

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

JOANA PAULINO

**Estudos Conformacionais de Peptídeos**  
**Correspondentes à Região N-terminal das Toxinas**  
**Protéicas Esticolisinas I e II**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

06/07/2010

JOANA PAULINO

Estudos Conformacionais de Peptídeos  
Correspondentes à Região N-terminal das Toxinas  
Protéicas Esticolisinas I e II

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Química da Universidade de São Paulo para  
obtenção do Título de Mestre em Ciências  
(Bioquímica).

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Shirley Schreier

São Paulo

2010

Joana Paulino

*Estudos Conformacionais de Peptídeos Correspondentes à Região N-terminal das  
Toxinas Protéicas Esticolisinas I e II*

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Química da Universidade de São Paulo para  
obtenção do Título de Mestre Ciências  
(Bioquímica).

Aprovado em: \_\_\_\_\_

**Banca Examinadora**

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Á meus pais, Luís e Roseli.**

## AGRADECIMENTOS

Ao iniciar esta seção fiquei muito feliz em constatar que tenho muitas pessoas a quem agradecer. Inicialmente, gostaria de agradecer a meus pais, por todo o amor e apoio que sempre me deram; por serem, um exemplo de profissionais competentes, apaixonados pelo trabalho. Eu os agradeço por terem me dado uma educação privilegiada, por sempre colocarem minha minhas necessidades a frente das deles, e por terem me proporcionado uma vida cheia de momentos e lembranças felizes. Todas as minhas conquistas dedico a eles.

Gostaria também de agradecer a todos as minhas grandes amigas, minha irmã Helenira, minhas amigas Ana Carolina, Luciana, Teresa, Bruna, Carol, Clarice, Paula e Daniela, por sempre estarem ao meu lado. Em especial gostaria de agradecer a Ana, que me ajudou na montagem final da dissertação; a ela e a Luciana gostaria de agradecer muito por serem minhas melhores amigas, por sempre me apoiarem, sem elas a pós graduação não teria sido a mesma coisa.

Desde o início da minha vida científica, em 2005, como iniciação científica no LBE, conheci muitas pessoas maravilhosas com as quais aprendi e me diverti muito. Lembro das boas gargalhadas que dava com o Fábio, da viagem para Montevideo, das SBBq com sua cachaça preferida. O LBE vai me dar muitas saudades. Vou sentir falta do jeito quieto do Zé Carlos, vou sentir saudade do jeito perdido do Iris, do silêncio da Nélida, da Estelinha, e das piadinhas do Paulo. No LBE também conheci pessoas que me auxiliaram no desenvolvimento de minha vida científica, o professor Carlos, a professora Marilyn da Universidade de Havana, e a Uris, aluna de doutorado sanduíche, com a qual compartilho o projeto. A eles agradeço pelas

discussões sobre ciência, cultura e a vida. Gostaria de aproveitar para fazer um agradecimento especial ao Gustavo, sem ajuda dele essa dissertação não teria a mesma qualidade, ele foi um bom amigo e um aluno de iniciação científica dedicado.

Ao longo dos anos fiz amigos em muitos outros laboratórios, gostaria de agradecer especialmente ao grupo da professora Iolanda Cuccovia, a Katia e a Márcia, por sempre me receberem de braços abertos, seja para pedir algum reagente emprestado ou apenas para conversar sobre a vida.

Gostaria de agradecer as agências financiadoras, ao CNPq agência que me financiou desde os tempos da iniciação científica, A FAPESP e a CAPES, pelo suporte aos projetos do laboratório.

Minha jornada na ciência está apenas começando, e sinto que comecei bem. Gostaria de agradecer à professora Shirley Schreier pelos cinco anos de dedicação ao meu desenvolvimento como cientista. Posso dizer que aprendi muito mais que ciência. Levarei lições valiosas para o resto da minha vida. Apesar de nem sempre ter sido fácil, gostaria de agradecer a professora Shirley por sempre esperar mais de mim, por sempre confiar a mim tarefas importantes e sempre ter confiado nas minhas habilidades durante todos esses anos. Gostaria de agradecer por toda ajuda para que eu conseguisse ser aprovada para fazer meu doutorado no laboratório do Professor Tim Cross, sem suas sugestões e cartas de recomendação não teria conseguido atingir esse objetivo.



## RESUMO

Paulino, J. **Estudos Conformacionais de Peptídeos Correspondentes à Região N-terminal das Toxinas Protéicas Esticolisina I e II**. 2010. 150p. Dissertação Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Esticolisinas I e II (St I e St II), citolisinas pertencentes à família das actinoporinas, da anêmona *Stichodactyla heliantus*, formam poros em membranas biológicas e modelo onde seu receptor putativo é esfingomielin (SM). A ligação das actinoporinas a membranas ocorre pelo ancoramento da proteína à interface lipídio-água, por uma região rica em resíduos aromáticos. Evidências apontam para o papel fundamental da região N-terminal para formação do poro. O mecanismo proposto para a formação do poro consiste na ligação da toxina à interface membrana-água, oligomerização, e dissociação da região N-terminal do corpo da proteína, cuja  $\alpha$ -hélice anfipática interage com a bicamada, levando à formação de um poro toroidal. Estudos com peptídeos correspondentes à região N-terminal de St II e equinatoxina II (Eq II) mostraram que estes fragmentos adquirem conformação em  $\alpha$ -hélice na presença de membranas modelo, possuindo a capacidade de formar poros em membranas biológicas e modelo, mimetizando o comportamento desta região nas proteínas. St I e St II, que possuem 93% de identidade, apresentam atividades hemolíticas distintas, sendo St II mais ativa. Estudos mostraram que fragmentos da região N-terminal de St I e St II possuem atividades hemolíticas diferentes, e que os primeiros dez resíduos de St II tem papel importante na lise, e na agregação. Para compreender a nível molecular a interação entre o N-terminal das toxinas com membranas e sua dependência da composição lipídica, foram realizados estudos de dicroísmo circular (CD) e ressonância paramagnética eletrônica (EPR) da interação

de quatro fragmentos da região N-terminal de St I (St I<sub>1-31</sub> e S t I<sub>12-31</sub>) e St II (St II<sub>1-30</sub> e St II<sub>11-30</sub>) com membranas modelo - bicamadas e micelas.

A interação peptídeo-membrana mostrou-ser dependente: da sequência, e da composição lipídica. Espectros de CD mostraram que a ligação dos peptídeos promove aquisição de estrutura helicoidal; em solução os peptídeos possuem essencialmente estrutura ao acaso. O efeito da ligação dos peptídeos sobre a organização molecular dos lipídios foi monitorado por EPR. Os espectros de EPR mostraram que a ligação a bicamadas e micelas leva ao aumento da organização molecular dos lipídios, St II<sub>1-30</sub> alterando o empacotamento molecular em maior extensão. A incorporação de lipídios negativamente carregados e de lipídios formadores de microdomínios ordenados aumentou a afinidade dos peptídeos pelas membranas modelo, especialmente em proporções molares onde ocorre a formação desses microdomínios. Os resultados também indicaram que apenas St II<sub>1-30</sub> promoveu alterações significativas no espectro de um marcador de spin fosfolipídico marcado em C16 da cadeia acila incorporado em vesículas multilamelares (MLV), sugerindo que apenas este peptídeo penetra na bicamada, enquanto que os demais permanecem preferencialmente na interface.

Os peptídeos interagiram de forma diferente com micelas e bicamadas, provavelmente devido a diferenças no empacotamento molecular nos dois sistemas. A interação diferencial dos peptídeos com bicamadas e micelas poderia refletir as interações com a membrana em diferentes etapas da formação do poro toroidal. Considerando a curvatura positiva na parede de um poro toroidal, a interação com micelas poderia estar mimetizando a topografia desse ambiente.

**Palavras Chave:** Dicroísmo Circular, Ressonância Paramagnética eletrônica, Membranas Modelo, Esticolisinas, peptídeos.

## ABSTRACT

Paulino, J. **Estudos Conformacionais de Peptídeos Correspondentes à Região N-terminal das Toxinas Protéicas Esticolisina I e II.** 2010. 150p. Masters Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Sticholysins I and II (St I and St II), belong to the actinoporins family and are produced by the anemone *Stichodactyla heliantus*. The toxins form pores in biological and model membranes, their putative receptor being sphingomyelin (SM). Binding of actinoporins to membranes occurs *via* anchoring of an aromatic amino acid-rich region to the lipid-water interface. Evidences point to the importance of the N-terminal region for pore formation. The mechanism proposed for pore formation consists of toxin binding to the membrane-water interface, oligomerization, and dissociation of the N-terminus from the body of the protein. Next, the amphipathic  $\alpha$ -helix in this region interacts with the bilayer, forming a toroidal pore. Studies of peptides from St II and equinatoxin II (Eqtx II) N-terminus showed that they acquire  $\alpha$ -helical conformation upon binding to model membranes and form pores in biological and model membranes, thereby mimicking the conformational and functional behavior of this region in the proteins. St I and St II (93% identity) display different hemolytic activity, St II being more active. Studies showed that fragments of St I and St II N-terminus also display different hemolytic activity, and that the first ten residues of St II play an important role for lysis and peptide aggregation. In order to understand at the molecular level the N-terminus-membrane interaction, as well as its dependence on lipid composition, circular dichroism (CD) and electron paramagnetic resonance (EPR) studies of the interaction between four fragments of St I (St I<sub>1-31</sub> and St I<sub>12-31</sub>) and St II (St II<sub>1-30</sub> and St II<sub>11-30</sub>) with model membranes – bilayers and micelles - were performed.

The interaction was found to depend on peptide sequence, and lipid composition. CD spectra showed that peptide binding promotes acquisition of helical structure. The effect of binding on lipid molecular organization was monitored by EPR. EPR spectra showed that peptide binding to bilayers and micelles leads to an increase of membrane molecular organization, St II<sub>1-30</sub> being more effective. Incorporation of negatively charged lipids and of lipids that ordered microdomains increased peptide affinity for model membranes, especially when they were present at molar proportions known to originate such microdomains. It was found that only St II<sub>1-30</sub> promoted significant alterations in the spectra of a phospholipid spin-labeled at C16 incorporated in multilamellar vesicles, (MLV), suggesting that while this peptide penetrates in the bilayer, the others remain preferentially at the interface.

The peptides interaction with micelles was both qualitatively and quantitatively different than that with bilayers, electrostatic interactions playing a lesser role in this case. One important reason for the observed differences is probably due to differences in molecular packing in both types of aggregates. The differential interaction with bilayers and micelles could reflect the interaction with membranes indifferent steps of toroidal pore formation. Taking into account the positive curvature of a toroidal pore, the interaction with micelles could represent a model for peptide and lipid organization in the toroidal pore

**Key words:** Circular Dichroism, Electron Paramagnetic Resonance, Model Membranes, Sticholysins, Peptides.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1 Toxinas Protéicas Esticolisinas I e Esticolisina II e a família das Actinoporinas.....	16
1.2 Mecanismo de Formação do Poro pelas Actinoporinas.....	20
1.3 Actinoporinas e Microdomínios Lipídicos.....	21
1.4 Estudos de peptídeos correspondentes à região N-terminal de actinoporinas.....	29
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	32
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	33
3.1 Materiais.....	33
3.1.1 Peptídeos.....	33
3.1.2 Reagentes.....	34
3.1.3 Lipídios e Marcadores de Spin.....	34
3.1.4 Soluções Estoque.....	36
3.2 Métodos.....	36

3.2.1	Preparação das vesículas.....	36
3.2.2	Obtenção dos espectros.....	37
3.3	Dicroísmo Circular .....	38
3.4	Cálculo das constantes de Ligação .....	41
3.5	Ressonância Paramagnética Eletrônica .....	43
3.5.1	Introdução a técnica de EPR .....	43
3.5.2	Método do Marcador de Spin.....	45
3.5.3	Ressonância Paramagnética Eletrônica de Radicais Nitróxido.....	47
3.5.4	Análise dos espectros de EPR.....	60
3.6	Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo.....	61
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>63</b>
4.1	Estudos Conformacionais.....	63
4.1.1	Peptídeos em Solução.....	63
4.1.2	Interação com SUV.....	70
4.1.2.1	SUV zwitteriônicas de POPC.....	70

4.1.2.2 SUV contendo o fosfolipídio negativamente carregado POPA.....	71
4.1.2.3 SUV contendo o esfingofosfolipídio SM.....	74
4.1.2.4 SUV contendo DPPC, um fosfolipídio formador de fase ordenada.....	84
4.1.3 Interação com Micelas.....	87
4.1.3.1 Micelas do lisofosfolipídio zwitteriônico LPC.....	87
4.1.3.2 Micelas contendo o lisofosfolipídio negativamente carregado LPA.....	89
4.2 Efeito da interação peptídeo-membrana na organização molecular de bicamadas e micelas - Estudos de EPR.....	91
4.2.1 Interação dos peptídeos com multibicamadas (MLV)...	91
4.2.1.1 Estudos com o marcador de spin 5-MeSL.....	92
4.2.1.2 Estudo com o marcador 5-PCSL.....	100
4.2.1.3 Estudos com o marcador 16-PCSL.....	104
4.2.2 Efeito do conteúdo de SM e de DPPC na interação com St II <sub>1-30</sub> .....	109

4.2.3 Interação dos peptídeos com micelas.....	113
4.3 Estudo da interação de St II <sub>1-30</sub> com micelas de LPC por Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo.....	117
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>123</b>
5.1 Aquisição de estrutura $\alpha$ -helicoidal como indicador qualitativo da ligação a membranas modelo.....	126
5.2 A ligação a bicamadas e micelas promove alteração na organização molecular dos lipídios .....	131
5.3 Efeito da Carga.....	132
5.4 Efeito de SM.....	135
5.5 Efeito da coexistência de fases.....	136
5.6 Ligação a micelas – possível modelo do poro toroidal.....	139
5.7 Implicações para o mecanismo de ação das toxinas.....	143
<b>6.REFERÊNCIAS.....</b>	<b>147</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Toxinas Protéicas Esticolisinas I e Esticolisina II e a família das Actinoporinas

As toxinas protéicas esticolisina I e esticolisina II (St I e St II), com 176 e 175 resíduos, da anêmona marinha *Stichodactyla heliantus*, pertencem à família das actinoporinas (Lanio et al., 2001, Huerta et al., 2001).

A família das actinoporinas é caracterizada por proteínas com alto grau de homologia, com 60 a 85% de identidade e 70 a 95% de similaridade entre sequências (Alegre-Cebollada et al., 2007a), solúveis em água, com peso molecular entre 18 e 20 kDa, ricas em aminoácidos básicos, e sem cisteína em sua sequência primária. Essas toxinas formam poros em membranas biológicas e modelo (Lanio et al., 2001; Anderluh e Macek, 2002). A família é composta quase que predominantemente por toxinas de anêmonas marinhas; mais de 30 actinoporinas já foram descritas (Alegre-Cebollada et al., 2007a). Equinatoxina II (Eq II), de *Actinia equina* (Ferlan et al., 1974) e St II são as mais estudadas. O isolamento de uma toxina hemolítica da saliva do gastrópode marinho *Monoplex echo*, com alto grau de similaridade com as sequências das actinoporinas (Kawashima et al., 2003), e grande similaridade entre as estruturas terciárias das actinoporinas e de lectinas isoladas de fungos (Birck et al., 2004) indicam que as actinoporinas poderiam pertencer a uma superfamília de proteínas que se ligam a membranas (Gutiérrez-Aguirre et al., 2006).

St I e St II são toxinas com 93% de homologia, com substituição de apenas 13 resíduos de aminoácidos, sendo três modificações não conservadas na porção N-

terminal (Glu2/Ala1, Asp9/Ala8, Gly23/Glu22). Apesar da grande identidade entre St I e St II, as proteínas possuem atividade hemolítica significativamente diferente, 21.700 unidades de hemólise (UH)/mg e 30.000 UH/mg, respectivamente, sendo St II a mais hemolítica de todas as actinoporinas (Lanio et al., 2001). St II e Eqt II possuem 66% de homologia (Huerta et al., 2001), a maior parte das modificações concentrando-se também no N-terminal, região menos conservada das actinoporinas (Huerta et al., 2001). A atividade hemolítica de St II é 4 a 5 vezes maior do que a de Eqt II (Cilli et al., 2007). Foi proposto que a diferença entre as atividades hemolíticas de St I, St II e Eqt II é resultado das diferenças entre as regiões N-terminais dessas toxinas (Cilli et al., 2007).

Uma das características mais importantes das actinoporinas é a alta afinidade por esfingomielina (SM). Foi observado que a lise de membranas por estas proteínas sofre um aumento expressivo na presença de SM. Em 1976, Bernheimer e Avigard (Bernheimer e Avigard, 1976) verificaram que a lise de eritrócitos por esticolisinas era inibida pela pré-incubação com SM, e que eritrócitos tratados com esfingomielinase se tornavam resistentes à lise. O estudo da liberação de fluoróforos encapsulados em vesículas lipídicas por St II (de los Rios et al., 1998) e Eqt II (Belmonte et al., 1993) mostrou que estas toxinas não promovem a liberação da sonda fluorescente na ausência SM.

A resolução da estrutura cristalina (Athnasiadis et al., 2001) e em solução (Hinds et al., 2002) da Eqt II, bem como a resolução da estrutura cristalina da St II (Mancheño et al., 2003) revelaram que as proteínas apresentam conformação em forma de uma estrutura rígida de sanduíche de folhas  $\beta$ , empacotadas contra duas  $\alpha$ -hélices, uma próxima ao C-terminal da proteína e a outra na região N-terminal

(figura 1). Esse motivo estrutural é considerado característico da família das actinoporinas (Norton, 2009). A recente atribuição dos deslocamentos químico dos resíduos nos espectros de NMR de St I (Castrillo et al., 2009a) sugere que esta toxina possui arranjo estrutural análogo ao de St II e Eqt II.

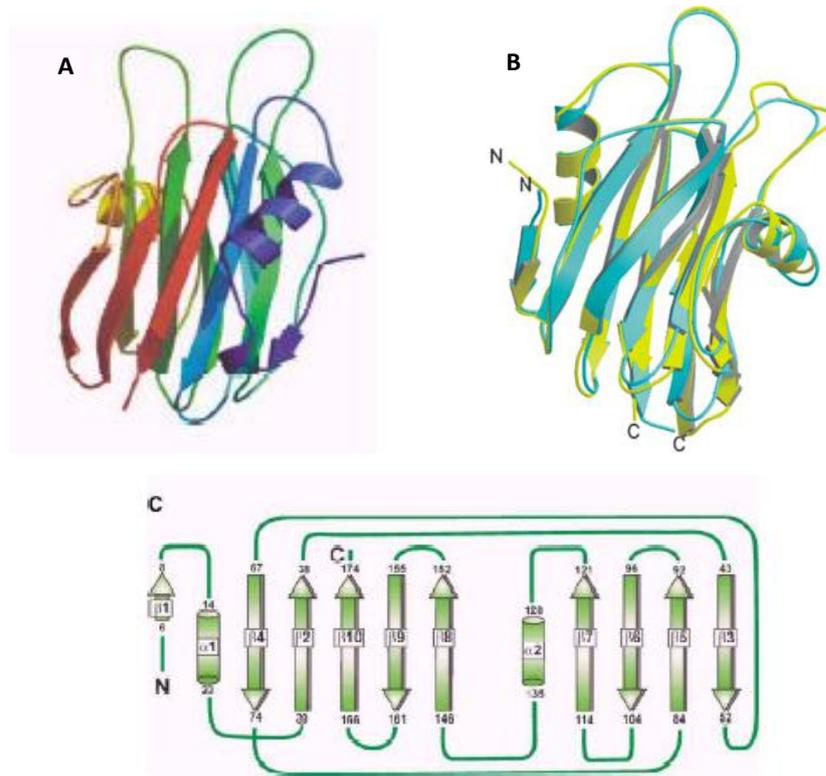


Figura 1. (A) Estrutura de St II obtida por cristalografia de raios – X, (B) superposição das estruturas de St II (amarelo) e Eqt II (ciano), (C) arranjo estrutural de St II (Mancheño et al., 2003).

A estrutura cristalográfica de St II (Mancheño et al., 2003) revelou a existência de um sítio de ligação para fosfocolina (POC) (figura 2A), a cabeça polar de fosfatidilcolina e esfingomiéline. O sítio de ligação é formado pela cadeia lateral dos resíduos Ser54, Val87, Ser105, Pro107, Tyr133, Tyr137 e Tyr138, resíduos altamente conservados na família das actinoporinas, como mostrado na figura 2B, (Anderluh e Macek, 2002).

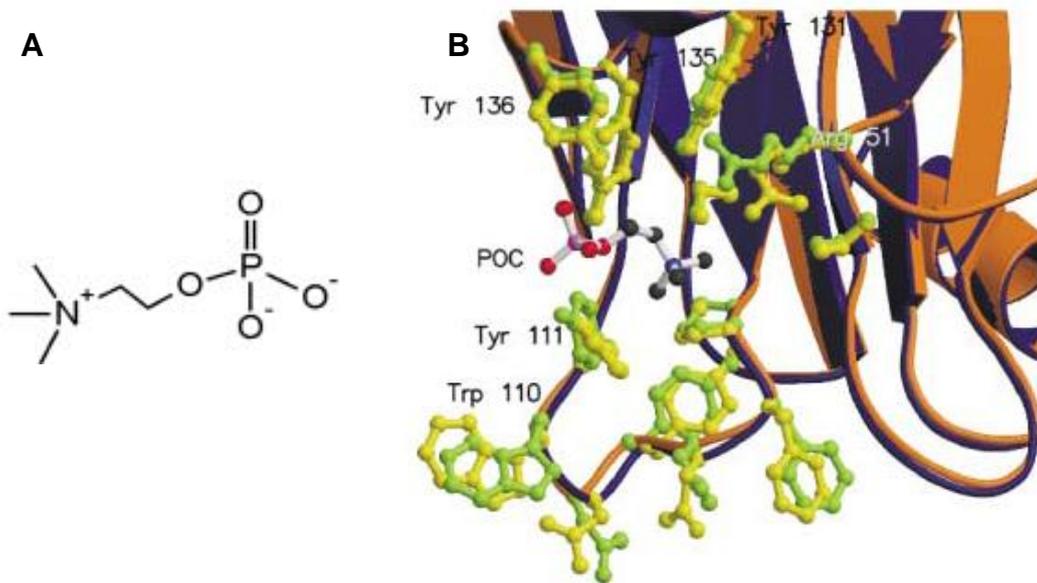


Figura 2. (A) Estrutura da fosfocolina (POC). (B) Sítio de ligação de POC na St II e rearranjo de resíduos devido à ligação de POC. Superposição da estrutura na ausência de POC (laranja) e da obtida pela co-cristalização de St II-POC (azul). Em verde, posição dos resíduos no estado não ligado e em amarelo, posição dos resíduos no estado ligado à POC (Mancheño et al., 2003).

Estudos de ressonância magnética nuclear (NMR) de  $^{19}\text{F}$ , onde o  $^{19}\text{F}$  estava presente em resíduos de triptofano da Eqt II, mostraram que a interação da toxina com SM leva a alterações nos deslocamentos químicos dos resíduos Trp112 e Tyr113, vizinhos à região do sítio de ligação da POC e considerados importantes para o contato inicial da toxina com membranas (Anderluh et al., 2005). Essas alterações não são observadas na presença de membranas compostas apenas por fosfatidilcolina, evidenciando que estes resíduos possuem papel importante no reconhecimento de SM. Ainda, a atribuição dos deslocamentos químicos dos resíduos nos espectros de NMR de dois mutantes de St II com capacidade reduzida de se ligar a bicamadas e promover lise (St II Y111N e St II R29Q), sugere que, apesar da estrutura terciária das proteínas não sofrer modificação, alterações são observadas na região que conecta as fitas  $\beta_3$  e  $\beta_4$  do sanduíche de folhas  $\beta$  (Castrillo

et al., 2009b; Pardo-Cea et al., 2010). O reconhecimento específico de SM por Eqt II também foi evidenciado por dot-blot de lipídios, quando se observou que Eqt II se ligou especificamente a SM de duas fontes naturais, mas não a 1,2-dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), 1,2-dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), 1,2-dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), ceramida de cérebro de porco, cerebrosídeos contendo os grupos glicosil e galactosil e gangliosídeos de cérebro de ovelha (Bakrac et al., 2008). Neste mesmo estudo também foi observado que a ligação de Eqt II a um análogo solúvel de SM, N-acetil-D-eritro-esfingosilfosforilcolina (Ac-SM), promove alterações na estabilidade térmica da proteína.

