâmica, em picosegundos, que se pretende simular. ISCALING é o número de passos em cada ciclo sobre o qual são calculadas as energias cinética e potencial do sistema. Quando INVEL é igual a zero as velocidades atômicas são escolhidas a partir da distribuição de Maxwell-Boltzmann, sendo sorteadas as direções e sentidos dos movimentos. Outro valor, diferente de zero, para INVEL faz o programa ler as velocidades armazenadas o arquivo “.IN” (Apêndice-A).