## **1.2 Mecanismo de Formação do Poro pelas Actinoporinas**

A formação do poro transmembranar pelas actinoporinas se inicia pela ligação das toxinas à interface da bicamada lipídica. A resolução das estruturas de Eqt II e St II mostrou a existência de uma região rica em resíduos aromáticos bastante expostos ao ambiente aquoso, Tyr106, Trp110, Tyr111, Trp114, Tyr 131, Tyr135 e Tyr 136 em St II (Mancheño et al., 2003) e Tyr108, Tyr110, Trp112, Tyr113, Tyr137 e Tyr 138 em Eqt II (Athanasiadis et al., 2001; Hinds et al., 2002). Esses resíduos são altamente conservados na maioria das actinoporinas (Alegre-Cebollada et al., 2007a; Álvarez et al., 2009). Vale notar que a afinidade de resíduos aromáticos pela interface de membranas lipídicas é bastante conhecida (Killian e von Heijne, 2000).

Estudos de mutação sítio dirigida mostraram que os resíduos Trp116/117 de Eqt II estão envolvidos diretamente na interação com membranas (Malovrh et al., 2000); o resíduo Trp116 se encontra parcialmente exposto ao ambiente aquoso e posicionado vizinho ao agrupamento de resíduos aromáticos expostos (Athanasiadis

et al., 2001). Também foi observado que a substituição dos resíduos Ser105, Ser114 e Arg144 por cisteína impedem a ligação de Eqt II à bicamada lipídica (Anderluh et al., 1999). Esses resíduos muito possivelmente estão envolvidos com a interação inicial entre as toxinas e as membranas.

Como mencionado anteriormente, os resíduos Ser54, Val87, Ser105, Pro107, Tyr133, Tyr137 e Tyr138 de St II formam o sítio de ligação para a POC. A carga positiva da colina é estabilizada por interações com os elétrons  $\pi$  dos resíduos aromáticos Tyr111 e Tyr135, enquanto o grupo fosfato interage com os grupos hidroxila destes resíduos; o resíduo Arg51 também está envolvido na estabilização do grupo fosfato (Mancheño et al., 2003). Assim, a ligação das actinoporinas a membranas lipídicas ocorreria inicialmente pela interação do agrupamento de resíduos aromáticos expostos e de resíduos carregados positivamente com a interface da membrana; posteriormente, haveria uma ligação específica das toxinas com SM. Estudos de dicroísmo circular (CD) e infra-vermelho com transformada de Fourier (FTIR) da ligação de St I e St II a bicamadas lipídicas sugerem que a ligação das toxinas promove um ganho de estrutura secundária, foi verificado um aumento de 5% do conteúdo de  $\alpha$ -hélice e de 6% de folhas  $\beta$  (Álvarez et al., 2003; Menestrina et al., 1999, Alegre-Cebollada et al., 2007b).

A região N-terminal das actinoporinas também se mostrou crucial para a formação do poro. O duplo mutante de Eqt II no qual o N-terminal foi ligado covalentemente ao corpo da proteína gerou uma toxina que, apesar de se ligar a bicamadas, não promove o vazamento do conteúdo de vesículas lipídicas (Hong et al., 2002). A introdução de resíduos de Cys por mutação sítio-dirigida em diferentes posições de Eqt II e a ligação de uma sonda fluorescente sensível à polaridade a

estes resíduos mostrou que, além da região dos resíduos aromáticos, a região N-terminal também penetra na membrana (Anderluh et al., 1999). A deleção da região N-terminal de Eqt II também inibiu a lise de eritrócitos (Anderluh et al., 1997).

A resolução das estruturas da St II (Mancheño et al., 2003) e da Eqt II (Athanasiadis et al., 2001; Hinds et al., 2002) indica que a região N-terminal das toxinas, onde parte dos resíduos formam uma  $\alpha$ -hélice anfipática, poderia se mover, desfazendo seus contatos nativos com o corpo da proteína, sem alterar a conformação geral da mesma. Na estrutura em solução a região hidrofóbica da hélice esta voltada para a face apolar do sanduiche de folhas  $\beta$ . Mecanismos propostos para a formação do poro por actinoporinas sugerem que as etapas iniciais consistiriam no ancoramento das toxinas e na oligomerização destas na bicamada lipídica.

Estudos cinéticos de vazamento de membranas modelo e a resolução do cristal bidimensional de St II em monocamadas de dioleoilfosfatidilcolina indicam que pelo menos 4 monômeros seriam necessários para a formação do poro (Tejuca et al., 1996; de los Rios et al., 1998; Mancheño et al., 2003). Etapas posteriores envolveriam a dissociação da região N-terminal do corpo da proteína, a interação da hélice anfipática com a interface da bicamada e sua penetração na membrana, formando o poro (Malovrh et al., 2003; Gutierrez-Aguirre et al., 2004; Kristan et al., 2004, 2007). O modelo proposto para a formação do poro está de acordo com o que foi observado por microscopia eletrônica de alta resolução de um cristal bidimensional de St II em monocamadas lipídicas: a densidade eletrônica obtida acomoda somente a região do sanduiche de folhas  $\beta$ , tendo sido proposto que a região N-terminal se dissocia do corpo da proteína e interage com a membrana

(figura 3A, Mancheño et al., 2003). A figura 3 mostra a densidade eletrônica de alta resolução obtida para o tetrâmero de St II, bem como um modelo de como a proteína estaria ligada à membrana.

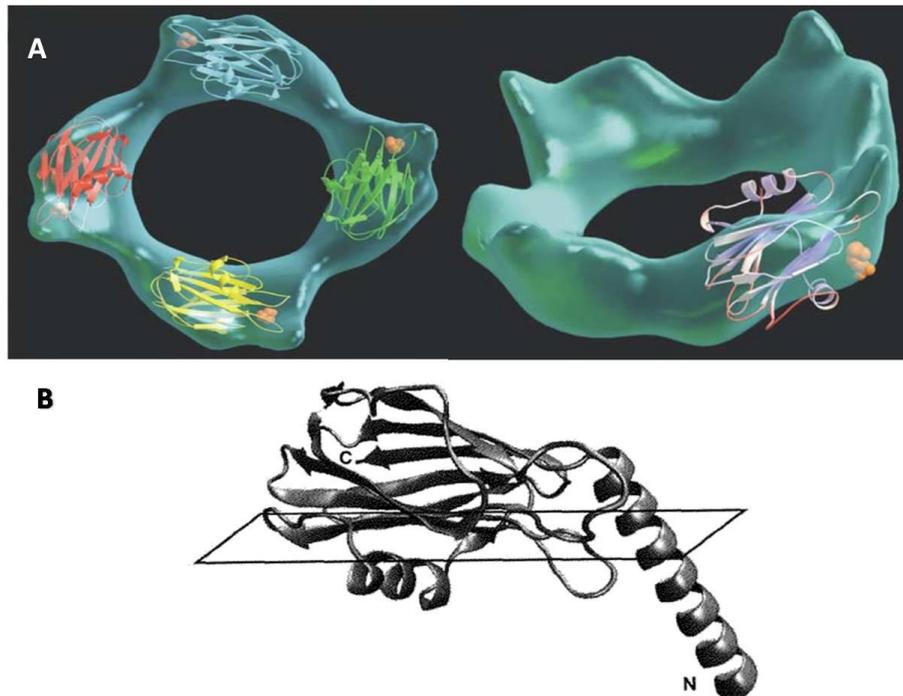


Figura 3. (A) Modelo do tetrâmero da St II obtido por microscopia eletrônica de alta resolução (Mancheño et al., 2003), (B) Conformação hipotética de St II no estado de formação do poro (Alegre-Cebollada et al., 2007a).

Estudos com St I e fosfolipídios marcados com sondas fluorescentes mostraram que as toxinas induzem o movimento transmembranar de fosfolipídios (flip-flop) (Valcárcel et al., 2001). Por outro lado, experimentos de NMR de  $^{31}\text{P}$  com a Eqt II na presença de vesículas multilamelares (multilamellar vesicles, MLV) mostraram a formação de estruturas não-lamelares (Anderluh et al., 2003). Esses resultados estariam de acordo com a formação de um poro toroidal, no qual a parede do poro seria formada tanto pela região N-terminal das toxinas quanto pela cabeça polar dos lipídios (figura 4). Neste poro, a face hidrofílica da  $\alpha$ -hélice formaria

o lúmen do poro e a face hidrofóbica estaria voltada para o interior hidrocarbônico da estrutura.

Estudos de vazamento de membranas modelo por Eqt II e St II na presença de protetores osmóticos de tamanhos variados indicaram a formação de um poro com raio hidrodinâmico de cerca de 1 nm (Tejuca et al., 2001; Macek et al., 1994). O modelo de formação do poro toroidal estaria de acordo com a proposição de que apenas a região N-terminal de cerca de quatro monômeros das toxinas formaria a parede de um poro com o raio hidrodinâmico de cerca de 1 nm.

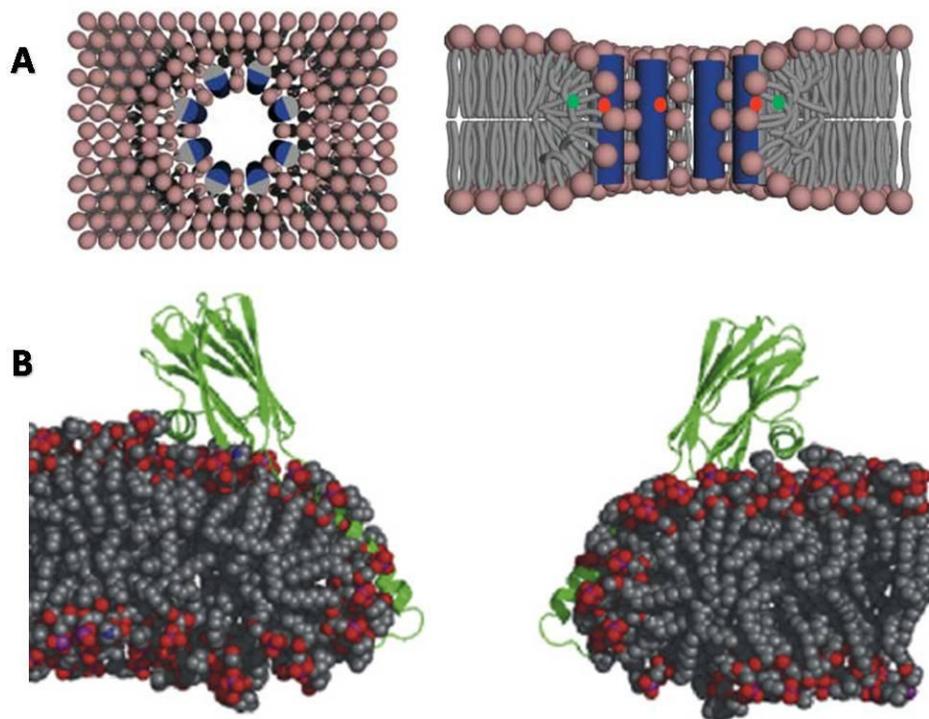


Figura 4. (A) Modelo geral de um poro toroidal formado por um peptídeo antimicrobiano, o cilindro corresponde a uma hélice anfipática na qual a metade em azul corresponde a face polar e a metade em cinza a face hidrofóbica da hélice (Toke et al., 2004), (B) Modelo estrutural de um poro toroidal formado pela Eqt II (Kristan et al., 2009).

### 1.3 Actinoporinas e Microdomínios Lipídicos

A ligação de St II e Eqt II com membranas modelo mostrou-se dependente da presença de SM na bicamada. Estudos da interação de St II com bicamadas contendo SM e colesterol (Col) mostraram que tanto a ligação, quanto a lise de vesículas lipídicas carregadas com sonda fluorescente foram maiores na presença de composições ternárias de fofatidilcolina-SM-Col (Martínez et al, 2007), conhecidas por apresentarem distribuição heterogênea dos lipídios na bicamada formando microdomínios (Goñi et al., 2008). Ainda, estudos de microscopia de epifluorescência e microscopia confocal da interação de Eqt II com membranas modelo mostraram que a formação de poros por esta toxina é dependente da presença de coexistência de fases na bicamada e, também, que Eqt II se localiza na interface entre estas fases (Barlic et al., 2004; Schön et al., 2008).

A segregação de lipídios em membranas levando à formação de microdomínios (lipid rafts – balsas lipídicas) foi proposta para explicar a distribuição diferencial de glicoesfingolipídios (GSL) e proteínas ancoradas a glifofatidilinositol (GPI) na face apical de células epiteliais polarizadas (Simons e van Meer, 1988). Estudos da solubilização de membranas biológicas por Triton X-100 indicaram que fragmentos ricos em esfingolipídios, nos quais proteínas ancoradas por GPI foram colocalizadas, não eram solubilizados pelo detergente, principalmente na presença de colesterol (Hoessli e Rugger-Brandle, 1985; Hooper e Turner, 1988; Brown e Rose, 1992). Fragmentos lipídicos de centenas de nanômetros, de razão molar glicerofosfolipídios:esfingolipídios:Col de 1:1:1 foram isolados em frações de baixa densidade, por centrifugação em gradiente de glicose (Brown e Rose, 1992; Edidin, 2003). A presença destes domínios lipídicos em membranas foi relacionada também à

modulação da atividade de proteínas (Lingwood et al., 2009), por exemplo, a ativação de linfócitos por proteínas ancoradas a GPI e a formação de complexos sinalizadores junto a balsas lipídicas (Edidin, 2003).

A utilização de técnicas não invasivas de alta definição indicou a existência de domínios lipídicos de tamanhos inferiores a 10 nm, com tempo de vida menor do que 1 ms (Edidin, 2003). Atualmente, a definição mais aceita para as balsas lipídicas é que estas são microdomínios lipídicos dinâmicos, ricos em esteróis e esfingolípídios, que se associam e dissociam rapidamente, podendo esta associação ser mediada por proteínas de membrana (Lingwood et al., 2009). Além da importância das ligações de hidrogênio entre esfingolípídios para a formação de domínios em membranas, proposição inicial de Simons e van Meer para a segregação de GSL na face apical de células epiteliais polarizadas (Simon e van Meer, 1988), estudos mostraram que diferenças no empacotamento molecular dos lipídios são essenciais para a formação das balsas lipídicas (Brown e London, 1998a,b).

De maneira bastante geral, lipídios de membranas biológicas podem ser agrupados em três classes, com temperaturas de transição de fase ( $T_m$ ) diferentes: glicerofosfolípídios (baixa  $T_m$ ), esfingolípídios (alta  $T_m$ ) e colesterol. O enriquecimento dos microdomínios lipídicos em esfingolípídios e colesterol atribui características diferentes a estes domínios em relação ao restante da membrana, como por exemplo, a resistência à solubilização por Triton X-100 e a maior ordem molecular dos lipídios no domínio (Ahmed et al., 1997; Schroeder et al., 1998).

A organização molecular de bicamadas lipídicas se altera com a variação da temperatura. Para sistemas formados por apenas um lipídio, em temperaturas abaixo da  $T_m$ , característica de cada lipídio, bicamadas lipídicas encontram-se em uma fase

ordenada (fase gel  $S_o$ ). Acima da  $T_m$ , as bicamadas se encontram em uma fase na qual as cadeias acila estão fluidas e desordenadas (fase líquido-cristalina  $L_c$  ou líquido-desordenada  $L_d$ ) (figura 5). Misturas binárias de lipídios com diferentes  $T_m$  podem apresentar coexistência entre fases gel ( $S_o$ ), e desordenada ( $L_d$ ). Quando um dos componentes encontra-se em baixa concentração, a mistura é uniforme, acima de uma concentração limite ocorre a separação de fase - um processo cooperativo - e fases  $S_o$  e  $L_d$  coexistem (Brown e London, 1998).

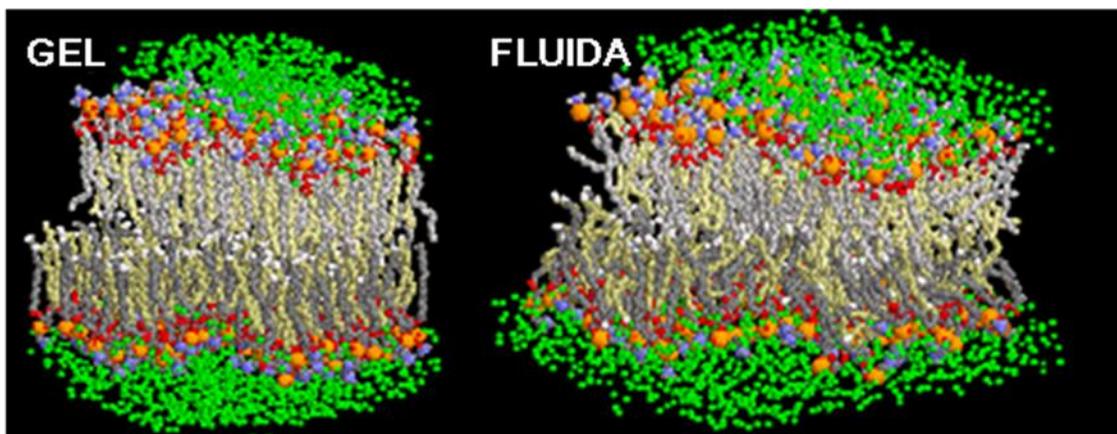


Figura 5. Simulação de dinâmica molecular de bicamadas de POPC nas fases gel e líquido cristalina (fluida) (Heller et al., 1993).

Apesar de a separação entre as fases  $S_o$  e  $L_d$  ser bem caracterizada em membranas modelo, a fase gel não parece existir em membranas biológicas, a não ser em casos pouco usuais (Parasassi et al., 1993). Contudo, a coexistência entre duas fases fluidas, líquido-ordenada ( $L_o$ ), dependente da presença de colesterol, e  $L_d$  foi descrita (Recktenwald e McConnell, 1981; Ipsen et al, 1987 e 1990; Sankaram e Thompson, 1991; Schroeder et al., 1994; Reyes Mateo et al, 1995). Na fase  $L_o$  as cadeias acila possuem características intermediárias entre as da fase gel e da fase líquido-desordenada (Ipsen et al, 1987, M'Baye et al., 2008).

Assim como em domínios enriquecidos em esfingolípídios como SM, dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC,  $T_m$  41 °C), quando na fase gel, também não é solubilizada por Triton X-100 (Ribeiro e Dennis, 1974; Schroeder et al., 1998). Apesar de DPPC ser um glicerofosfolípídio, sua alta  $T_m$  faz com que, à temperatura fisiológica, ela se encontre na fase  $S_o$ . Pelo fato de DPPC ser um lipídio de alta  $T_m$ , misturas binárias entre esse lipídio e Col foram largamente caracterizadas (Ipsen et al, 1987; Veatch e Keller, 2005; Bakht et al., 2007). Estudos de misturas ternárias de DPPC, Col, e fosfatidilcolinas de baixa  $T_m$  também foram descritos (Silvius et al, 1996).

#### **1.4 Estudos de peptídeos correspondentes à região N-terminal de actinoporinas**

Como é sabido, a resolução atômica da estrutura tri-dimensional de proteínas, principalmente de membrana, é bastante desafiadora devido a dificuldades na aplicação de técnicas de alta resolução (cristalografia de raios X e NMR) a essas proteínas.

Nesse contexto, a investigação da conformação e dinâmica de fragmentos protéicos tem sido uma abordagem alternativa. Similarmente ao que tem sido encontrado para proteínas globulares (Dyson et al., 1985, 1995), estudos sugerem que fragmentos de proteínas de membranas demonstram preferências conformacionais comparáveis à conformação predita ou resolvida para esses segmentos quando no conjunto da proteína (Pertinhez et al., 1995, 1997, 2002; Franzoni et al., 1997, 1999; Salinas et al., 2002; Yeagle e Albert, 2007).

Foi mostrado pelo nosso grupo que peptídeos correspondentes aos resíduos 1 a 30 (St II<sub>1-30</sub>) e 11 a 30 (St II<sub>11-30</sub>) da região N-terminal de St II adquirem estrutura em  $\alpha$ -hélice na presença do solvente indutor de estrutura secundária trifluoretanol

(TFE) e também possuem atividade lítica frente a eritrócitos, mimetizando assim o comportamento dessa região na toxina (Casallanovo et al., 2006). Estudos comparativos da atividade hemolítica de fragmentos N-terminais de St I e St II mostraram que as diferenças de atividade das proteínas são reproduzidas pelos peptídeos (Cilli et al., 2007). Enquanto a região contendo os resíduos 1-10 de St II é composta principalmente de aminoácidos hidrofóbicos, a mesma região em St I apresenta dois resíduos carregados negativamente Glu2 e Asp9, que lhes conferem carga negativa. A presença dos dez primeiros resíduos hidrofóbicos em St II e St II<sub>1-30</sub> foi correlacionada com a maior capacidade da proteína e do peptídeo de lisar eritrócitos. Esses resíduos também foram considerados responsáveis pela capacidade do peptídeo de se agregar em solução, uma vez que seu análogo mais curto (St II<sub>11-30</sub>), no qual os primeiros dez resíduos foram removidos, não apresenta esta propriedade (Casallanovo et al., 2006).

Estudos conformacionais de um peptídeo derivado da região N-terminal de Eqt II mostraram que, de maneira similar ao observado para St II<sub>11-30</sub>, esse peptídeo também adquire estrutura em  $\alpha$ -hélice na presença de TFE, micelas e bicamadas, assim como promove o vazamento do conteúdo de vesículas (Dreschsler et al., 2006; Drechsler et al., 2009; Lam et al., 2009). Estudos de NMR de estado sólido da região N-terminal de Eqt II em presença de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) mostraram que, enquanto os resíduos iniciais deste fragmento penetram no core hidrofóbico da bicamada (não muito profundamente) a região correspondente à  $\alpha$ -hélice anfipática se orienta paralelamente a bicamada e permanece na interface lipídio-água (Lam et al., 2009).

Para a elucidação a nível molecular do mecanismo de formação do poro, é de grande interesse o estudo da região N-terminal das toxinas e de suas propriedades conformacionais, tanto em solução como em presença de membranas - tanto modelo como biológicas - e ainda de seu papel na atividade biológica das toxinas. Nesse contexto, tem sido desenvolvido um projeto que enfoca as propriedades conformacionais e funcionais de peptídeos correspondentes às regiões N terminais de St I e St II (tabela 1, em Materiais e Métodos).

## 2. OBJETIVOS

Este projeto propõe estudar a capacidade de peptídeos correspondentes à região N-terminal de St I e St II de mimetizar as propriedades conformacionais das toxinas e compreender, no nível molecular, a interação desses fragmentos com membranas modelo. Estudos conformacionais dos peptídeos correspondentes à região N-terminal de St I e St II em solução e em presença de membranas modelo – micelas e bicamadas - foram realizados por meio do emprego da espectroscopia de CD. O efeito da interação peptídeos-membrana sobre a organização molecular de lipídios em membranas modelo foi estudado por EPR e espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS).

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1 Materiais**

##### **3.1.1 Peptídeos**

Os peptídeos estudados (Tabela 1) foram sintetizados pela técnica de síntese em fase sólida (Merrifield, 1963; Stewart e Young, 1984) através da metodologia Fmoc (Atherton e Sheppard, 1989) no laboratório do Prof. Dr. Eduardo M. Cilli, do Instituto de Química, UNESP-Araraquara.

Resumidamente, a síntese de peptídeos em fase sólida consiste basicamente no crescimento da cadeia peptídica no sentido C a N-terminal, adicionando-se um aminoácido de cada vez. A região C-terminal se encontra covalentemente ligada a uma matriz polimérica inerte, que pode ser: de poliestireno, poliamida, polietilenoglicol (PEG) ou híbrida poliestireno-PEG. Durante a síntese, o grupo  $\alpha$ -amino dos aminoácidos é protegido por meio da ligação com 9-Fluorenilmetilcarbonila (Fmoc) ou *t*-Butiloxicarbonila (Boc) (para a síntese dos peptídeos deste estudo foi utilizado o protetor Fmoc) e as cadeias laterais dos resíduos com os grupos: terc-butil (Tbut, resíduos: Ser, Glu, Asp, Thr); tritil (Trt, resíduo: Gln); 2,2,4,6,7-pentametil-dihidrobenzofurano-sulfonil (Pbf, resíduos: Arg); Boc (resíduo: Lys). A síntese consiste de uma série de ciclos de desproteção e acoplamento do amino-grupo terminal do resíduo *n* ao grupamento C-terminal do resíduo *n*+1.

Após cada etapa do processo de síntese – acoplamento e desproteção - a resina é submetida ao teste de ninidrina. A ninidrina, em altas temperaturas, reage com grupos amino livres, liberando um composto de coloração azul. Este teste é,

portanto, adequado para indicar a presença de grupos amino livres e, neste caso indicar a eficiência de cada passo de desproteção e acoplamento. Ao final da síntese, a cadeia peptídica é clivada da resina e os protetores das cadeias laterais removidos. O peptídeo sintetizado é isolado e passa por um processo de purificação no qual se emprega cromatografia líquida de fase reversa (RP-HPLC) acoplada a espectrometria de massa. A determinação do conteúdo peptídico é obtida pela análise de aminoácidos.

Tabela 1. Sequência dos peptídeos sintetizados para o presente estudo.

Proteína	Nome	Seqüência	Resíduos
St II	St II <sub>1-30</sub>	ALAGTIIAGASLTFQVLDKVL EELGKVS RK	1-30
St II	St II <sub>11-30</sub>	SLTFQVLDKVL EELGKVS RK	11-30
St I	St I <sub>1-31</sub>	SELAGTIIDGASLTFEVL DKVLGELGKVS RK	1-31
St I	St I <sub>12-31</sub>	SLTFEVL DKVLGELGKVS RK	12-31

### 3.1.2 Reagentes

Os sais utilizados para a preparação do tampão foram citrato de sódio, da J.T. Baker Chemicals Co., ácido bórico e fosfato de sódio dibásico, da Merck S.A..

### 3.1.3 Lipídios e Marcadores de Spin

Para preparação das vesículas e micelas foram utilizados, respectivamente, lipídios e lisofosfolipídios da Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama. Nos estudos de EPR foram empregados os marcadores de spin 5-MeSL da Sigma, 5-PCSL e 16-PCSL da Avanti Polar Lipids (Tabela 2).

Tabela 2. Estrutura dos lipídios, lisofosfolipídios e marcadores de spin utilizados.

Nome (Sigla)	Estrutura
1-Palmitoil-2-oleil-fosfatidilcolina (POPC):	
1,2-dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC):	
Esfingomiéline de cérebro (SM) <sup>#</sup> :	
Ácido 1-palmitoil-2-oleil fosfatídico (POPA):	
1-Palmitoil-2-hidroxi-fosfatidilcolina (LPC):	
Ácido 1-palmitoil-2-hidroxi fosfatídico (LPA):	
5-doxil estearato de metila (5-MeSL):	
1-palmitoil-2-estearoil-(5-doxil)-fosfatidilcolina (5-PCSL):	
1-palmitoil-2-estearoil-(16-doxil)-fosfatidilcolina (16-PCSL):	

<sup>#</sup> Estrutura predominante do lipídio natural obtido de cérebro de porco, de acordo com o fabricante. As sondas 5-MeSL, 5-PCSL e 16-PCSL possuem o motivo 2,2-dimetil-N-oxil-oxazolidina (doxil).

### **3.1.4 Soluções Estoque**

Soluções estoque dos peptídeos foram preparadas dissolvendo-os em água Milli-Q, de modo a obter uma solução de concentração final máxima 1 mM.

Soluções estoque 10 mM de lipídios e lisofosfolipídios foram preparadas em  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  na proporção 1:1 (vol:vol). A concentração das soluções foi determinada através da dosagem de fosfato pelo método de Rouser (Rouser et al., 1970). A solução dos marcadores de spin foi preparada em  $\text{CHCl}_3$  e sua concentração foi determinada por EPR, utilizando-se como padrão solução de 4-hidroxi-2,2,6,6-terametil piperidina 1-oxil (Tempol, Sigma Aldrich) em água.

## **3.2 Métodos**

### **3.2.1 Preparação das vesículas**

Para a preparação de vesículas multilamelares (multilamellar vesicles, MLV) ou unilamelares pequenas (small unilamellar vesicles, SUV) foram preparados filmes lipídicos. Colocou-se a solução orgânica dos lipídios desejados em um tubo de ensaio, o solvente foi evaporado sob fluxo de nitrogênio e o filme formado foi deixado sob vácuo por pelo menos 2 h para que todos os traços do solvente orgânico fossem eliminados.

Para a preparação de vesículas unilamelares pequenas (SUV), para estudos de CD, o filme lipídico foi ressuspensão em água MilliQ e a suspensão de MLV submetida a radiação ultrassônica em um equipamento Branson 450, com potência de 30 watts em ciclos de 1 min com pausas de 1 min durante um total de 30 min, ou até a amostra ficar translúcida. Centrifugou-se por 15 min a 10000 g para eliminar partículas de titânio da sonda na suspensão.

Para estudos de EPR foram obtidas MLV ressuspensando-se o filme lipídico em tampão fosfato-borato-citrato (PBC) 15 mM, pH 3,5.

Para os estudos de CD da interação dos peptídeos com micelas foram preparadas soluções de micelas a partir dos lisofosfolídeos em pó, dissolvendo quantidades apropriadas em água Milli-Q. Para os estudos de EPR foram preparados filmes lipídicos (como descrito anteriormente), a partir das soluções orgânicas dos lisofosfolídeos; as micelas foram obtidas ressuspensando os filmes em tampão PBC.

Foram preparadas bicamadas de composição POPC (100), POPC:POPA (90:10), POPC:SM (90:10), POPC:SM (50:50), POPC:SM:POPA (80:10:10), POPC:SM:POPA (75:15:10), POPC:DPPC (90:10), POPC:DPPC (50:50), DPPC (100) e SM (100), e micelas de composição LPC (100) e LPC:LPA (90:10), todas as composições são dadas na proporção mol:mol, esta informação não será repetida ao longo do texto.

Para a incorporação dos marcadores de spin, volumes apropriados das soluções clorofórmicas destes foram misturados às soluções orgânicas dos lipídios ou lisofosfolídeos durante a preparação do filme.

### **3.2.2 Obtenção dos espectros**

Espectros de CD dos peptídeos na ausência e presença de SUV ou micelas de várias composições lipídicas foram obtidos em um espectropolarímetro CD6 Jobin Yvon, na região do UV distante (200-260 nm). A concentração final de peptídeo foi de 5  $\mu$ M na presença de SUV ou de 12  $\mu$ M na presença de micelas.

Espectros de EPR foram obtidos em espectrômetro Bruker EMX-200 em frequências da ordem de 9.0 GHz. As concentrações de lipídio (3 mM) e peptídeo (300  $\mu$ M) foram mantidas constantes em todos os experimentos. Para garantir que os peptídeos se distribuíssem igualmente entre todos os compartimentos aquosos das MLV, essas foram ressuspensas no tampão PBC contendo peptídeo na concentração desejada.

Todos os espectros foram obtidos a temperatura ambiente,  $22 \pm 2^\circ$  C.

### **3.3 Dicroísmo Circular (Woody, 1996)**

A técnica de CD permite medir a absorção diferencial de luz circularmente polarizada à direita ou à esquerda por moléculas ou agregados assimétricos, como por exemplo moléculas que possuam um carbono quiral, ou que possuam assimetria estrutural (para o caso de macromoléculas como proteínas). A luz que incide na amostra contém quantidades iguais de luz circularmente polarizada à esquerda e à direita; ao passar pela amostra, uma das componentes é absorvida preferencialmente, gerando luz elipticamente polarizada. Uma das medidas de dicroísmo é a tangente do ângulo  $\theta$ , que mede o desvio da luz polarizada, ilustrado na figura 6; este ângulo normalmente é tão pequeno que sua tangente pode ser aproximada ao valor de  $\theta$  em radianos.

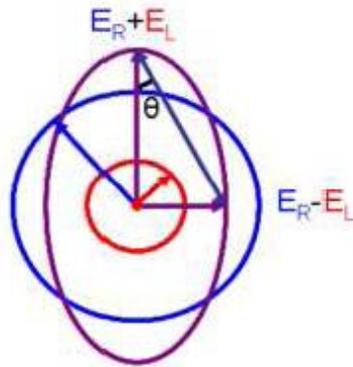


Figura 6. A luz polarizada circularmente está indicada em azul e a luz polarizada elípticamente em roxo.  $E_R$  e  $E_L$  são as componentes da luz polarizada à direita e à esquerda, respectivamente.

A medida de CD pode ser dada por um  $\Delta$  de absorção entre as quantidades de luz polarizada à direita e à esquerda, de acordo com a equação:

$$\Delta A = A_L - A_R \quad (\text{eq. 1}),$$

onde  $A_L$  é a absorção da componente de luz polarizada à esquerda e  $A_R$  a absorção da componente de luz polarizada à direita. Esta equação também pode ser escrita como:

$$\Delta A = \varepsilon_l C l - \varepsilon_r C l \quad (\text{eq. 2}),$$

sendo  $\varepsilon_l$  e  $\varepsilon_r$  os coeficientes de absorção molar para a luz polarizada à esquerda e à direita, respectivamente,  $C$  a concentração molar da molécula estudada e  $l$  o caminho óptico em cm. A partir da equação anterior escreve-se a relação:

$$\Delta A = \Delta \varepsilon C l \quad (\text{eq. 3}),$$

aqui  $\Delta \varepsilon$  é denominado o dicroísmo circular molar para uma molécula. Além destes dois tipos de medida ( $\Delta A$  e  $\Delta \varepsilon$ ) o CD também pode ser medido em elipicidade molar definida como:

$$[\theta] = 100 \theta / C l \quad (\text{eq. 4}).$$

Como discutido acima, o valor de  $\theta$  utilizado na verdade é sua tangente, mas por  $\theta$  ser bastante pequeno, o valor se aproxima do valor do ângulo em radianos, que é usado na equação.  $[\theta]$  é proporcional ao valor de dicroísmo pela relação  $[\theta] = 3298 \Delta\epsilon$ . As unidades de  $[\theta]$  são dadas em  $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ .

Proteínas e peptídeos são moléculas assimétricas, portanto, geram espectro de dicroísmo circular. O estudo de proteínas por CD se baseia na absorção de radiação ultra-violeta (UV) pela ligação peptídica. A luz UV circularmente polarizada terá suas componentes absorvidas diferencialmente de acordo com o conjunto de ângulos  $\Phi$  e  $\psi$  das ligações  $\text{C}\alpha - \text{N}$  e  $\text{C}\alpha - \text{C}$ , respectivamente (figura 7). Desta forma, o espectro de CD é dependente do conjunto de ângulos  $\Phi$  e  $\psi$  da proteína. Tais ângulos de torção (figura 7) são determinantes da estrutura secundária de proteínas; desta maneira, por meio do espectro de CD é possível caracterizar qualitativamente e quantitativamente a estrutura secundária de uma proteína ou peptídeo.

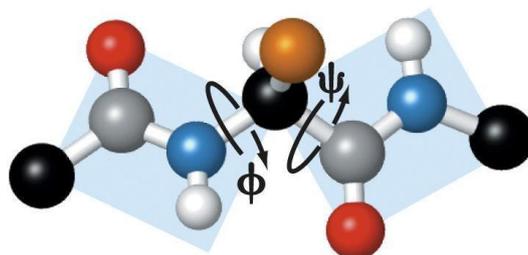


Figura 7. Representação esquemática de ligação peptídica, evidenciando os ângulos  $\Phi$  e  $\psi$ . Código de cores: preto = carbono  $\alpha$ ; cinza = carbono; azul = nitrogênio; branco = hidrogênio; laranja = cadeia lateral; vermelho = oxigênio.

Cada tipo de estrutura secundária, como  $\alpha$ -hélice, folha  $\beta$ , estrutura ao acaso, dá origem a espectros característicos. Espectros tópicos dessas conformações são mostrados na figura 8. Os espectros são ainda sensíveis à ocorrência de dobras.

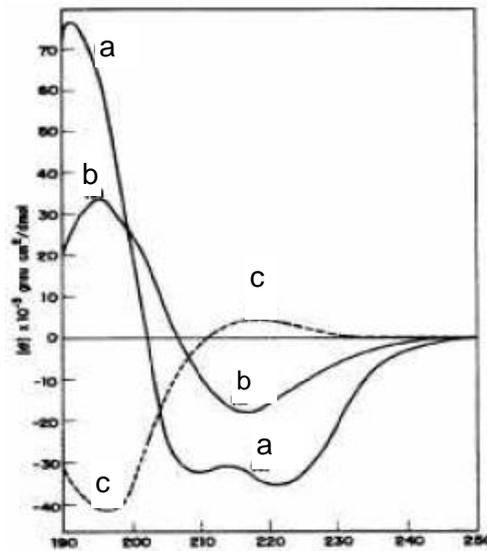


Figura 8. Espectros de CD da poli(Lys) em  $\alpha$ -hélice (a), folha  $\beta$  anti-paralela (b) e ao acaso (c) (tirado de Woody, 1996).

### 3.4 Cálculo das constantes de Ligação

A partir dos valores do módulo de  $[\theta]$  a 222 nm ( $|[\theta]_{222}|$ ) obtidos nos espectros de CD de St II<sub>1-30</sub>, St II<sub>11-30</sub>, St I<sub>1-31</sub> e St I<sub>12-31</sub>, foram calculadas as constantes de ligação (K) dos peptídeos a SUV e a micelas de diferentes composições lipídicas. No caso de St II<sub>11-30</sub>, St I<sub>1-31</sub> e St I<sub>12-31</sub> os valores de K foram obtidos pelo ajuste dos valores de  $\Delta[\theta]_{222}$  em função da concentração de lipídio total a uma curva hiperbólica (figura 9A), sendo  $\Delta[\theta]_{222}$  a diferença entre os valores de  $[\theta]_{222}$  nas várias concentrações de lipídio e  $[\theta]_{222}$  do peptídeo em solução. Para St II<sub>1-30</sub>, K foi obtido pelo ajuste dos valores de  $|[\theta]_{222}|$  em função da concentração de lipídio total a uma curva hiperbólica no caso da interação com SUV de POPC:POPA (90:10), POC:SM (90:10), e com micelas de LPC e LPC:LPA (90:10). No caso da interação de St II<sub>1-30</sub>

com SUV de POPC:SM:POPA (80:10:10) e POPC:SM:POPA (75:15:10), K foi obtido pelo ajuste dos valores de  $|\theta]_{222}|$  a uma sigmóide (figura 9B).

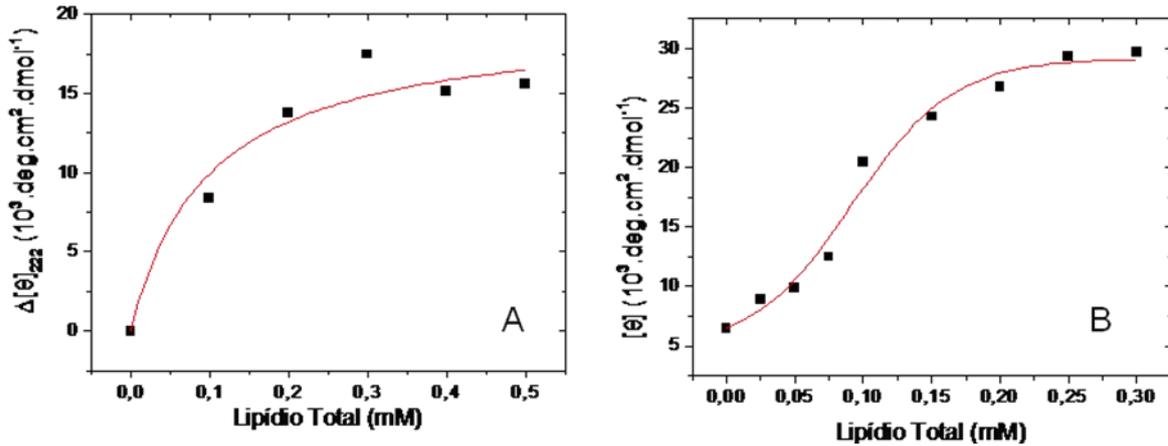


Figura 9. (A)  $\Delta[\theta]_{222}$  em função da concentração de lipídio obtido nos espectros de St II<sub>11-30</sub> na presença de SUV de POPC:SM:POPA (80:10:10), pH 7,0, ajustados a uma hipérbole. (B)  $[\theta]_{222}$  em função da concentração de lipídio obtido nos espectros de St II<sub>1-30</sub> na presença de SUV de POPC:SM:POPA (80:10:10), pH 7,0, ajustados a uma sigmóide.

A análise de uma hipérbole implica em uma estequiometria de ligação peptídeo:lipídio 1:1. Neste caso, a constante de ligação é o inverso da concentração lipídica quando  $|\theta]_{222}|$  é a metade do valor de  $|\theta]_{222}|$  máximo (na saturação). A obtenção dos valores de K a partir de curvas sigmóide foi feita pela equação de Hill,

$$\log\left(\frac{Y_{[\theta]_{222}}}{1 - Y_{[\theta]_{222}}}\right) = n \log[Lip] + \log K \quad (\text{eq. 5}),$$

onde  $Y_{[\theta]_{222}}$  é a fração de  $[\theta]_{222}$  considerando 100% o valor de  $[\theta]_{222}$  na saturação,  $\log[Lip]$  é o logarítmo da concentração de lipídio. K foi obtido do valor da intersecção

da reta do gráfico  $\log\left(\frac{Y_{[\theta]_{222}}}{1 - Y_{[\theta]_{222}}}\right)$  x  $\log[Lip]$  com o eixo x.

### 3.5 Ressonância Paramagnética Eletrônica

### **3.5.1 Introdução a técnica de EPR (Wertz e Bolton, 1972)**

A espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica é uma técnica que só pode ser aplicada a sistemas que possuem elétrons desemparelhados, ou seja, que possuem momento angular de spin diferente de zero. A técnica se baseia na interação do spin eletrônico com o componente magnético da radiação eletromagnética, ocorrendo a transição entre diferentes estados de spin. A transição é dependente do desdobramento do momento de dipolo magnético do elétron,  $\mu_e$ , em diferentes níveis de energia pela interação a um campo magnético externo,  $H$  (interação Zeeman), como mostra a figura 9. A condição de ressonância para que haja transição entre os dois níveis é obedecida quando  $h\nu = g\beta H = \Delta E$ , onde  $h$  é a constante de Plank,  $\nu$  é a frequência da radiação eletromagnética,  $H$  é o campo magnético,  $\beta$  o magnéton de Bohr e  $g$  para um elétron livre vale 2,00232. As transições entre os níveis de Zeeman envolvem a reorientação do spin eletrônico (figura 10). Essas transições envolvem radiação eletromagnética na frequência de microondas.

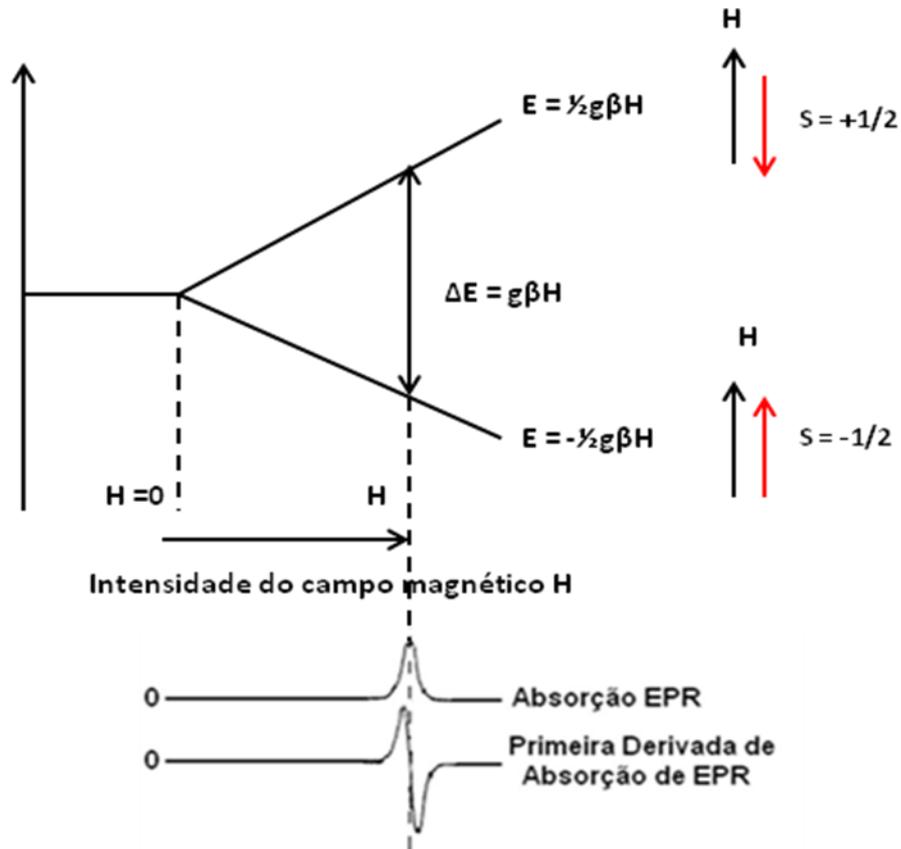


figura 10. Diagrama do desdobramento dos níveis de energia Zeeman na presença de um campo magnético  $H$ . A energia dos níveis é dada por  $E = \pm \frac{1}{2}g\beta H$ . À direita, a interação dos vetores campo magnético (preto) e momento de dipolo magnético de spin (vermelho). Abaixo do diagrama está representado o espectro de absorção, bem como a primeira derivada deste.

Ao contrário de muitas técnicas espectroscópicas, nas quais a frequência da radiação eletromagnética incidida na amostra é variada, na espectroscopia de EPR, por motivos de desenvolvimento da técnica, a frequência da radiação eletromagnética é fixa e o campo magnético é variado.

### 3.5.2 Método do Marcador de Spin

O termo marcador de spin (spin label) foi introduzido por H. M. McConnell (Stone et al., 1965; Griffith e McConnell, 1965; Berliner e McConnell, 1966; Boeyens e McConnell, 1966; Hubbell e McConnell, 1968) para descrever radicais livres estáveis utilizados como sondas. Através do espectro de EPR dessas sondas procura-se obter informação de caráter estrutural e dinâmico a respeito do sistema onde a molécula repórter se encontra.

Devido à sua grande estabilidade, radicais nitróxido tem sido extensamente empregados como sondas de spin. Os radicais nitróxidos podem ser covalentemente ligados a grupos funcionais específicos de moléculas ou podem ser intercalados em regiões de sistemas de interesse. Algumas estruturas de marcadores de spin bastante utilizados para o estudo de membranas estão apresentadas na figura 11. No presente estudo foram utilizadas sondas do tipo VI, com  $R=COOCH_3$  com o grupo doxil no carbono 5, e do tipo VII com o grupo doxil nos carbonos 5 ou 16.

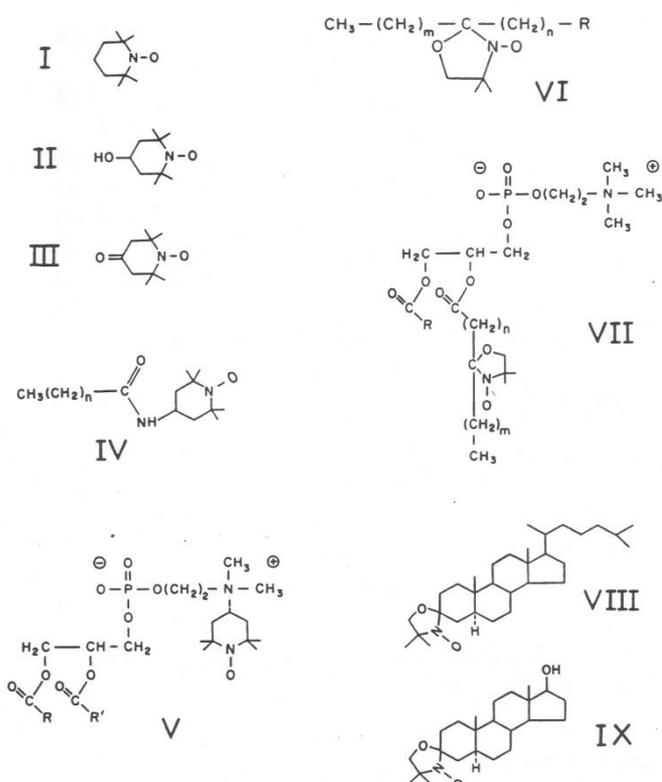


Figura 11. Estrutura de alguns marcadores de spin utilizados no estudo de membranas. I – Tempo, II Tempol, III – Tempona, IV – estrutura geral de N-Tempo amidas de ácidos graxos, V – fosfatidilcolina marcada na cabeça polar. VI – ácido esteárico ou seu éster metílico ( $R = \text{COOH}$  ou  $\text{COOCH}_3$ )  $m + n = 15$ , VII – fosfatidilcolina com a cadeia acila sn2 marcada com o grupamento doxil, VIII – 3-doxil-5 $\alpha$ -colestano (CSL), IX – 3-doxil-androstanol (Schreier et al., 1978).

A possibilidade de obter informações de natureza conformacional e dinâmica, especialmente a respeito de macromoléculas ou agregados moleculares reside no fato de a ressonância paramagnética eletrônica ser uma técnica que opera na região de microondas do espectro eletromagnético, o que corresponde à frequência de movimentos translacionais, rotacionais e (ou) segmentais das estruturas em estudo.

### 3.5.3 Ressonância Paramagnética Eletrônica de Radicais Nitróxido

Nitróxidos são radicais livres bastante estáveis (Hoffmann e Henderson, 1961; Boocock e Ullman, 1968), que possuem espectros de EPR sensíveis ao movimento molecular e à polaridade do ambiente (Stone et al., 1965). A estrutura geral de um radical nitróxido está representada na figura 12.

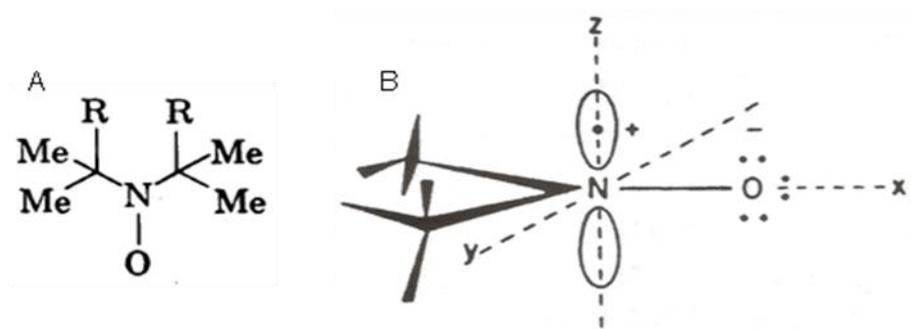


Figura 12. (A) Estrutura geral de um radical nitróxido. (B) Atribuição dos eixos moleculares principais. O eixo z se localiza ao longo do orbital  $\pi$  do nitrogênio, o eixo x ao longo da ligação N – O e y é perpendicular a x e z. (Smith et al., 1976).

A interação do elétron desemparelhado de um radical nitróxido com o campo magnético externo,  $H$ , é descrita pelo hamiltoniano de spin:

$$\mathcal{H} = \beta_e \bar{H}_0 \mathbf{g}_e \hat{S} + \hat{S} \mathbf{A} \hat{I} - \beta_n \bar{H}_0 g_n \hat{I} + \mathcal{H}_{\text{troca}} + \mathcal{H}_{\text{dipolo}} \quad (\text{eq. 6}),$$

onde  $\beta$  é o magnéton de Bohr,  $\beta_N$  é o magnéton nuclear,  $\bar{H}$  é o vetor campo magnético,  $\hat{S}$  e  $\hat{I}$  são, respectivamente, os operadores de spin eletrônico e nuclear,  $g_N$  é o fator Zeeman de desdobramento nuclear,  $\mathbf{g}_e$  é o tensor  $g$  do elétron e  $\mathbf{A}$  é o tensor de desdobramento hiperfino (Schreier et al., 1978). O primeiro termo da equação 6 descreve a interação Zeeman entre o spin eletrônico e o campo magnético  $H$ , responsável pelo desdobramento do momento de dipolo magnético eletrônico em níveis diferentes; o segundo termo, a interação entre o spin eletrônico

e o spin nuclear (interação hiperfina); o terceiro termo, a interação do spin nuclear com o campo magnético externo que, para o caso das intensidades de H utilizadas na técnica de EPR, é negligenciável.  $\mathcal{H}_{\text{troca}}$  e  $\mathcal{H}_{\text{dipolo}}$  descrevem as interações entre elétrons desemparelhados, que podem ocorrer em concentrações muito elevadas de radicais ou em moléculas que possuem mais de um elétron desemparelhado.

Em radicais nitróxidos o elétron desemparelhado popula mais densamente o orbital  $2p_z$  do átomo de  $^{14}\text{N}$  ao qual foi atribuído a direção z (figura 12B), a interação hiperfina entre o elétron e o núcleo de  $^{14}\text{N}$  leva ao desdobramento das linhas espectrais (desdobramento hiperfino) em  $2I+1$  linhas, como  $I = 1$  o espectro se desdobra em 3 linhas, como mostra a figura 13.

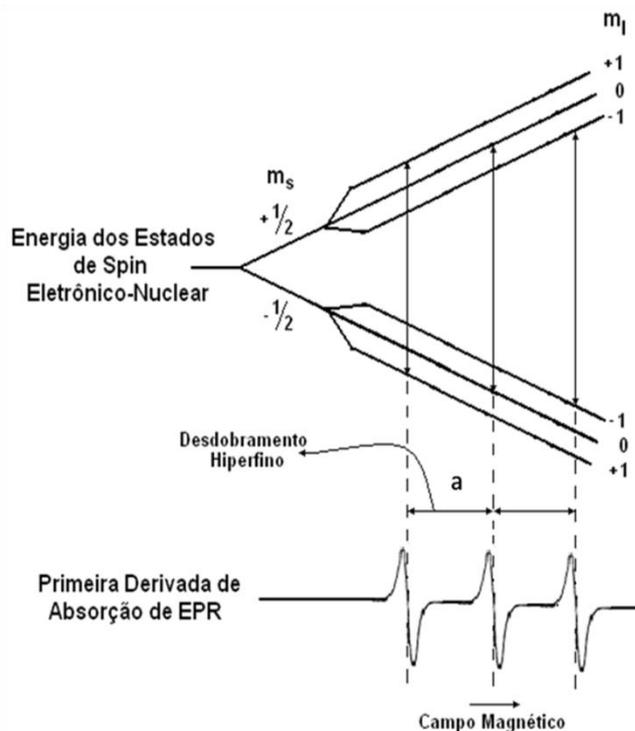


Figura 13.

Diagrama ilustrando o desdobramento hiperfino das linhas espectrais causado pela interação momento magnético de spin do elétron desemparelhado com o momento magnético de spin do núcleo de um átomo de  $^{14}\text{N}$  ( $I = 1$ ). A parte inferior da figura ilustra o espectro obtido.

$\mathbf{A}$  e  $\mathbf{g}_e$  são grandezas tensoriais, ou seja, dependem da orientação entre o campo magnético  $\bar{H}_0$  e os eixos de simetria do radical nitróxido, figura 12B, isso torna o espectro de EPR também dependente da orientação (Schreier et al., 1978). Em sistemas anisotrópicos os valores de  $\mathbf{A}$  e  $\mathbf{g}_e$  dependem da orientação da amostra em relação ao campo magnético como mostra a figura 14A, B e C.

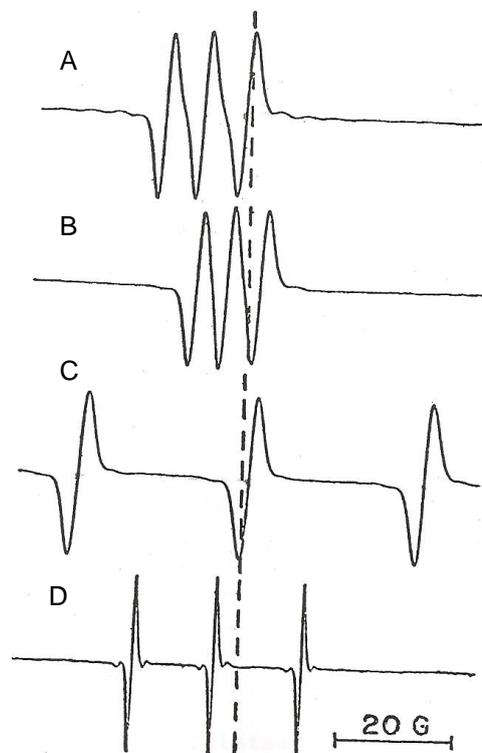


Figura 14. Espectro de EPR de di-tert-butil nitróxido em um cristal diamagnético de tetrametil-1,3-ciclobutanodiona. Campo magnético paralelo aos eixos do nitróxido; A, eixo x; B, eixo y; C, eixo z. D, marcador de spin  $10^{-5}$  M dissolvido em di-tert-butilcetona, temperatura ambiente. A linha pontilhada representa o campo correspondente a  $g = 2,0036$  (Griffith e Waggoner, 1969).

A dependência angular de  $\mathbf{A}$  e  $\mathbf{g}_e$  é descrita pelas equações 7 e 8:

$$g^2 = g_{xx}^2 \sin^2 \theta + g_{yy}^2 \sin^2 \theta \cos \varphi + g_{zz}^2 \cos^2 \theta \quad (\text{eq. 7}),$$

$$A^2 = A_{xx}^2 \sin^2 \theta + A_{yy}^2 \sin^2 \theta \sin \varphi + A_{zz}^2 \cos^2 \theta \quad (\text{eq.8}),$$

onde  $\theta$  e  $\varphi$  são os ângulos entre o vetor H e os eixos x,y e z de acordo com o diagrama da figura 15.

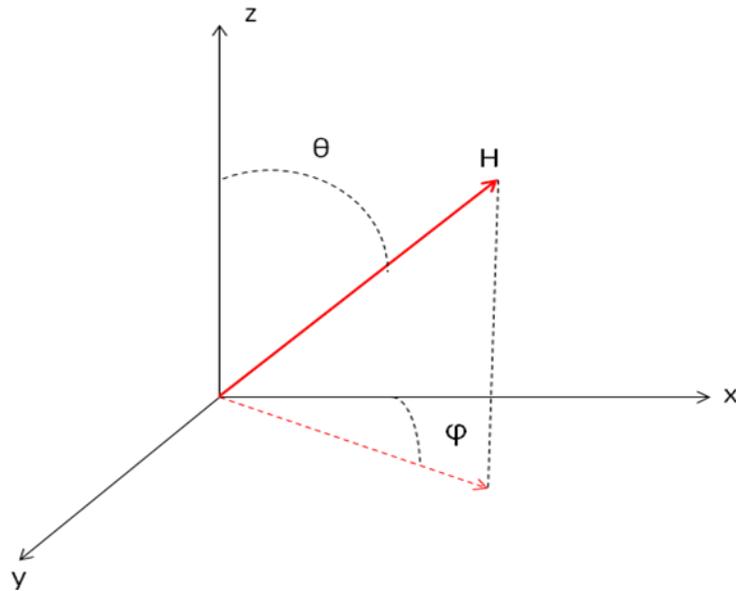
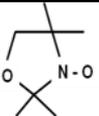


Figura 15. Diagrama de coordenadas polares da orientação do campo magnético H em relação aos eixos x, y e z do radical nitróxido.

Como os eixos principais x, y e z atribuídos ao radical nitróxido coincidem, em geral, com a direção dos componentes principais dos tensores **A** e **g<sub>e</sub>**, a determinação dos valores destes tensores pode ser feita a partir da análise dos espectros de EPR de radicais nitróxidos introduzidos como impurezas substitucionais em um monocristal diamagnético (Tabela 3).

Tabela 3. Principais valores dos tensores de desdobramento hiperfino (A, em Gauss) e  $g_e$  de nitróxidos orientados em cristais diamagnéticos.

Nitróxido	Cristal diamagnético		$A_{xx}$ (G)	$A_{yy}$ (G)	$A_{zz}$ (G)	$g_{xx}$	$g_{yy}$	$g_{zz}$
CSL <sup>a</sup>	Cloreto de colessterila	de	6,3 ± 0,2	5,9 ± 0,2	31,9 ± 0,1	2,0090	2,0060 ± 0,0001	2,0024
	Tetra metil-1,3-ciclobutano-diona <sup>b</sup>		5,9	5,4	32,9 ± 0,5	2,0088	2,0058 ± 0,0005	2,0022

<sup>a</sup>Gaffney e McConnell, 1974. <sup>b</sup>Griffith e Waggoner, 1969.

O espectro de EPR de nitróxidos também é bastante sensível ao ambiente no qual a molécula se encontra, em particular, à velocidade de tombamento da molécula (tempo de correlação rotacional  $\tau$ ). Para espécies paramagnéticas pequenas e esféricas que possuem movimento rápido isotrópico ( $\tau < 10^{-9}$  seg), o espectro de EPR possui três linhas estreitas (figura 13D) que permitem a determinação de valores isotrópicos de  $g_e$  e  $A$ ,  $A_0$  e  $g_0$ , equações 9 e 10.  $A_0$  e  $g_0$  são resultantes da média dos valores dos componentes principais devido ao rápido tombamento da molécula.

$$A_0 = \frac{1}{3} (A_{xx} + A_{yy} + A_{zz}) \quad (\text{eq. 9}),$$

$$g_0 = \frac{1}{3} (g_{xx} + g_{yy} + g_{zz}) \quad (\text{eq. 10}).$$

A velocidade de tombamento de um radical nitróxido determina as larguras relativas das linhas dos espectros, são estreitas para movimentos rápidos e se alargam à medida que o movimento se torna mais lento. A figura 16 mostra a dependência de espectros de EPR de dois radicais nitróxidos com a diminuição de  $\tau$  devido ao aumento da viscosidade do meio.

O tempo de correlação rotacional de uma molécula pequena e esférica se relaciona com a viscosidade do meio  $\eta$  pela equação de Stokes-Einstein:

$$\tau = \frac{4\pi\eta r^3}{3kT} \quad (\text{eq. 11}),$$

onde  $r$  é o raio da molécula,  $k$  é a constante de Boltzmann e  $T$  a temperatura em Kelvin.

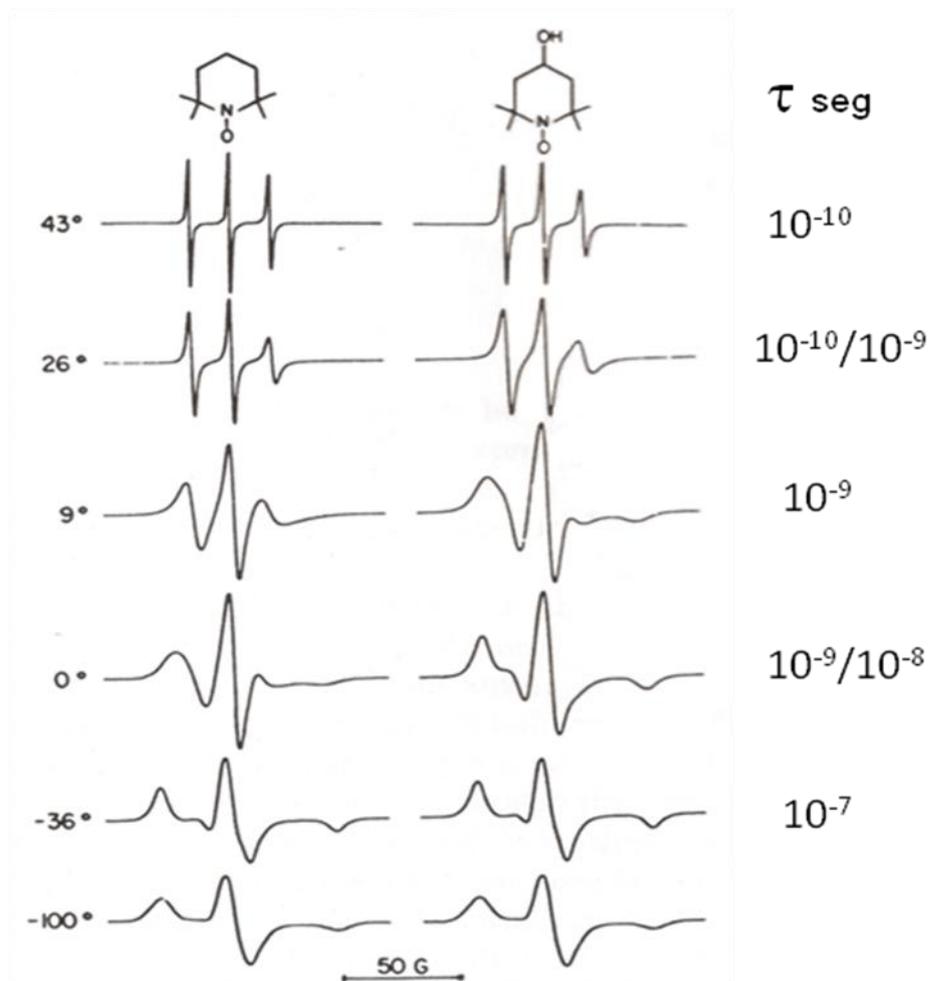


Figura 16. Influência da viscosidade do solvente no espectro de EPR de 9,5 GHz de duas sondas de spin, 50  $\mu$ M, em glicerol. À esquerda, Tempo, à direita Tempol. A temperatura foi variada de 43° a -100° C (Jost et al., 1971).

À medida que  $\tau$  aumenta, se aproximando de valores para os quais a molécula encontra-se essencialmente parada na escala de tempo do aparelho ( $\tau \approx$

$10^{-8}$  seg), as linhas do espectro de EPR se alargam significativamente e a sua forma é alterada, espectros da figura 16 a partir de  $0^\circ$  C. Estes espectros representam a soma das absorções em todas as diferentes orientações dos eixos x, y e z do radical nitróxido em relação ao campo magnético. Tais espectros, denominados espectros de pó, são característicos de sistemas sólidos não cristalinos, onde todas as orientações da espécie paramagnética em relação ao campo magnético são possíveis. A figura 17 apresenta um esquema das superposição de todas as absorções em varias orientações e o espectro de pó resultante.

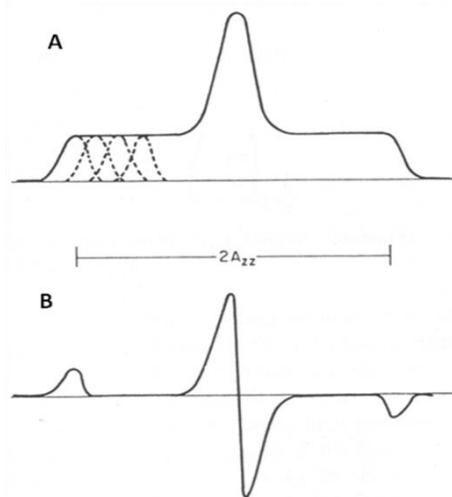


Figura 17. Espectro de pó de um radical nitróxido. (A) Superposição esquemática de espectros de absorbância individuais a várias orientações angulares. (B) Primeira derivada do envelope de absorção (Smith et al., 1976).

O valor de  $\tau$  pode ser obtido por meio dos espectros de EPR a partir dos valores das larguras e alturas das linhas dos espectros,  $\tau$  pode ser calculado de duas formas:

$$\tau_B = -1,27 \times 10^{-9} \frac{1}{2} \Delta W_0 (\sqrt{h_0/h_+} - \sqrt{h_0/h_{-1}}) \quad (\text{eq. 12a})$$

$$\tau_c = 1,19 \times 10^{-9} \frac{1}{2} \Delta W_0 \left[ \sqrt{h_0/h_{+1}} + \sqrt{h_0/h_{-1}} - 2 \right] \quad (\text{eq. 12b}),$$

onde  $\Delta W_0$  corresponde a largura pico a pico da linha de campo central,  $h_{-1}$ ,  $h_0$ , e  $h_{+1}$  correspondem às alturas das linhas de campo baixo, central e alto, respectivamente (Schreier et al., 1978). Os índices 0, +1 e -1 se originam do número quântico  $m_l$  que caracteriza cada uma das ressonâncias. As medidas de  $\Delta W_0$ , bem como das alturas das linhas de um espectro de EPR, estão ilustradas na figura 18.

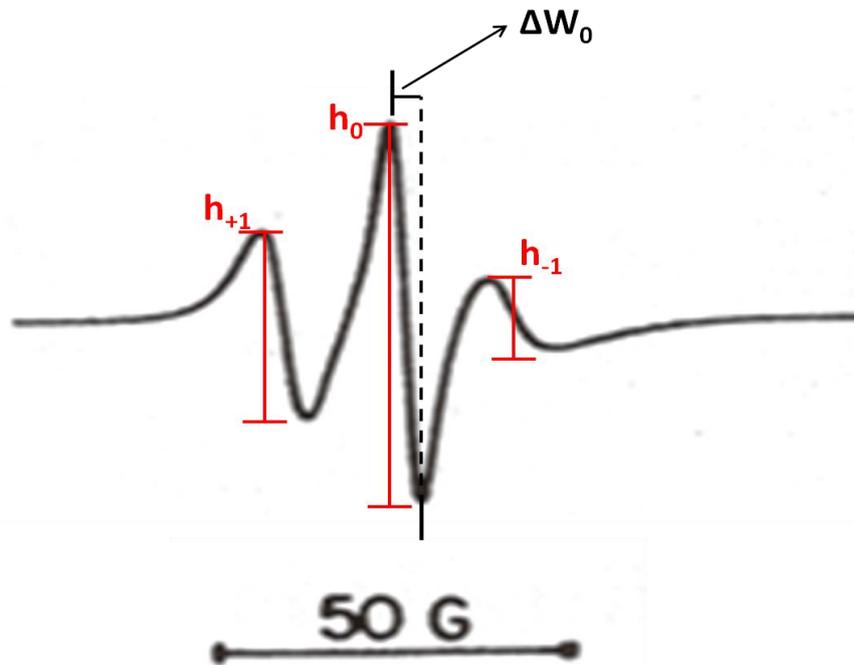


Figura 18. Espectro de EPR do marcador de spin Tempo em glicerol a 9° C. Alturas dos picos de campo baixo ( $h_{+1}$ ), central ( $h_0$ ) e alto ( $h_{-1}$ ) e largura da linha de campo central  $\Delta W_0$ .

As equações 12a e b são adequadas para o tratamento de espectros de EPR de moléculas esféricas pequenas que possuem movimento isotrópico rápido, neste caso  $\tau_B$  e  $\tau_C$  devem ser iguais. Para o caso de sistemas que não obedecem a esses critérios o movimento molecular pode ser caracterizado por dois valores de  $\tau$ ,  $\tau_{\parallel}$  e  $\tau_{\perp}$ ,

que descrevem o movimento ao redor do eixo molecular principal e o movimento pendular do eixo molecular, respectivamente. Apesar das equações 12a e b não poderem ser empregadas rigorosamente as diferenças entre  $\tau_B$  e  $\tau_C$  podem fornecer informação sobre o grau de anisotropia do movimento.

Os marcadores de spin IV a IX da figura 10, largamente utilizados no estudo de membranas, são estruturas às quais o tratamento descrito nas equações 12a e b não pode ser aplicado com rigor. Mesmo em ambientes isotrópicos esses marcadores possuem movimento anisotrópico devido à sua estrutura. Na figura 19 estão apresentados dois marcadores de spin derivados de ácidos graxos e esteróis bem como a atribuição dos eixos x, y e z aos radicais nitróxidos.

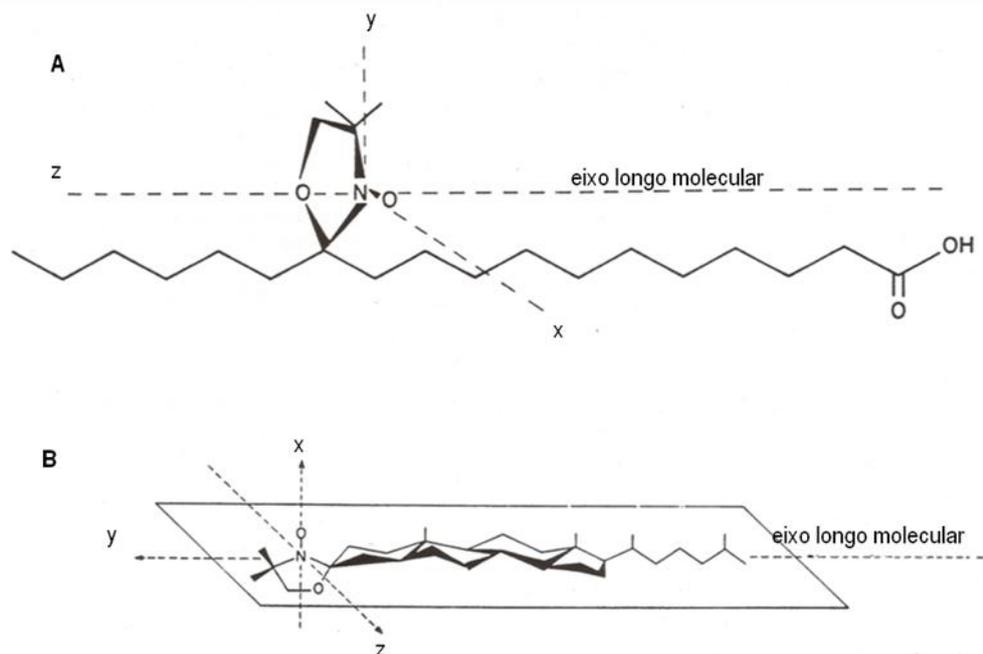


Figura 19. Eixos principais para o grupo N-O em marcadores de spin derivados de ácidos graxos (A) e de esteróides (B). Em (A) o eixo z coincide aproximadamente com o eixo longo molecular do marcador de spin, enquanto que em (B) o eixo correspondente ao eixo longo molecular é y (Schreier et al., 1978).

Os valores dos tensores  $\mathbf{A}$  e  $\mathbf{g}_e$  para marcadores spin são dependentes da orientação dos eixos x, y e z em relação ao campo magnético,  $A$  é máximo quando o campo magnético se orienta paralelamente ao eixo z (figura 13C e Tabela 3). A anisotropia de  $\mathbf{A}$  e  $\mathbf{g}_e$  é a base para o cálculo do parâmetro de ordem em membranas.

A incorporação de radicais nitróxidos em sistemas líquidos ordenados, como bicamadas lipídicas, promove a orientação preferencial destes com seu eixo longo molecular paralelo ao eixo normal à superfície (Libertini et al, 1969; Hsia et al., 1970). Estudos de radicais nitróxido em um sistema líquido cristalino decanol/decanoato/água (Seelig, 1970) mostram apesar dos valores de  $A$  e  $g_e$  serem dependentes da orientação em relação ao campo magnético, indicando o movimento anisotrópico da sonda, os espectros possuem linhas estreitas, indicando um movimento rápido da molécula. O movimento rápido da sonda ao longo de eixo molecular leva a obtenção de valores de  $A$  e  $g_e$  correspondentes as orientações paralelas ( $A_{//}$  e  $g_{//}$ ) e perpendiculares ( $A_{\perp}$  e  $g_{\perp}$ ) em relação à normal à superfície. Para estes sistemas o parâmetro de ordem,  $S$ , pode ser calculado.  $S$  é uma medida da distribuição das orientações moleculares em relação a um eixo de referência e pode ser descrito por dois modelos mostrados na figura 20, para sistemas que possuem movimento isotrópico  $S$  tende a 0 e para sistemas muito ordenados  $S$  tende a 1.

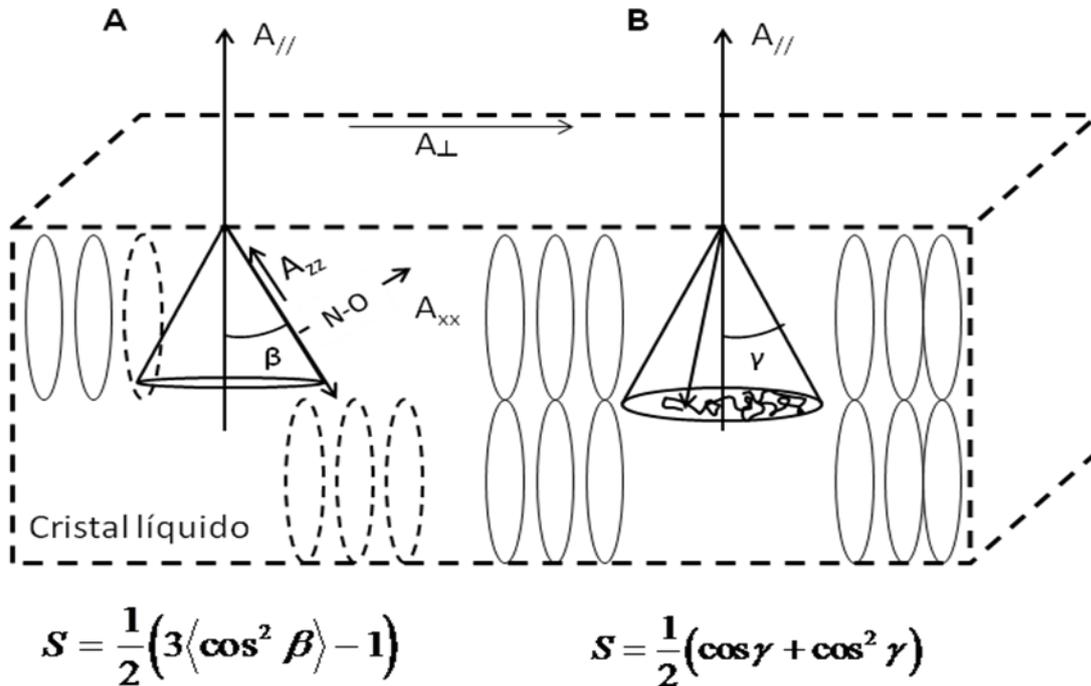


Figura 20. Descrição do parâmetro de ordem  $S$ . (A)  $S$  está relacionado a amplitude angular ( $\beta$ ) do movimento anisotrópico da molécula em relação à normal à bicamada (Seelig, 1970). (B)  $S$  está relacionado a todos os movimentos (rotacionais, oscilatório e segmental) confinados dentro de um cone que possui um ângulo  $\gamma$  com a normal a bicamada (Jost et al., 1971).

Sistemas de membranas podem ser entendidos como sistemas líquidos cristalinos. A incorporação de marcadores de spin em membranas leva à orientação destes com seu eixo longo molecular aproximadamente paralelo a normal a bicamada. A análise dos espectros de marcadores de spin lipídicos ou esteroídicos intercalados em membranas foi feita inicialmente para sistemas de membranas orientadas (Jost et al., 1971; Mailer et al., 1974). O espectro de marcadores de spin nesses sistemas pode ser obtido a diferentes ângulos entre o campo magnético e o eixo normal à superfície da bicamada. A figura 21A mostra o espectro do marcador de spin ácido 5-doxil esteárico em uma bicamada orientada composta por fosfatidilcolina de ovo contendo 30% de colesterol.

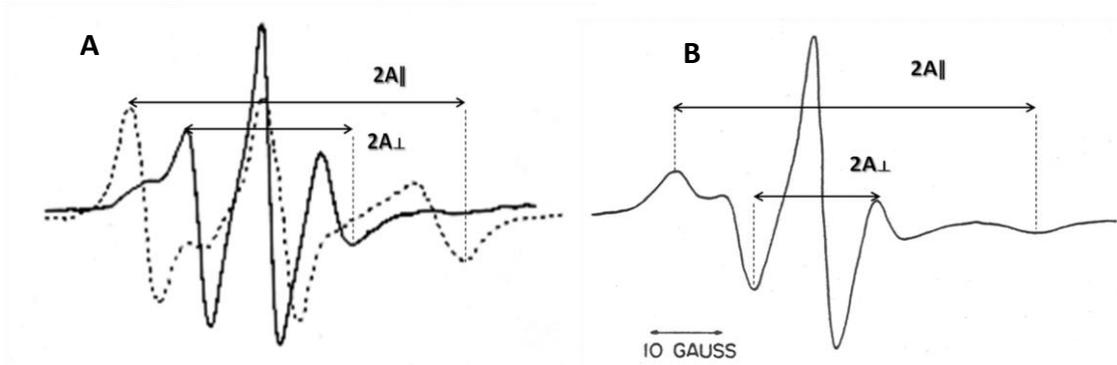


Figura 21. (A) Espectro de EPR do marcador de spin ácido-5-doxil-esteárico incorporado em multibicamadas orientadas de fosfatidilcolina de ovo contendo 30% de colesterol. Em linha cheia o espectro com o campo magnético aplicado perpendicularmente ao eixo normal à superfície da bicamada, em linha pontilhada o espectro com o campo magnético aplicado paralelamente o eixo normal a superfície da bicamada. (B) Espectro de EPR do marcador de spin 5-doxil-ácido esteárico incorporado em uma dispersão de fosfatidilcolina de ovo contendo 30% de colesterol. Na figura está indicada a obtenção dos valores de  $A_{\parallel}$  e  $A_{\perp}$  (Schreier et al., 1978).

A partir dos valores obtidos para os desdobramentos hiperfinos para os espectros correspondentes ao campo magnético orientado paralelamente a ( $A_{\parallel}$ ) e perpendicularmente normal da bicamada ( $A_{\perp}$ ) pode-se calcular  $S$  para essa bicamada. Para marcadores de spin no qual o eixo  $z$  é o eixo longo molecular,  $S$  pode ser calculado a partir dos desdobramentos hiperfinos obtidos experimentalmente pela equação:

$$S = \frac{A_{\parallel} - A_{\perp}}{A_{zz}(A_{xx} + A_{yy})/2} \quad (\text{eq. 13}),$$

onde os valores de  $A_{xx}$ ,  $A_{yy}$  e  $A_{zz}$  para marcadores de spin derivados de ácidos graxos ou esteroídicos são aproximadamente 6,0 G, 6,0 G e 32,0 G, como mostra a Tabela 3.

Em sistemas lipídicos não orientados, que possuem tempo de correlação rotacional muito alto de modo que na escala de tempo do experimento de EPR eles se encontram parados, o espectro obtido é a soma de todas as possíveis orientações da normal a bicamada em relação ao campo magnético aplicado, como o espectro da figura 17B. Mesmo havendo uma distribuição isotrópica de lipídios, o espectro resultante é dependente da ordem local presente na bicamada e o cálculo de  $S$ , para esse espectro, pode ser feito utilizando a equação 13, a obtenção dos desdobramentos hiperfinos  $A_{\perp}$  e  $A_{\parallel}$ , denominados, respectivamente, extremos internos e externos do espectro, é mostrada na figura 21B.

#### **3.5.4 Análise dos espectros de EPR**

Os espectros de EPR foram analisados através do parâmetro de ordem nos casos em que o espectro apresentou extremos internos e externos. Para casos onde o grau de ordem é baixo e a amplitude de movimento do marcador é tal que o espectro resultante não possui extremos internos e externos bem resolvidos (obtem-se espectros com três linhas relativamente estreitas devido ao movimento pseudo-isotrópico do marcador),  $S$  não pode ser calculado a partir da equação 13. Ainda, o cálculo de  $\tau$  não pode ser empregado, já que se trata de um movimento anisotrópico. Nesse caso foi introduzida a medida da relação de alturas dos picos de campo central ( $h_0$ ) e de campo baixo ( $h_{+1}$ ) ( $h_0/h_{+1}$ ) (figura 18). Essa relação é um parâmetro empírico que engloba a contribuição de ordem e mobilidade (Schreier et al., 1984). Quanto maior o valor  $h_0/h_{+1}$ , maior a ordem e/ou menor a mobilidade. Devido à dificuldade de separar as contribuições devido à alteração da ordem e mobilidade do marcador de spin nos espectros nos quais se observa o movimento pseudo-

isotrópico, utiliza-se o termo organização molecular, que engloba as contribuições tanto da ordem quanto a de mobilidade (Schreier et al., 1984).

### 3.6 Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo

Experimentos de espalhamento de raios-X de baixo ângulo (SAXS) empregando micelas de LPC na ausência ou presença do peptídeo St II<sub>1-30</sub> foram realizados no laboratório de Cristalografia do Instituto de Física da USP em colaboração com o grupo de pesquisa da Profa. Dra. Rosângela Itri. Foram estudadas amostras de LPC de concentrações 20 mM, 60 mM e 120 mM. A amostra de 20 mM de LPC na presença de 2 mM de St II<sub>1-30</sub> foi preparada pela dissolução de quantidades apropriadas de LPC e do peptídeo, ambos em pó, em água Milli-Q, pH 7,0. Amostras de concentrações mais elevadas de lipolípido foram obtidas pela adição de LPC em pó a solução inicial de 20 mM. Foram obtidas razões St II<sub>1-30</sub>/LPC: 10/100, 3,33/100 e 1,67/100.

As medidas foram realizadas em um equipamento NanoStar (Bruker, Alemanha) com distância amostra-detector de cerca de 650 mm, a temperatura ambiente, com radiação de comprimento de onda de 1,5418 Å. Os dados foram coletados durante 2 horas. As curvas obtidas foram corrigidas para homogeneidade do detector, pelo espalhamento da solução aquosa e também considerando a atenuação da amostra.

A intensidade de espalhamento,  $I(q)$ , de uma solução de partículas espalhadoras de baixa anisometria e isotropicamente distribuídas pode ser escrita como:

$$I(q) = kn_p P(q) S(q) \quad (\text{eq. 14}),$$

onde  $n_p$  é a densidade numérica de partículas espalhadoras e  $k$  é um fator relacionado aos parâmetros experimentais.  $P(q)$  é o fator de forma da partícula espalhadora, sendo  $q$  o vetor espalhamento,  $q = 4\pi\text{sen}\theta/\lambda$ , sendo  $2\theta$  o ângulo de espalhamento e  $\lambda$  o comprimento de onda do feixe de raios-X incidente.  $S(q)$  é a função de interferência entre partículas espalhadoras, que tende a 1 para sistemas não interagentes.

Em nossa análise, as micelas compostas por LPC são modeladas como elipsóides prolatos. Uma descrição desta metodologia pode ser encontrada em Barbosa et al., 2006.

## 4. Resultados

Os resultados aqui apresentados descrevem estudos da interação dos peptídeos derivados da região N-terminal de St I e St II, St I<sub>1-31</sub>, St I<sub>12-31</sub>, St II<sub>1-30</sub> e St II<sub>11-30</sub> (Tabela 1), com membranas modelo. Foi examinado o efeito da interação sobre a estrutura secundária dos peptídeos utilizando CD, bem como sobre a organização molecular de bicamadas e micelas através da técnica de EPR.

### 4.1 Estudos Conformacionais

Estudos conformacionais dos peptídeos St II<sub>1-30</sub>, St II<sub>11-30</sub>, St I<sub>1-31</sub> e St I<sub>12-31</sub>, empregando CD, foram realizados em solução, na presença de SUV e na presença de micelas, em pH 7,0. As SUV foram preparadas a partir dos fosfolipídios POPC, POPA e SM, nas composições: somente POPC (zwitteriônica); POPC:POPA, 90:10 (carga líquida negativa); POPC:SM 90:10 (zwitteriônica); POPC:SM:POPA 80:10:10 e 75:15:10 (carga líquida negativa); POPC:DPPC 90:10 (zwitteriônica). As micelas foram preparadas a partir dos lisofosfolipídios LPC e LPA nas composições: LPC (zwitteriônica) e LPC:LPA 90:10 (carga líquida negativa).

Foi considerado como indicativo de ligação dos peptídeos a SUV ou micelas, a formação de estrutura  $\alpha$ -helicoidal, evidenciada pelos mínimos em 208 nm e 222 nm. Os espectros dos peptídeos em solução são característicos de conformação ao acaso.

#### 4.1.1 Peptídeos em Solução

A natureza das interações entre os peptídeos e membranas modelo é dependente das propriedades intrínsecas a cada sequência. Na tabela 4 estão

reapresentadas as sequências dos peptídeos estudados, bem como sua propensão a adquirir estrutura em  $\alpha$ -hélice, calculada pelo algoritmo HNN (Guermeur et al., 1999), e ainda sua carga líquida em pH 7,0. As diferenças entre as sequências estão destacadas: a região sublinhada compreende uma região rica em aminoácidos hidrofóbicos, os resíduos que diferem nas sequências de St II<sub>1-30</sub> (St I<sub>1-31</sub>) e St II<sub>11-30</sub> (St I<sub>12-31</sub>) estão em vermelho.

Tabela 4. Sequência dos peptídeos estudados, propensão de aquisição de  $\alpha$ -hélice e carga líquida dos peptídeos em pH 7,0.

Nome	Sequência	Propensão % $\alpha$ -hélice HNN <sup>#</sup>	Carga líquida pH 7,0
St I <sub>1-31</sub>	<u>SELAGTIIDGAS</u> SLTFEVL <sup>E</sup> LDKVL <sup>G</sup> GELGK <sup>V</sup> SRK	45,16%	0
St I <sub>12-31</sub>	SLTFEVL <sup>E</sup> LDKVL <sup>G</sup> GELGK <sup>V</sup> SRK	55,00%	+2
St II <sub>1-30</sub>	<u>ALAGTIAGAS</u> SLTFQVL <sup>D</sup> DKVLEELGK <sup>V</sup> SRK	53,33%	+2
St II <sub>11-30</sub>	SLTFQVL <sup>D</sup> DKVLEELGK <sup>V</sup> SRK	65,00%	+2

<sup>#</sup>O método HNN para predição de estrutura secundária é descrito em Guermeur et al., 1999.

Estudos de St II<sub>1-30</sub> e St II<sub>11-30</sub> em solução (Casallanovo et al., 2006) mostraram que o primeiro sofre agregação, com concomitante aquisição de estrutura secundária em folhas  $\beta$ , com o aumento do pH, da concentração e da força iônica; contudo, o mesmo não é observado para o peptídeo mais curto St II<sub>11-30</sub>. Essa diferença foi atribuída à presença do segmento rico em resíduos hidrofóbicos entre os resíduos 1 e 10 de St II<sub>1-30</sub> (região sublinhada na Tabela 4), essa região está ausente em St II<sub>11-30</sub>. Estudos similares para St I<sub>1-31</sub> e St I<sub>12-31</sub> mostraram que ambos possuem menor tendência a sofrer agregação em solução do que St II<sub>1-30</sub> (Ros, U., resultados não publicados). A presença dos resíduos Ser1, Glu2 e Asp9 na região compreendendo os onze primeiros aminoácidos de St I<sub>1-31</sub> altera as propriedades dessa região quando comparada ao mesmo segmento (resíduos 1-10) em St II<sub>1-30</sub>.

Provavelmente a presença daqueles resíduos reduz a propensão de St I<sub>1-31</sub> de sofrer agregação em solução, especialmente devido à repulsão entre os resíduos negativamente carregados. De maneira análoga a St II<sub>11-30</sub>, a ausência do segmento hidrofóbico em St I<sub>12-31</sub>, diminui a propensão do peptídeo de se agregar em solução.

A presença de duas cargas negativas a mais (Glu2 e Asp9) na sequência de St I<sub>1-31</sub> em relação à de St II<sub>1-30</sub> confere a esse peptídeo menos carga líquida positiva em comparação aos demais. Os peptídeos derivados de St I também possuem uma menor propensão de aquisição de estrutura em  $\alpha$ -hélice em relação aos derivados de St II. Tal diminuição na propensão de aquisição de estrutura em  $\alpha$ -hélice se deve, muito provavelmente, à substituição de um resíduo de Glu, posição 22 na sequência de St II<sub>1-30</sub>, por Gly, posição 23 na sequência de St I<sub>1-31</sub>. Escalas das preferências conformacionais de aminoácidos mostram que, enquanto Glu é um forte indutor de hélice, Gly dificulta sua formação (Williams et al. 1987; Wilmot e Thornton, 1988). A maior probabilidade de aquisição de estrutura em  $\alpha$ -hélice para St II<sub>11-30</sub> e St I<sub>12-31</sub>, em relação aos seus análogos não truncados, se deve ao fato de estes peptídeos corresponderem exatamente à região com maior propensão de aquisição dessa estrutura.

Predições para a extensão da  $\alpha$ -hélice para os quatro peptídeos, obtidas pelos programas Jpred e PSIPRED (Cole et al., 2008; McGuffin et al., 2000) (figura 22) mostram que os resultados obtidos pelos diferentes programas estão essencialmente em concordância. A extensão da  $\alpha$ -hélice predita pelo programa Jpred para St II<sub>1-30</sub> (resíduos 14 a 26) está de acordo com o que foi obtido pela resolução da estrutura da proteína por cristalografia de raios-X (resíduos 14 a 23)

(Mancheño et al., 2003). Para todos os peptídeos, a predição pelo o programa PSIPRED resultou em uma  $\alpha$ -hélice de maior extensão.

Os resultados da figura 22 estão de acordo com o conteúdo de estrutura em  $\alpha$ -hélice obtido pelo programa HNN. O conteúdo de estrutura em  $\alpha$ -hélice foi maior para os peptídeos derivados de St II em comparação com seus análogos de St I, tanto para a predição pelo programa Jpred quanto para o PSIPRED. O resultado obtido para St I<sub>1-31</sub>, que prediz a existência de duas regiões helicoidais conectadas por uma região desestruturada, está de acordo com estudos de NMR do fragmento N-terminal de St I, resíduos 1 a 30, na presença de 30% de TFE (Castrillo et al., 2010).

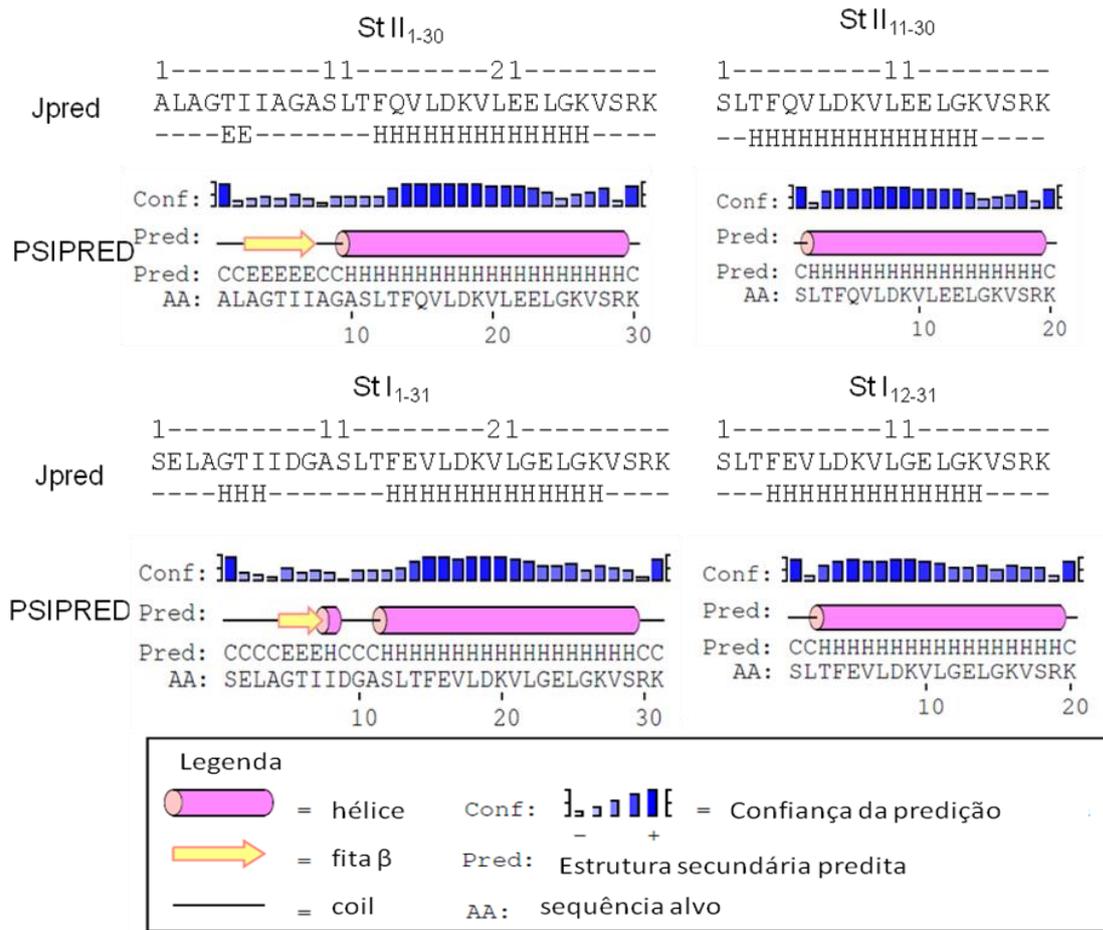


Figura 22. Predições para a conformação de St II<sub>1-30</sub>, St II<sub>11-30</sub>, St I<sub>1-31</sub> e St I<sub>12-31</sub>. E se refere à conformação estendida (fita β), H à conformação helicoidal (α-hélice) e C à conformação ao acaso (coil). Os símbolos abaixo das sequências resultantes da análise por PSIPRED estão descritos na legenda abaixo da figura.

Foi também predito o grau exposição ao solvente dos resíduos dos quatro peptídeos (figura 23). Os resíduos com menos que 25 e 5 % de exposição ao solvente são os da região dos primeiros 10(11) resíduos de St II<sub>1-30</sub> e St I<sub>1-31</sub> e os resíduos apolares da α-hélice.

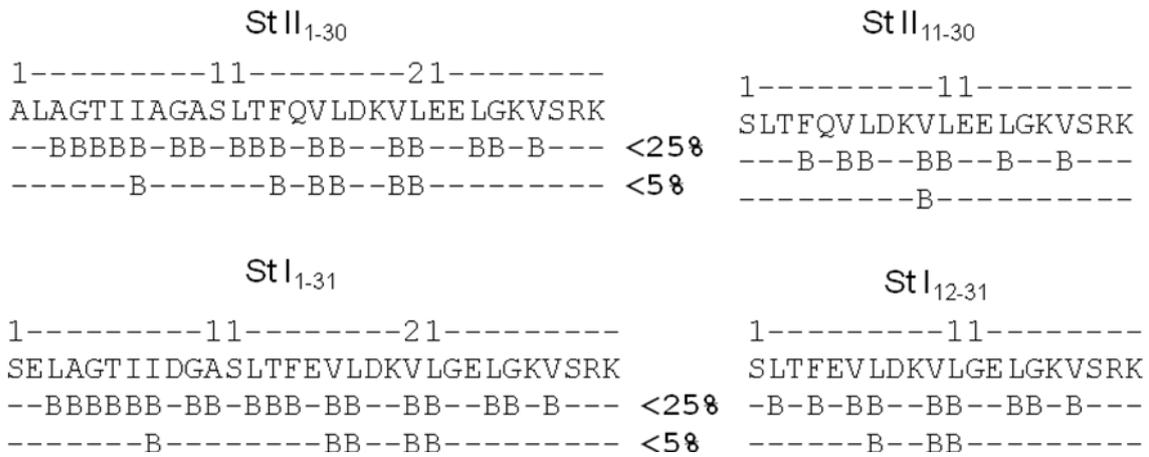


Figura 23. Predição da probabilidade de exposição ao solvente dos resíduos dos peptídeos St II<sub>1-30</sub>, St II<sub>11-30</sub>, St I<sub>1-31</sub> e St I<sub>12-31</sub>. São dados os resultados para probabilidade menor do que 25% e menor do que 5% de exposição. (B = buried).

Os espectros de CD dos quatro peptídeos em solução (figura 24) mostram que todos os peptídeos assumem, essencialmente, conformação ao acaso. A tabela 5 apresenta os valores do conteúdo de  $\alpha$ -hélice, folha  $\beta$  e estrutura ao acaso, para os espectros da figura 23 obtidos por deconvolução através programa PEPFIT (Reed et al., 1997).

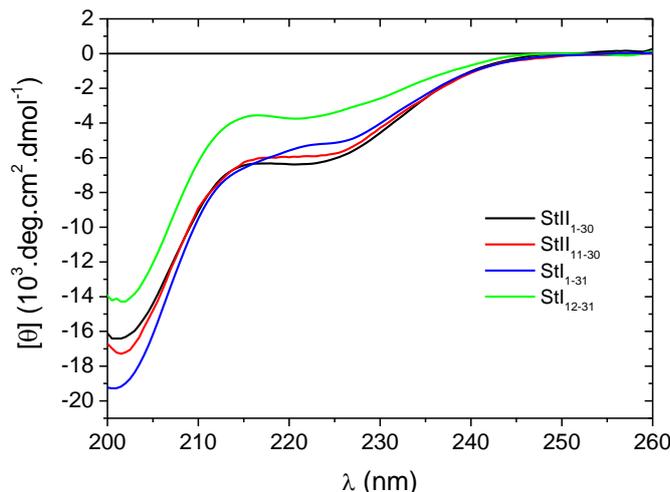


Figura 24. Espectros de CD de St II<sub>1-30</sub> (preto), St II<sub>11-30</sub> (vermelho), St I<sub>1-31</sub> (azul) e St I<sub>12-31</sub> (verde), em água deionizada, pH 7,0. Os espectros são a média de quatro experimentos. Os valores de desvio padrão foram omitidos para clareza da figura. [peptídeos] = 5  $\mu$ M.

Tabela 5. Conteúdo de  $\alpha$ -hélice, folha  $\beta$  e estrutura ao acaso para os peptídeos em solução.<sup>a,b</sup>

Peptídeo	% $\alpha$ -hélice	% folhas $\beta$	% estrutura ao acaso
St II <sub>1-30</sub>	18,8 $\pm$ 0,84	16,6 $\pm$ 1,14	65,6 $\pm$ 0,55
St II <sub>11-30</sub>	16,2 $\pm$ 0,84	18,2 $\pm$ 0,84	65,6 $\pm$ 0,55
St I <sub>1-31</sub>	17,2 $\pm$ 0,84	12,4 $\pm$ 1,14	70,4 $\pm$ 0,55
St I <sub>12-31</sub>	6,8 $\pm$ 0,84	29,6 $\pm$ 1,14	63,6 $\pm$ 0,55

<sup>a</sup> Obtido a partir da deconvolução dos espectros de CD da figura 24 pelo programa PEPFIT (Reed et al., 1997).

<sup>b</sup> É dado o desvio padrão da média dos valores das cinco melhores deconvoluções ( $R^2 > 0,95$ ) calculado pelo programa OriginLab 6.0.

Os dados da tabela 5 indicam que apesar de os espectros de CD dos peptídeos sugerirem uma estrutura essencialmente ao acaso, os peptídeos já apresentam algum conteúdo de estrutura secundária.

Estudos funcionais mostraram que St II<sub>1-30</sub> possui maior atividade hemolítica em relação aos outros peptídeos, seguido de St I<sub>1-31</sub> e St II<sub>11-30</sub>, que possuem atividades similares, e St I<sub>12-31</sub> que possui a menor atividade (Casallanovo et al., 2006; Ros. U., resultados não publicados). Provavelmente, de maneira análoga ao que ocorre com as toxinas, a formação de poro pelos peptídeos também é dependente da formação de um oligômero. Contudo, o número de moléculas dos peptídeos que formariam o poro ainda não foi determinado. Levando em consideração os resultados que indicam que St II<sub>1-30</sub> tem uma maior propensão a agregar em solução do que os demais peptídeos (Casallanovo et al., 2006; Ros, U., resultados não publicados), é concebível que esta propensão à agregação esteja relacionada à sua maior atividade hemolítica.

#### 4.1.2 Interação com SUV

Os estudos da interação dos peptídeos com membranas modelo, constituídas pelos lipídios POPC, POPA e SM, e POPC, tiveram como objetivo compreender as interações peptídeo-membrana ao nível molecular, verificando a eventual especificidade em relação a um ou mais lipídios (em particular, SM) avaliando o papel de diferentes forças (por exemplo, interações eletrostáticas, hidrofóbicas) envolvidas na interação.

#### **4.1.2.1 SUV zwitteriônicas de POPC**

A figura 25 mostra os espectros de CD dos peptídeos St II<sub>1-30</sub>, St II<sub>11-30</sub>, St I<sub>1-31</sub> e St I<sub>12-31</sub>, na presença de quantidades crescentes de SUV de POPC, em pH 7,0. Os espectros de CD mostram de que não houve aquisição de estrutura secundária com o aumento da concentração de POPC. Todos os peptídeos mantiveram conformação randômica similar à observada nos espectros em água (figura 24). Analisando os valores de  $[\theta]_{222}$  observa-se que as mudanças espectrais foram muito pequenas, sugerindo que os peptídeos, ou se ligam em baixa extensão, ou não se ligam, às SUVs formadas pelo fosfolipídio zwitteriônico.

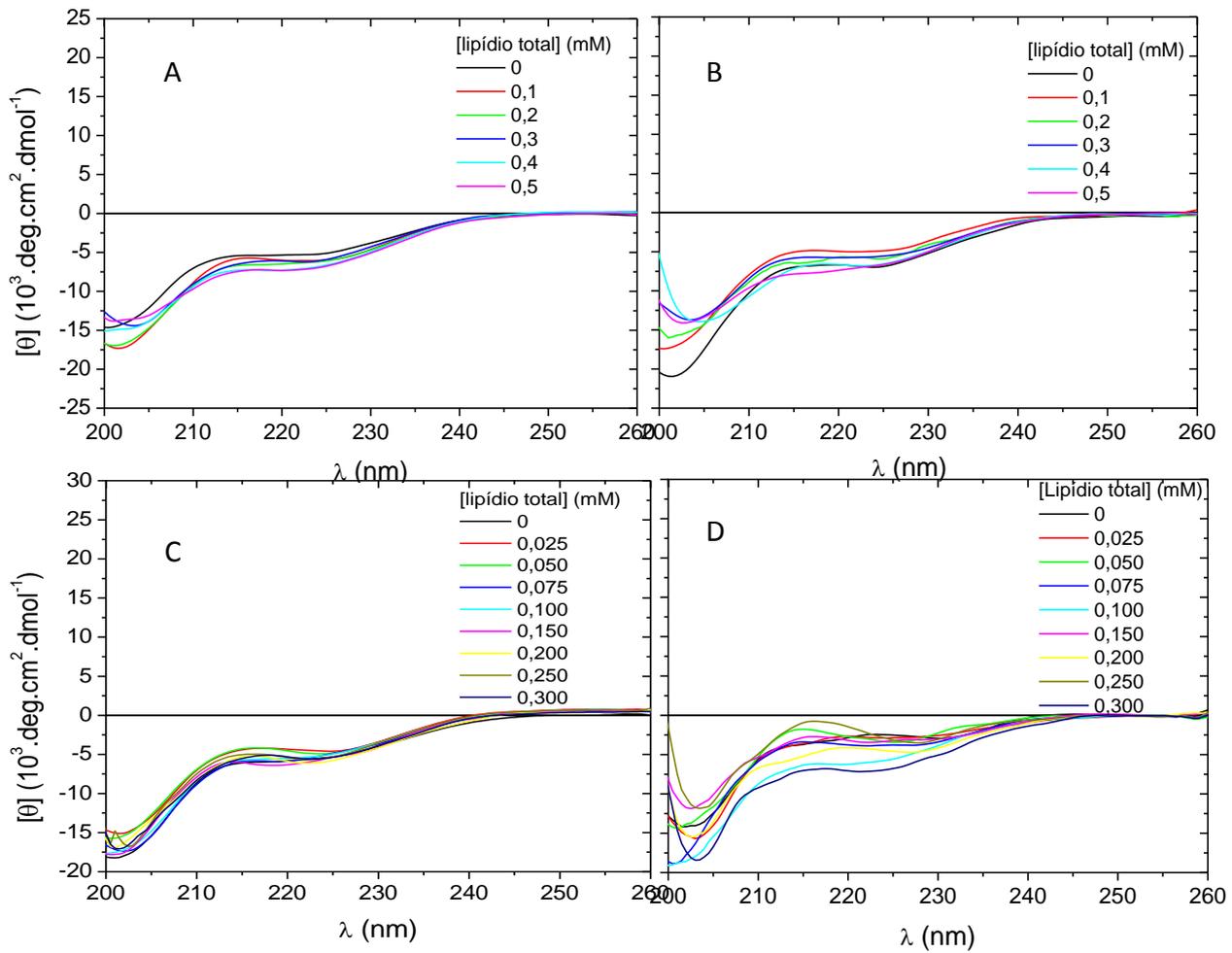


Figura 25. Espectros de CD de St II<sub>1-30</sub> (A), St II<sub>11-30</sub> (B), St I<sub>1-31</sub> (C) e St I<sub>12-31</sub> (D) na presença de quantidades crescentes de SUV de POPC, pH 7,0. [peptídeos] = 5 μM.

#### 4.1.2.2 SUV contendo o fosfolípido negativamente carregado POPA

Para avaliar o papel de interações eletrostáticas na interação peptídeo-membrana, o fosfolípido carregado negativamente POPA foi incluído na composição das SUV. Foram obtidos espectros na presença de concentrações crescentes de SUV de composição POPC:POPA (90:10) (figura 26).

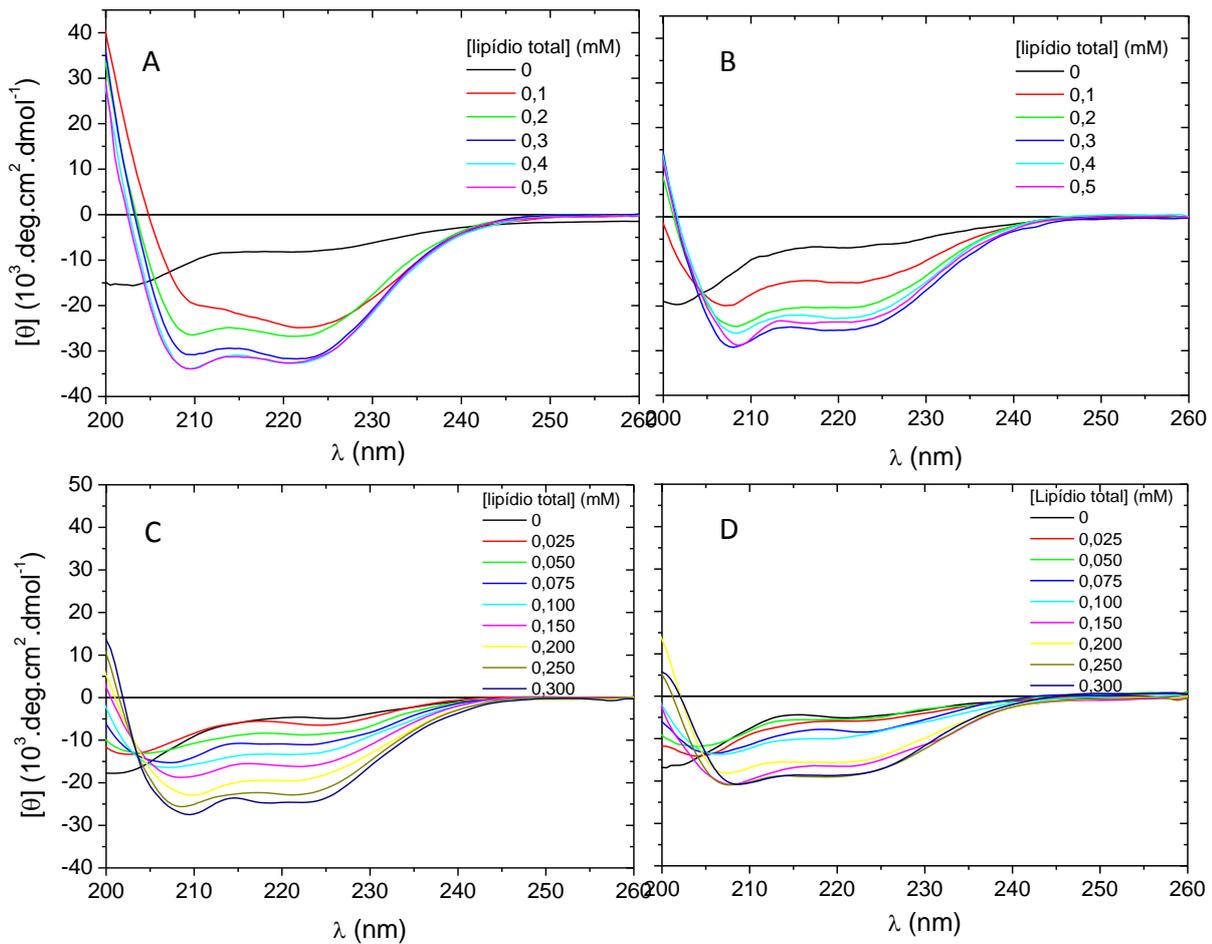


Figura 26. Espectros de St II<sub>1-30</sub> (A), St II<sub>11-30</sub> (B), St I<sub>1-31</sub> (C) e St I<sub>12-31</sub> (D) na presença de quantidades crescentes de SUV de POPC:POPA (90:10), pH 7,0. [peptídeos] = 5 μM.

Ao contrário dos espectros na presença de SUV contendo apenas POPC, todos os peptídeos adquiriram conformação  $\alpha$ -helicoidal, indicando sua ligação às vesículas. A figura 27 mostra os valores do módulo de  $[\theta]_{222}$  ( $|[\theta]_{222}|$ ) nos espectros dos peptídeos em função da concentração total de lipídio; St II<sub>1-30</sub> adquiriu um maior conteúdo de estrutura  $\alpha$ -helicoidal em relação aos demais peptídeos. A extensão da ligação dos peptídeos às SUV não pode ser inferida diretamente dos valores de  $[\theta]_{222}$  devido à suas diferentes propensões de aquisição de estrutura  $\alpha$ -helicoidal. Para avaliar a extensão da ligação dos peptídeos às SUV foram calculadas as constantes de ligação (K) a partir dos dados da figura 27 (Tabela 6). Para o cálculo

de K foi considerado que a interação peptídeo-lipídio possui estequiometria 1:1; os valores de  $[\theta]_{222}$  em função da concentração lipídica foram aproximados para um hipérbole, devido a imprecisões na obtenção dos dados os valores de K possuem uma confiabilidade relativa.

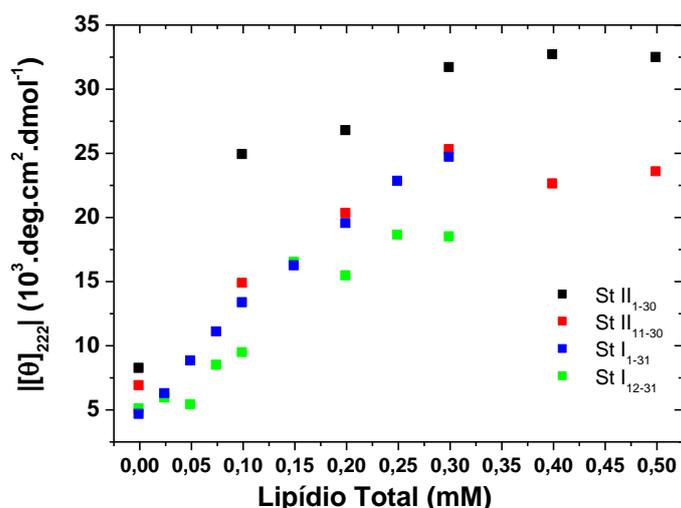


Figura 27.  $|\theta|_{222}$  nos espectros de CD de St II<sub>1-30</sub>, St II<sub>11-30</sub>, St I<sub>1-31</sub> e St I<sub>12-31</sub>, em função da concentração de SUV de POPC:POPA (90:10), pH 7,0.

Tabela 6. Constantes de ligação (K) dos peptídeos a SUV e micelas de diferentes composições lipídicas, pH 7,0.

Peptídeo	K x 10 <sup>3</sup> (M <sup>-1</sup> )					
	Carga líquida	POPC: POPA (90:10)	POPC:SM:POPA (80:10:10)	POPC:SM:POPA (75:15:10)	LPC	LPC:LPA (90:10)
St II <sub>1-30</sub>	+2	13	13	21	8,4	19
St II <sub>11-30</sub>	+2	9,5	9,1	12	3,5	16
St I <sub>1-31</sub>	0	8,2	--	--	19	9
St I <sub>12-31</sub>	+2	8,4	13	15	4,4	11

Os valores da constante de ligação (Tabela 6) sugerem que St II<sub>1-30</sub> se ligou em maior extensão às SUV. A ligação as vesículas contendo POPA se deu na ordem: St II<sub>1-30</sub> > St II<sub>11-30</sub> ≈ St I<sub>1-31</sub> ≈ St I<sub>12-31</sub>.

A maior ligação dos peptídeos às vesículas contendo POPA evidência o papel de interações eletrostáticas para a interação peptídeo-membrana. A ligação em menor extensão de St I<sub>1-31</sub> em comparação com St II<sub>1-30</sub> deve-se, provavelmente, à presença dos resíduos carregados negativamente na região correspondente aos primeiros 11 resíduos de St I<sub>1-31</sub> (Glu2, Asp9) que, devido à repulsão eletrostática, levariam a uma diminuição da afinidade do peptídeo pela membrana.

#### **4.1.2.3 SUV contendo o esfingofosfolípido SM**

Para analisar a influência do esfingofosfolípido SM na interação peptídeo-membrana foi estudada a interação com SUV de POPC:SM (90:10). A figura 28 mostra os espectros de CD dos peptídeos na presença de concentrações crescentes de membranas modelo.

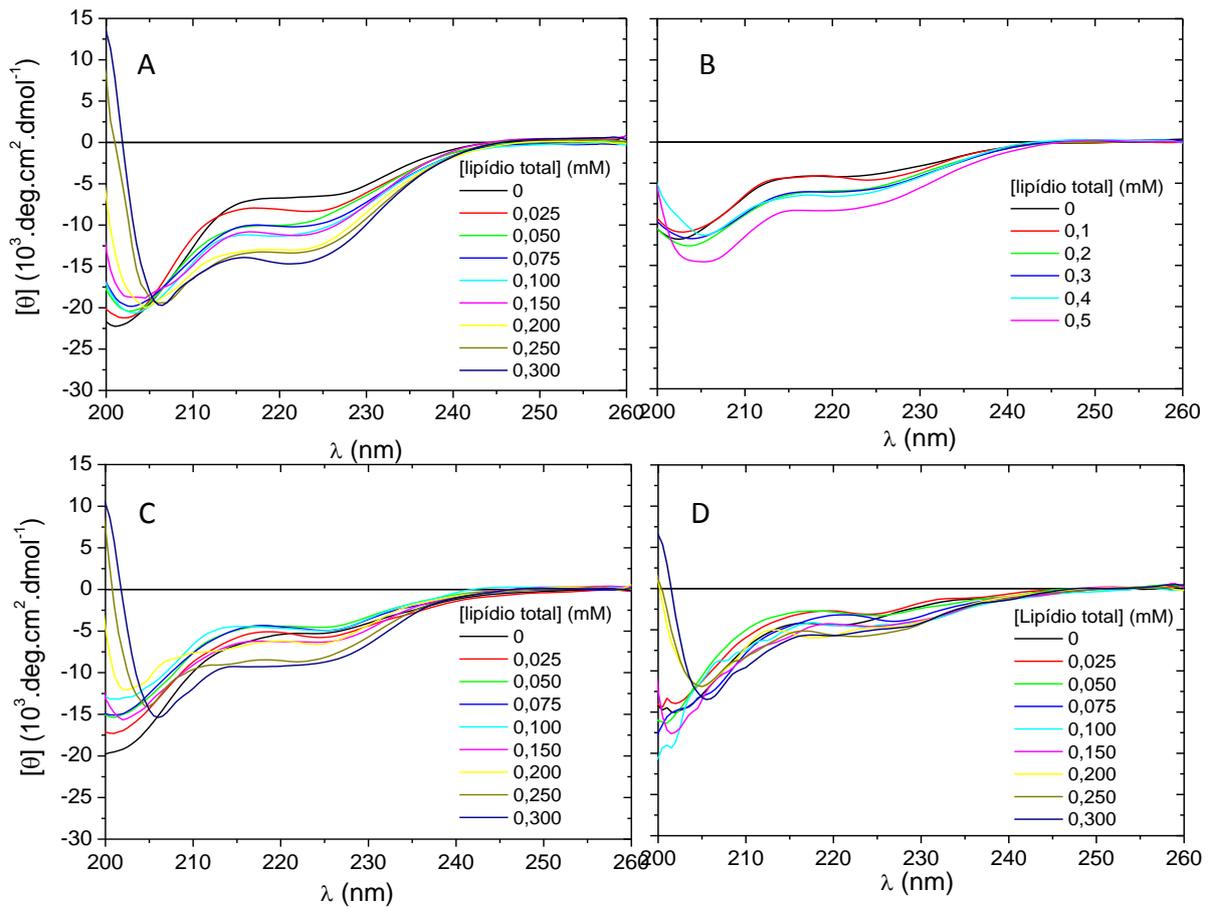


Figura 28. Espectros de CD de St II<sub>1-30</sub> (A), St II<sub>11-30</sub> (B), St I<sub>1-31</sub> (C) e St I<sub>12-31</sub> (D) na presença de quantidades crescentes de SUV de POPC:SM (90:10), pH 7,0. [peptídeos] = 5 μM.

Diferentemente do que foi observado com vesículas contendo POPA (figura 26), não houve aquisição significativa de estrutura em  $\alpha$ -hélice na presença de SUV contendo 10% de SM. Os espectros de CD (figura 28) e os valores de  $[\theta]_{222}$  (figura 29) indicam que St II<sub>1-30</sub> adquiriu maior conteúdo de estrutura em  $\alpha$ -hélice, seguido de St I<sub>1-31</sub>. Apesar dos outros peptídeos apresentarem um pequeno aumento na intensidade de  $[[\theta]_{222}]$  na presença das vesículas de POPC:SM (figura 28), a figura 29 mostra que esse aumento não é significativo. O inserto da figura 29 mostra a variação de  $[[\theta]_{222}]$  para os espectros de CD dos peptídeos na presença de SUV de POPC. É possível observar que  $[\theta]_{222}$  variou de 2000 a 7500 deg.cm<sup>2</sup>.dmol<sup>-1</sup>. Na

presença de SM (figura 29) apenas St II<sub>1-30</sub> e St I<sub>1-31</sub>, apenas em concentrações mais altas de lipídio, apresentam valores de  $|\theta_{222}|$  maiores que  $7500 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ . Para St II<sub>11-30</sub> foi observado  $|\theta_{222}| > 7500 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$  apenas na presença de 0,5 mM de lipídio total. A pequena variação dos valores de  $|\theta_{222}|$  para St II<sub>11-30</sub>, St I<sub>1-31</sub> e St I<sub>12-31</sub> pode ser resultado do achatamento dos espectros de CD devido ao espalhamento de luz pelas vesículas (Bustamante et al., 1983; Wallace e Mao, 1984; Wallace e Teeters, 1987). Devido à pequena variação dos valores de  $|\theta_{222}|$  para St I<sub>1-31</sub>, St I<sub>12-31</sub> e St II<sub>11-30</sub> não foi possível efetuar o cálculo de K. O valor de  $K_{\text{pcsm}}$  obtido para St II<sub>1-30</sub> foi  $1,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ; este valor da constante de ligação é essencialmente idêntico ao obtido para a ligação de St II<sub>11-30</sub> as SUV de POPC:POPA (90:10) (Tabela 6), sugerindo que SM é tão importante quanto as interações eletrostáticas para a ligação deste peptídeo às SUV.

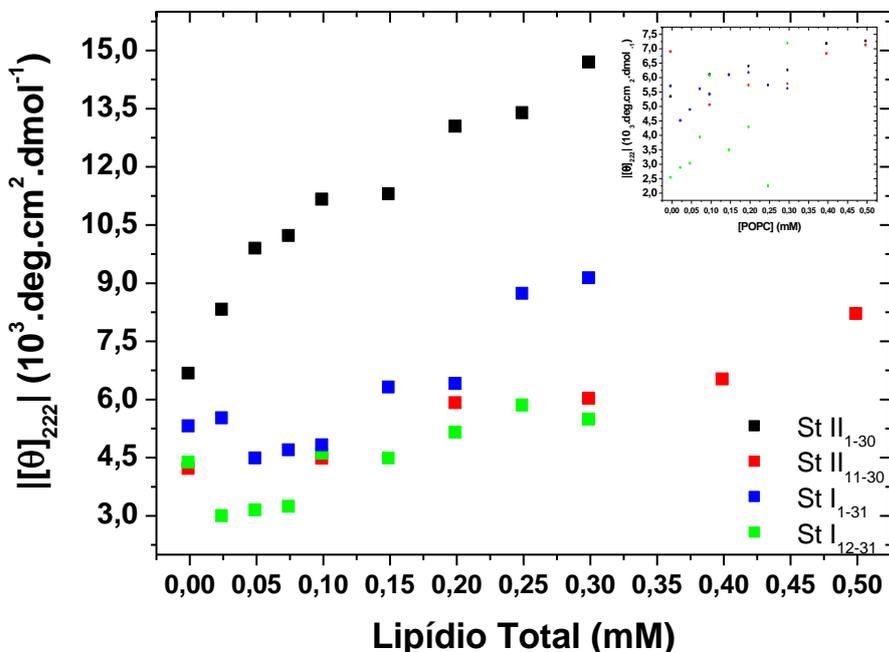


Figura 29.  $|\theta_{222}|$  nos espectros de CD de St II<sub>1-30</sub>, St II<sub>11-30</sub>, St I<sub>1-31</sub> e St I<sub>12-31</sub>, em função da concentração de SUV de POPC:SM (90:10), pH 7,0. No inserto estão graficados os valores de  $|\theta_{222}|$  para os peptídeos em função da concentração de SUV de POPC, pH 7,0.

Os espectros de CD da interação dos peptídeos com SUV contendo SM indicam que, apesar de não haver carga líquida negativa na superfície da membrana, os peptídeos St II<sub>1-30</sub> e St I<sub>1-31</sub>, em menor extensão, ligaram-se às SUV contendo o esfingolípido. Essa interação sugere que SM é importante para a ligação dos peptídeos à membrana. A interação de St II<sub>1-30</sub> com as vesículas zwitteriônicas contendo SM e não com as vesículas contendo apenas POPC, também zwitteriônicas, poderia indicar uma preferência por SM, o receptor putativo das toxinas na membrana. St II<sub>1-30</sub>, que possui o segmento 1-10 rico em resíduos hidrofóbicos, interage em maior extensão com as vesículas; possivelmente essa região é importante para a interação do peptídeo com bicamadas contendo SM. A menor extensão da ligação de St I<sub>1-31</sub> às SUV provavelmente deve-se a presença dos resíduos polares Ser1 e carregados Glu2 e Asp9 que diminuem a hidrofobicidade do segmento correspondente aos primeiros 11 aminoácidos. A diferença na interação de ambos com as vesículas contendo SM esta de acordo com os resultados de atividade hemolítica, St II<sub>1-30</sub> possui maior atividade frente a eritrócitos do que St I<sub>1-31</sub> (Cilli et al., 2007).

Para examinar a importância de interações eletrostáticas em presença de SM foi também estudada a interação dos peptídeos com vesículas de composição POPC:SM:POPA (80:10:10) (figura 30). De maneira similar ao observado com SUV contendo 10% do fosfolípido carregado negativamente POPA (figura 26), todos os peptídeos adquiriram estrutura em  $\alpha$ -hélice, indicando ligação às vesículas. Novamente pode-se observar que St II<sub>1-30</sub> adquiriu maior conteúdo de estrutura  $\alpha$ -helicoidal, seguido por St I<sub>1-31</sub>, St II<sub>11-30</sub> e St I<sub>12-31</sub>. A comparação dos valores de

$[[\theta]_{222}]$  (figura 31) mostra mais claramente a diferença na aquisição de estrutura  $\alpha$ -helicoidal pelos peptídeos.

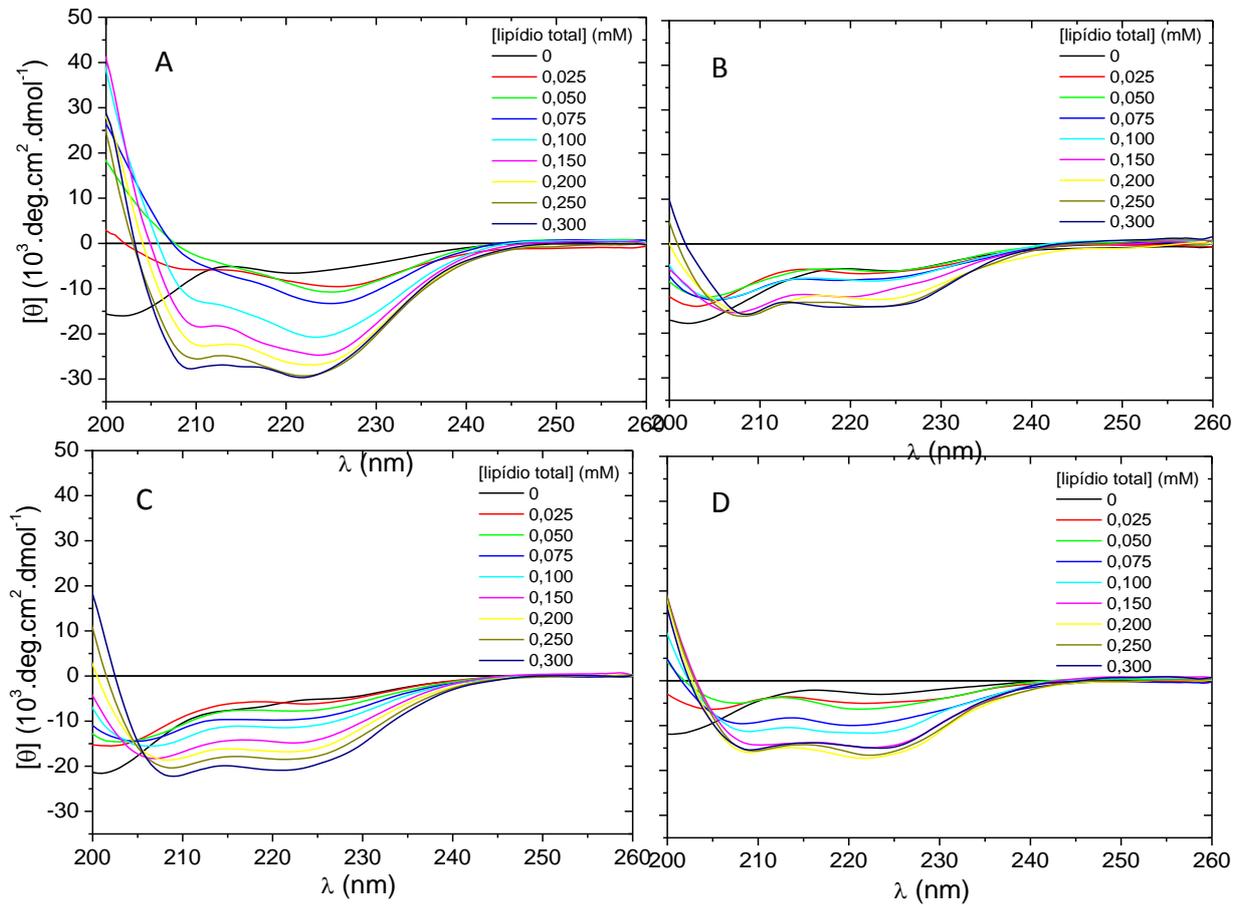


Figura 30. Espectros de CD de St II<sub>1-30</sub> (A), St II<sub>11-30</sub> (B), St I<sub>1-31</sub> (C) e St I<sub>12-31</sub> (D) na presença de quantidades crescentes de SUV de POPC:SM:POPA (80:10:10), pH 7,0. [peptídeos] = 5  $\mu$ M.

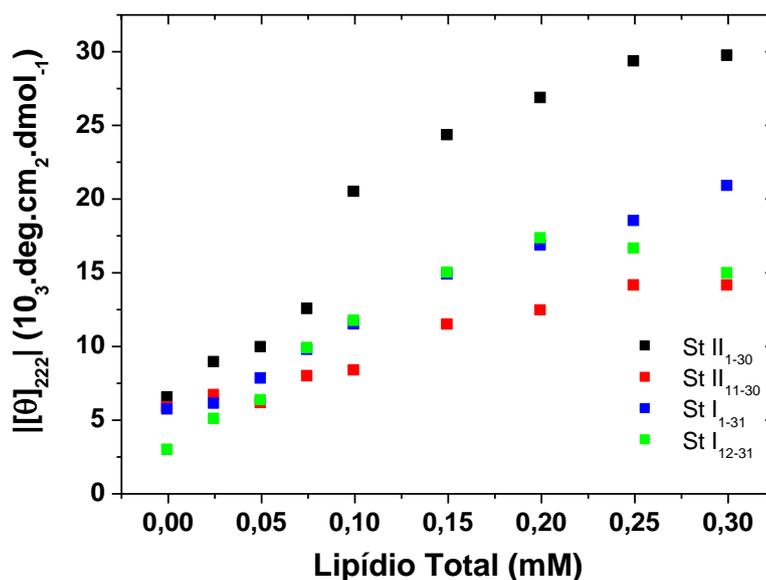


Figura 31.  $|\theta]_{222}|$  para os espectros de CD de St II<sub>1-30</sub>, St II<sub>11-30</sub>, St I<sub>1-31</sub> e St I<sub>12-31</sub>, em função da concentração de SUV POPC:SM:POPA (80:10:10), pH 7,0.

Os valores da constante de ligação ( $K_{sm10}$ ) para os peptídeos (Tabela 6) sugerem que St II<sub>11-30</sub> se liga às SUV de POPC:SM:POPA (80:10:10) na mesma extensão que às SUV de POPC:POPA (90:10), enquanto que St II<sub>1-30</sub> e St I<sub>12-31</sub> se ligam mais a estas SUV. Para St II<sub>1-30</sub> os valores de  $|\theta]_{222}|$  foram melhor descritos como uma sigmóide, indicando um processo de ligação cooperativo. O valor de  $K_{sm10}$  não pode ser calculado para St I<sub>1-31</sub>, pois não foi observada a saturação da ligação deste peptídeo nas condições do estudo. Isso poderia ser um indicativo da menor ligação deste peptídeo às SUV.

Para verificar mais detalhadamente o papel de SM na interação peptídeo-membrana foi estudada a interação dos peptídeos com SUV de composição POPC:SM:POPA (75:15:10) (figura 32). Assim como na presença de POPC:SM:POPA (80:10:10), todos os peptídeos apresentam espectros característicos de estrutura  $\alpha$ -hélicoidal. O aumento do conteúdo de SM diminuiu a intensidade dos espectros de St II<sub>1-30</sub> quando comparados com os espectros da

figura 30A, porém houve um aumento na intensidade dos espectros para os outros peptídeos.

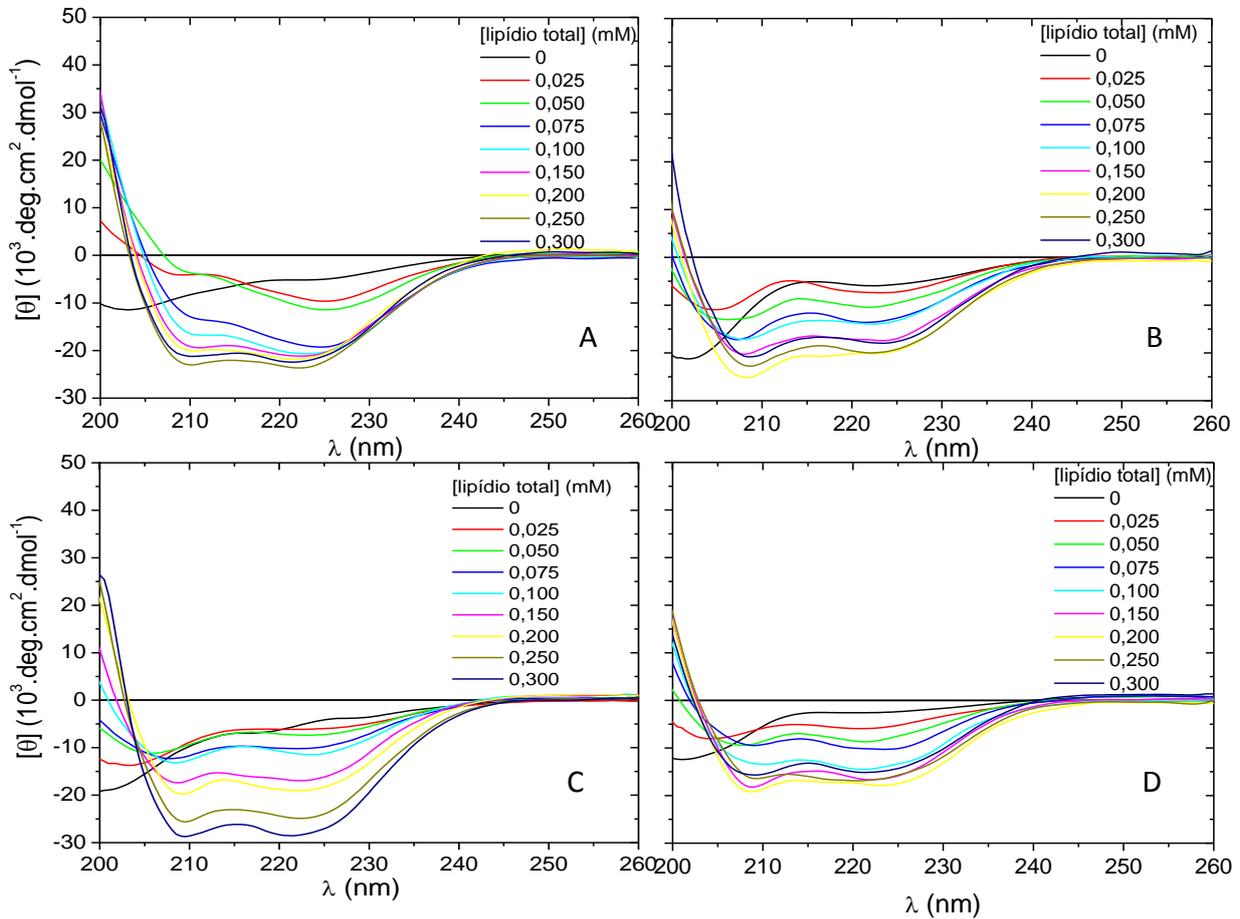


Figura 32. Espectros de CD de St II<sub>1-30</sub> (A), St II<sub>11-30</sub> (B), St I<sub>1-31</sub> (C) e St I<sub>12-31</sub> (D) na presença de quantidades crescentes de SUV de POPC:SM:POPA (75:15:10), pH 7,0. [peptídeos] = 5 μM.

A figura 33 apresenta os valores de  $||[\theta]_{222}|$  para os peptídeos, obtidos a partir dos espectros da figura 32. Os valores de  $||[\theta]_{222}|$  para St II<sub>1-30</sub> também possuem um comportamento sigmoidal, sugerindo um processo de ligação cooperativo. Além disso, foi observado que  $||[\theta]_{222}|$  para este peptídeo aumenta até 0,1 mM de lipídio total permanecendo praticamente constante para as concentrações mais altas, indicando que praticamente todo o peptídeo já se encontra totalmente ligado às SUV a partir desta concentração. Esse comportamento é bastante diferente do observado

para a composição contendo 10% de SM (figura 31): na presença destas SUV os valores de  $||[\theta]_{222}|$  aumentaram até 0,25 mM de lipídio total, permanecendo constantes a partir dessa concentração.

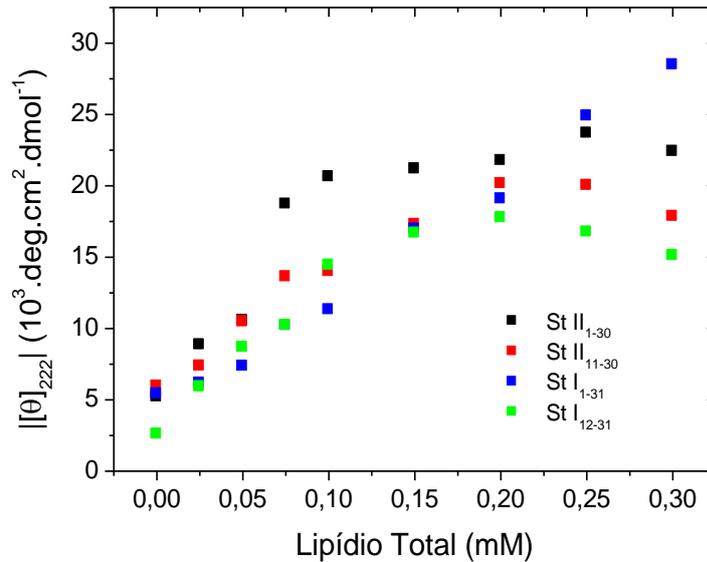


Figura 33.  $||[\theta]_{222}|$  nos espectros de CD de St II<sub>1-30</sub>, St II<sub>11-30</sub>, St I<sub>1-31</sub> e St I<sub>12-31</sub>, em função da concentração de SUV de POPC:SM:POPA (75:15:10), pH 7,0.

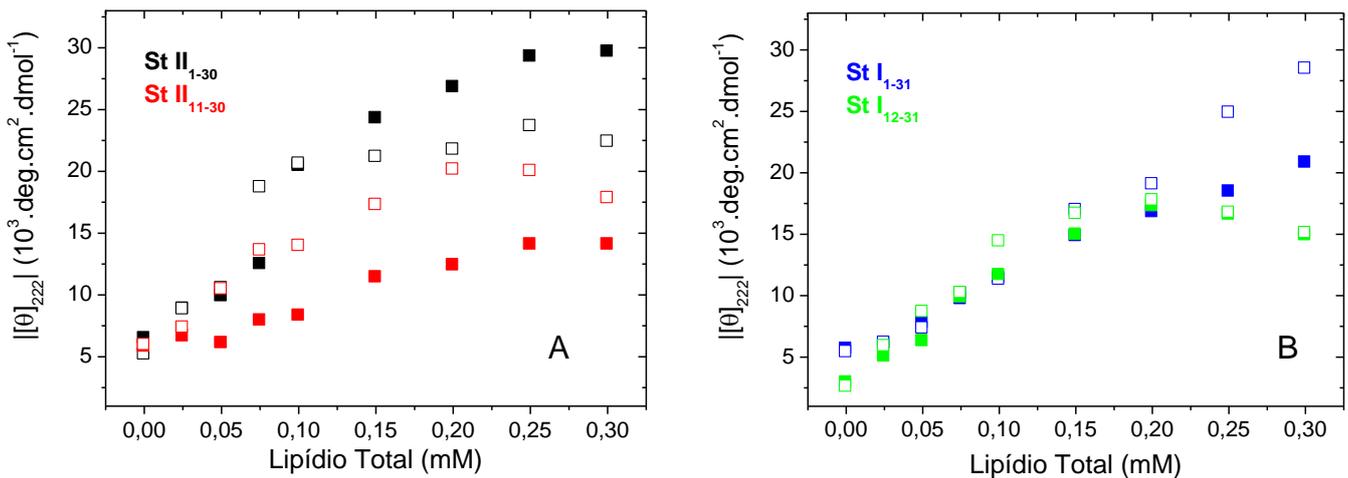


Figura 34.  $||[\theta]_{222}|$  nos espectros de CD de (A) St II<sub>1-30</sub> e St II<sub>11-30</sub>, (B) St I<sub>1-31</sub> e St I<sub>12-31</sub>, em função da concentração de SUV de POPC:SM:POPA (80:10:10, quadrados fechados) e (75:15:10, quadrados abertos), pH 7,0.

Para maior clareza na comparação entre os valores de  $[\theta]_{222}$  nos espectros na presença de SUV de POPC:SM:POPA (80:10:10) e POPC:SM:POPA (75:15:10), esses valores para os diferentes peptídeos nas duas composições estão apresentados na figura 34. Na presença de SUV contendo 15% de SM os valores de  $[[\theta]_{222}]$  de St II<sub>1-30</sub> foram menores do que para 10% de SM.  $[[\theta]_{222}]$  para St II<sub>11-30</sub> e St I<sub>1-31</sub> aumentou em relação às SUV contendo 10% de SM; por outro lado, o aumento do conteúdo de SM não afetou o conteúdo de estrutura secundária de St I<sub>12-31</sub>. As constantes de ligação ( $K_{sm15}$ ) calculadas para os peptídeos na presença de SUV de POPC:SM:POPA (75:15:10) (Tabela 6) indicam que a ligação de St II<sub>11-30</sub> às SUV aumentou com o aumento do conteúdo de SM, apenas a ligação de St I<sub>12-31</sub> pareceu não ser afetada. Apesar dos valores de  $[[\theta]_{222}]$  para St II<sub>1-30</sub> na presença de SUV contendo 15% de SM serem menores do que para 10% de SM, o aumento do conteúdo de desse lipídio parece ter aumentado a afinidade do peptídeo pela bicamada. É possível que a diminuição de  $[[\theta]_{222}]$  se deva ao aumento do espalhamento de luz pelas vesículas devido ao aumento do conteúdo de SM. O maior espalhamento também poderia ser indicativo de uma maior interação com as SUV caso St II<sub>1-30</sub> promova agregação das vesículas.

St I<sub>1-31</sub> mostrou um comportamento bastante diferente dos demais peptídeos, não apresentando uma estabilização dos valores de  $[[\theta]_{222}]$  em nenhuma das duas composições de SUV, indicando que a ligação não atingiu a saturação.

#### **4.1.2.4 SUV contendo DPPC, um fosfolípido formador de fase ordenada**

Para verificar a especificidade da interação dos peptídeos com SM foi estudada a interação de St II<sub>1-30</sub> com SUV de composição POPC:DPPC (90:10)

(figura 35). SM e DPPC possuem temperatura de transição entre as fases gel ( $S_o$ ) e líquido-cristalina ( $L_d$ ),  $T_m$ , acima da temperatura ambiente, DPPC 41°C e SM de cérebro na faixa entre 35 e 45°C, dependendo do conteúdo de cadeias esteroil (Koynova et al., 1995). Assim, SM e DPPC se encontram na fase  $S_o$  à temperatura ambiente. Estudos calorimétricos de bicamadas de composição POPC:DPPC (Curatolo et al., 1995; Shoemaker et al., 2003) ou POPC:SM de cérebro (Pokorny et al., 2006), contendo mais de 30% e 20% de DPPC e SM respectivamente, mostraram que há coexistência de fases  $S_o$  e  $L_d$  para ambos os sistemas à temperatura ambiente.

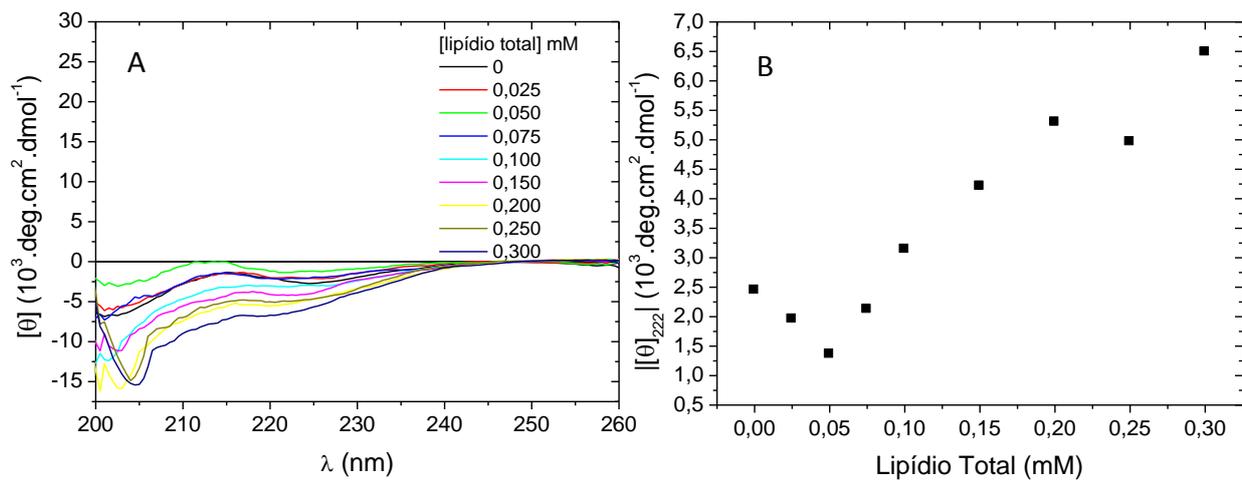


Figura 35. (A) Espectros de CD de St II<sub>1-30</sub>, 5 μM, na presença de quantidades crescentes de SUV de POPC:DPPC (90:10), pH 7,0. (B) |[θ]<sub>222</sub>| para os espectros de CD de St II<sub>1-30</sub> em função da concentração de SUV de POPC:DPPC (90:10), pH 7,0.

Os valores de |[θ]<sub>222</sub>| para os espectros de St II<sub>1-30</sub> na presença de SUV contendo 10% de DPPC são menores do que para a interação com SUV de POPC:SM (90:10). Neste estudo, o próprio peptídeo em solução apresentou um espectro de CD com intensidade menor do que o espectro obtido no estudo com SUV de POPC:SM (90:10) (figura 28A). Apesar dos valores menores de [θ]<sub>222</sub>, observou-se um aumento nos valores de |[θ]<sub>222</sub>| com o aumento da concentração de

SUV. Para o efeito da interação sobre os valores de  $[\theta]_{222}$  nos diferentes sistemas foi calculado o aumento de  $[\theta]_{222}$  ( $\Delta[\theta]$ ) em função da concentração de lipídio total em relação ao valor de  $[\theta]_{222}$  na ausência de SUV, sendo a porcentagem de  $\Delta[\theta]$  calculada pela equação 23:

$$\Delta[\theta]\% = \left( \frac{|[\theta]_{lip}| - |[\theta]_0|}{|[\theta]_0|} \right) \times 100 \quad (\text{eq.23}),$$

onde  $|[\theta]_{lip}|$  é o módulo de  $[\theta]_{222}$  na presença de diferentes concentrações de lipídio total e  $|[\theta]_0|$  é o módulo de  $[\theta]_{222}$  na ausência de lipídio. A figura 36 apresenta os valores de  $\Delta[\theta]$ , expressos em porcentagem, para St II<sub>1-30</sub> em função da concentração de SUV POPC:SM (90:10) e POPC:DPPC (90:10).

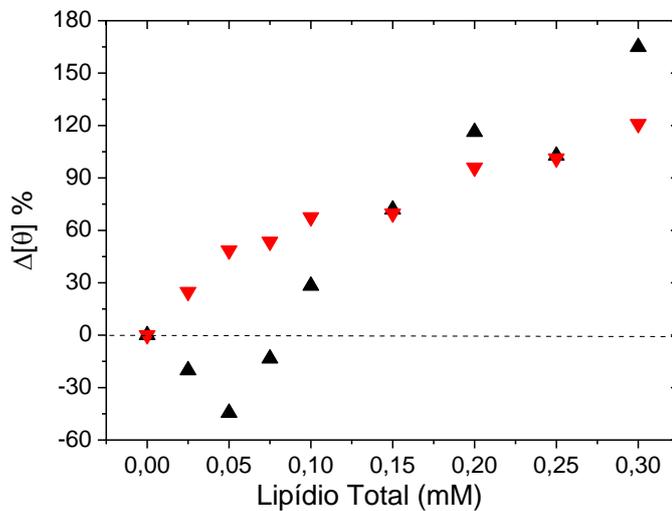


Figura 36. Valores de  $\Delta[\theta]$  expressos em porcentagem, calculados de acordo com a equação 23, para St II<sub>1-30</sub> em função da concentração de SUV de POPC:SM (90:10) (▼) e SUV de POPC:DPPC (90:10) (▲).

Pelos valores na figura 35 é possível observar que St II<sub>1-30</sub> interage com as SUV de ambas composições lipídicas. Inicialmente são observados valores negativos de  $\Delta[\theta]\%$  para a interação com SUV de POPC:DPPC (90:10), isso provavelmente se deve ao fato de que o peptídeo não interage com as SUV em

baixas concentrações de lipídio, não adquirindo estrutura em  $\alpha$ -hélice o que poderia levar a uma diminuição na intensidade do espectro devido ao espalhamento de luz causado pelas vesículas. Com o aumento da concentração de lipídio total é observado um aumento nos valores de  $\Delta[\theta]\%$ , o que indicaria que St II<sub>1-30</sub> estaria se ligando às vesículas e adquirindo estrutura helicoidal. Para compreender melhor a interação de St II<sub>1-30</sub> com as bicamadas contendo DPPC, foram realizados estudos de EPR com membranas de POPC:DPPC nas composições 90:10 e 50:50 (seção 4.2.1.1.2).

### **4.1.3 Interação com Micelas**

#### **4.1.3.1 Micelas do lisofosfolípido zwitteriônico LPC**

Além dos estudos com bicamadas (SUV), também foram obtidos espectros de CD dos peptídeos na presença de micelas de LPC e LPC:LPA (90:10). A interação dos peptídeos com micelas também foi acompanhada pelo aumento dos valores de  $||[\theta]_{222}|$  (figuras 37 e 39).

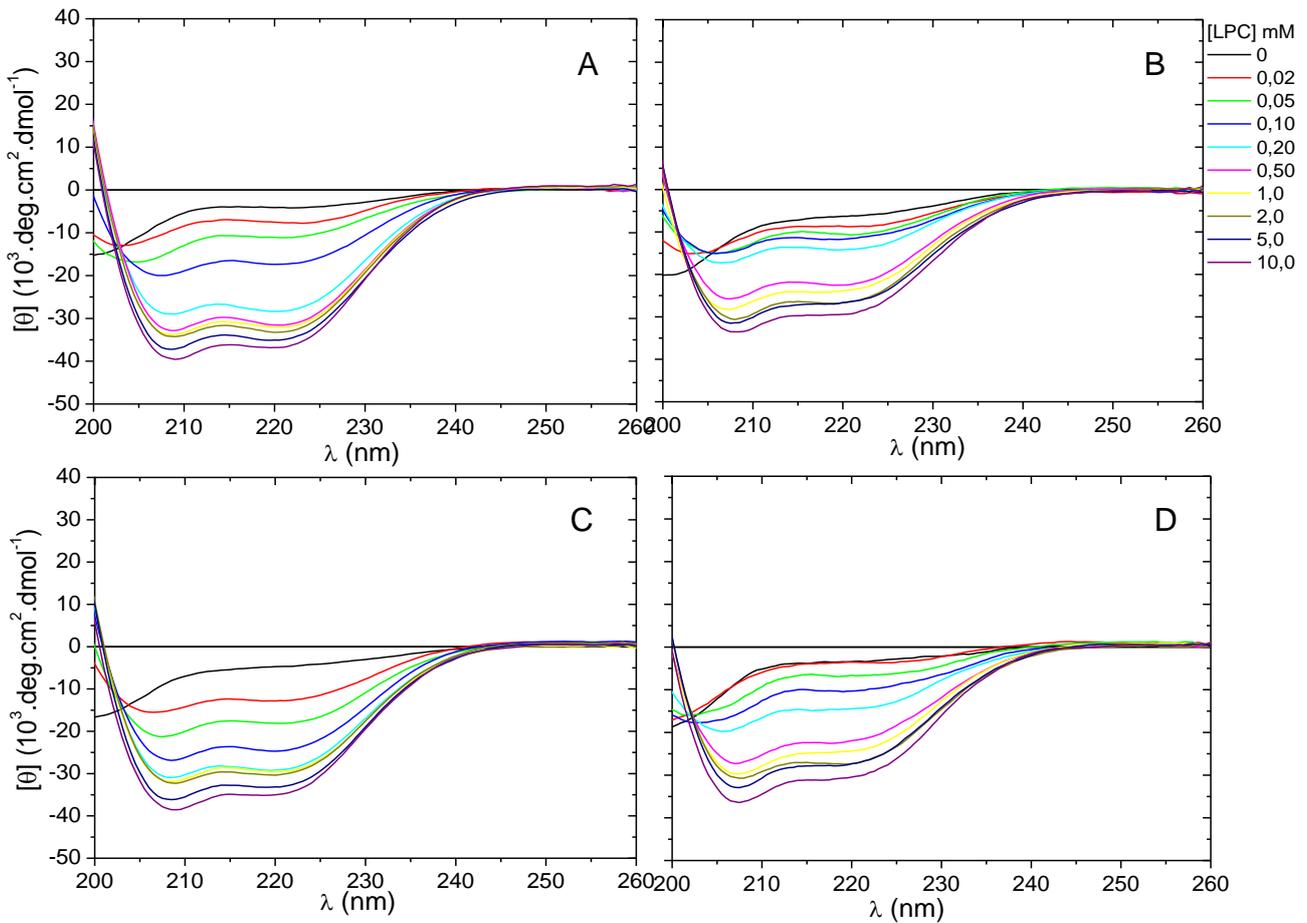


Figura 37. Espectros de CD de St II<sub>1-30</sub> (A), St II<sub>11-30</sub> (B), St I<sub>1-31</sub> (C) e St I<sub>12-31</sub> (D) na presença de concentrações crescentes de LPC, pH 7,0. [peptídeos] = 12 μM.

Os espectros de CD mostram que os peptídeos adquiriram estrutura em  $\alpha$ -hélice na presença de concentrações crescentes de LPC (figura 37), indicando sua ligação às micelas. As concentrações utilizadas encontram-se acima da concentração micelar crítica de 0,007 mM (CMC) da 1-palmitoil-2-hidroxi-fosfatidilcolina empregada (Stafford et al., 1988; Heerklotz e Epanand, 2001).

De maneira similar ao observado para a interação dos peptídeos com as SUV de POPC:POPA (90:10), POPC:SM (90:10), POPC:SM:POPA (80:10:10) e POPC:SM:POPA (75:15:10), St II<sub>1-30</sub> e St I<sub>1-31</sub> adquiriram maior conteúdo de estrutura  $\alpha$ -helicoidal, seguidos de St II<sub>11-30</sub> e St I<sub>12-31</sub>, como indicam os valores de  $[[\theta]_{222}]$

(figura 38). A figura 38 apresenta os valores de  $||\theta]_{222}|$  para os peptídeos em função da concentração de LPC (símbolos cheios) e POPC (símbolos vazios). Os valores de  $||\theta]_{222}|$  mostram que, enquanto os peptídeos interagiram com as micelas de LPC, adquirindo estrutura em  $\alpha$ -hélice, o mesmo não ocorreu com as SUV de POPC. Os valores da constante de ligação ( $K_{lpc}$ ) (Tabela 6), calculadas a partir dos valores de  $||\theta]_{222}|$  (figura 38) indicam que a ligação dos peptídeos às micelas se deu na seguinte ordem:  $St\ I_{1-31} > St\ II_{1-30} \approx St\ II_{11-30} \approx St\ I_{12-31}$ .

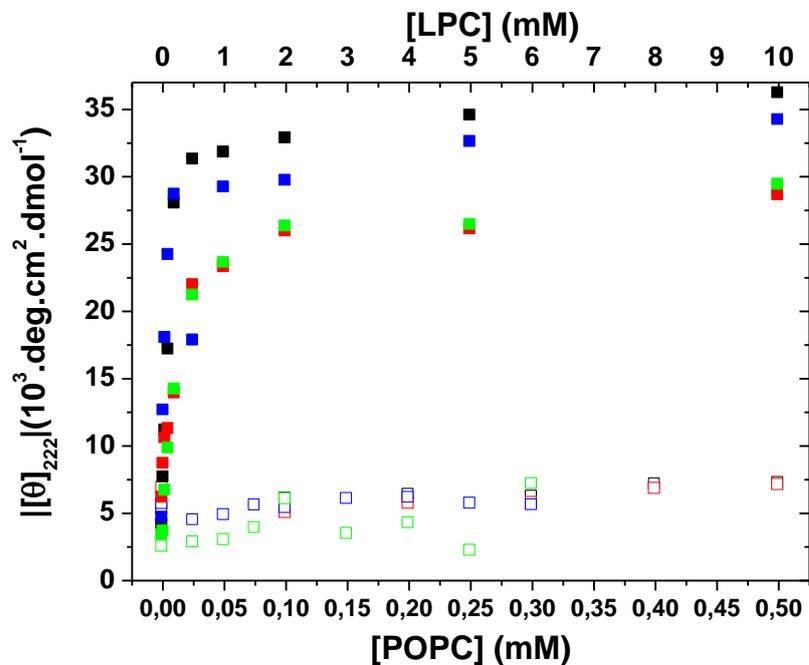


Figura 38.  $||\theta]_{222}|$  para os espectros de CD de  $St\ II_{1-30}$  (■, □),  $St\ II_{11-30}$  (■, □),  $St\ I_{1-31}$  (■, □) e  $St\ I_{12-31}$  (■, □), na presença de concentrações crescentes de LPC (símbolos cheios) e POPC (símbolos vazios), pH 7,0.

#### 4.1.3.2 Micelas contendo o lisofosfolípido negativamente carregado LPA

Foi também estudada a interação dos peptídeos com micelas de LPC:LPA na proporção 90:10 (figura 39). Da mesma maneira que com LPC, todos os peptídeos adquiriram estrutura em  $\alpha$ -hélice. Na figura 40 são apresentados os valores de  $||\theta]_{222}|$  para os espectros dos peptídeos na presença de concentrações crescentes

de LPC:LPA (90:10) (símbolos cheios) e POPC:POPA (90:10) (símbolos vazios). Os valores de  $||[\theta]_{222}|$  para St II<sub>1-30</sub>, St II<sub>11-30</sub> e St I<sub>12-31</sub> são menores dos que para St I<sub>1-31</sub> e, também, menores do que os obtidos dos espectros de CD dos peptídeos com micelas de LPC. Esta diminuição poderia ser resultado da agregação das micelas negativas por St II<sub>1-30</sub>, St II<sub>11-30</sub> e St I<sub>12-31</sub> que possuem carga teórica +2 a pH 7,0, St I<sub>1-31</sub>, que possui carga teórica zero a pH 7,0 não promoveria agregação.

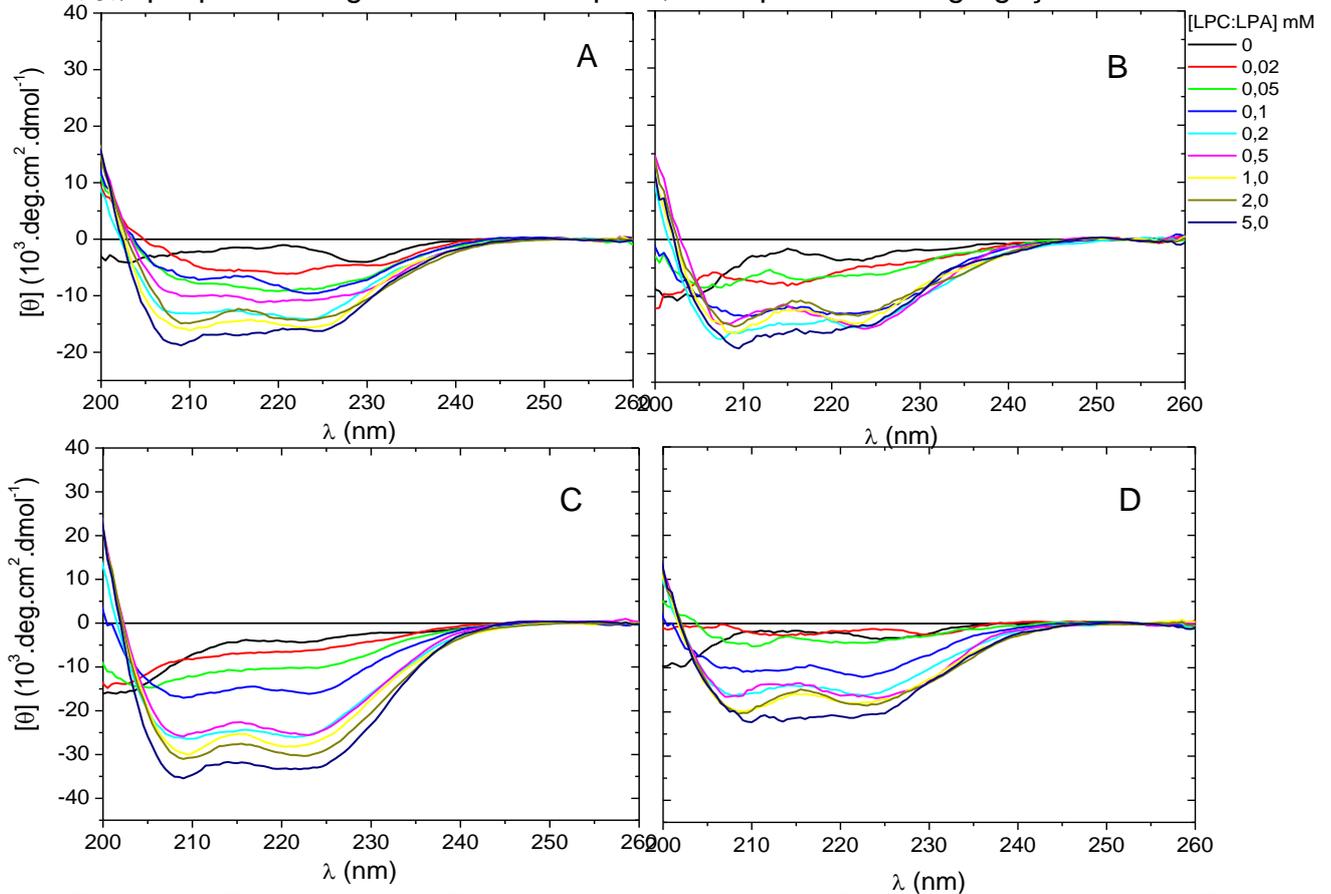


Figura 39. Espectros de CD de St II<sub>1-30</sub> (A), St II<sub>11-30</sub> (B), St I<sub>1-31</sub> (C) e St I<sub>12-31</sub> (D) na presença de concentrações crescentes micelas de LPC:LPA (90:10), pH 7,0. [peptídeos] = 12  $\mu$ M.

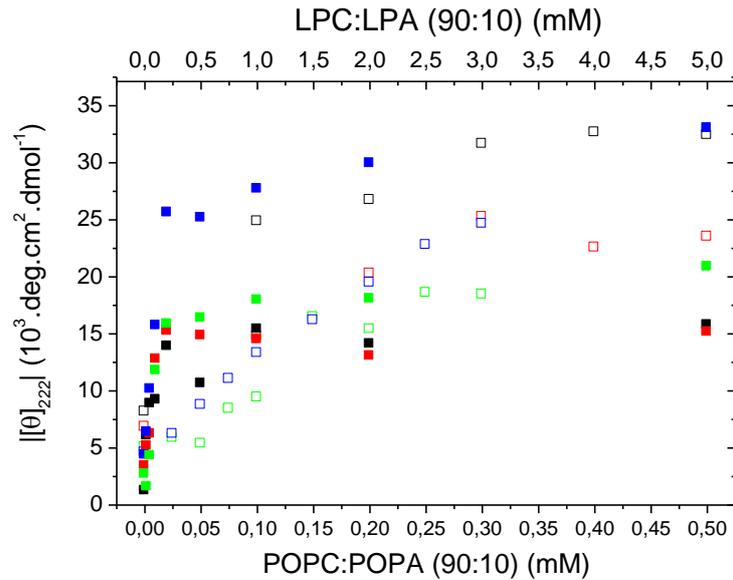


Figura 40.  $||[\theta]_{222}|$  para os espectros de CD de St II<sub>1-30</sub> (■, □), St II<sub>11-30</sub> (■, □), St I<sub>1-31</sub> (■, □) e St I<sub>12-31</sub> (■, □), na presença de quantidade crescente de micelas de LPC:LPA (90:10) (símbolos cheios) e SUV de POPC:POPA (90:10) (símbolos vazios), pH 7,0.

Os valores das constantes de ligação dos peptídeos às micelas ( $K_{LPA}$ ) (Tabela 6) sugerem que a introdução de LPA levou a um pequeno aumento da ligação de St II<sub>1-30</sub> e St I<sub>12-31</sub>, porém, a ligação de St II<sub>11-30</sub> e St I<sub>1-31</sub> essencialmente não sofreu alteração. Diferentemente do observado na figura 38, os peptídeos adquiriram estrutura  $\alpha$ -helicoidal tanto na presença de micelas contendo LPA quanto na presença de SUV contendo POPA (figura 40). Os valores de  $K_{PCPA}$  (Tabela 6) sugerem que a ligação dos peptídeos às SUV de POPC:POPA (90:10) é comparável a ligação destes à micelas de LPC:LPA (90:10).

Os resultados da interação dos peptídeos com micelas de LPC e LPC:LPA (90:10) sugerem que a presença de carga negativa é mais importante para a ligação dos peptídeos à SUV, do que para a ligação a micelas.

#### 4.2 Efeito da interação peptídeo-membrana na organização molecular de bicamadas e micelas - Estudos de EPR

Através de estudos de EPR foi examinado o efeito da interação peptídeo-membrana na organização molecular de bicamadas e micelas. Foi analisada a influência da composição lipídica, bem como o papel de interações eletrostáticas.

#### **4.2.1 Interação dos peptídeos com multibicamadas (MLV)**

Para investigar o efeitos dos peptídeos sobre a organização molecular de bicamadas foram obtidos espectros de EPR de marcadores de spin incorporados em MLV com as mesmas composições lipídicas empregadas nos estudos de CD: POPC, POPC:POPA (90:10), POPC:SM (90:10), e POPC:SM:POPA (80:10:10), e ainda POPC:SM (50:50).

Foi empregado o marcador 5-MeSL, um derivado do éster metílico do ácido esteárico e os marcadores fosfolipídicos 5-PCSL e 16-PCSL, que possuem o grupamento nitroxídeo respectivamente nos carbonos 5 e 16 da cadeia acila *sn*-2 do fosfolipídio (ver seção 3, Materiais e Métodos).

##### **4.2.1.1 Estudos com o marcador de spin 5-MeSL**

A figura 41 mostra os espectros de EPR de 5-MeSL incorporado em MLV de diferentes composições lipídicas na ausência (primeira linha) e na presença de St II<sub>1-30</sub>, St II<sub>11-30</sub>, St I<sub>1-31</sub> e St I<sub>12-31</sub>. Os espectros na ausência dos peptídeos (linhas pontilhadas) foram sobrepostos aos espectros na presença destes.

Os espectros de 5-MeSL incorporado em MLV de POPC, POPC:POPA (90:10), POPC:SM (90:10), POPC:SM:POPA (80:10:10), na ausência dos peptídeos, apresentam linhas relativamente estreitas, característicos do movimento pseudo-isotrópico do marcador, indicando que o marcador experimenta um ambiente com

relativa mobilidade e/ou pouca ordem. Os espectros foram analisados pela medida do parâmetro empírico  $h_0/h_{+1}$  (relação das linhas de campo central e campo baixo (Schreier et al., 1984, ver Materiais e Métodos)). A semelhança visual destes espectros (figura 41), refletida em valores de  $h_0/h_{+1}$  essencialmente iguais (1,98 para POPC; 1,93 para POPC:POPA; 2,02 para POPC:SM; 2,02 para POPC:SM:POPA), sugere que a organização molecular nestas bicamadas é semelhante. Em contrapartida, o espectro de 5-MeSL incorporado em MLV de POPC:SM (50:50) possui linhas mais alargadas, sugerindo um ambiente com menor mobilidade e/ou maior ordem. A interação dos peptídeos com MLV de POPC não promoveu alteração significativa dos espectros, sugerindo que os peptídeos não interagem significativamente com as vesículas.

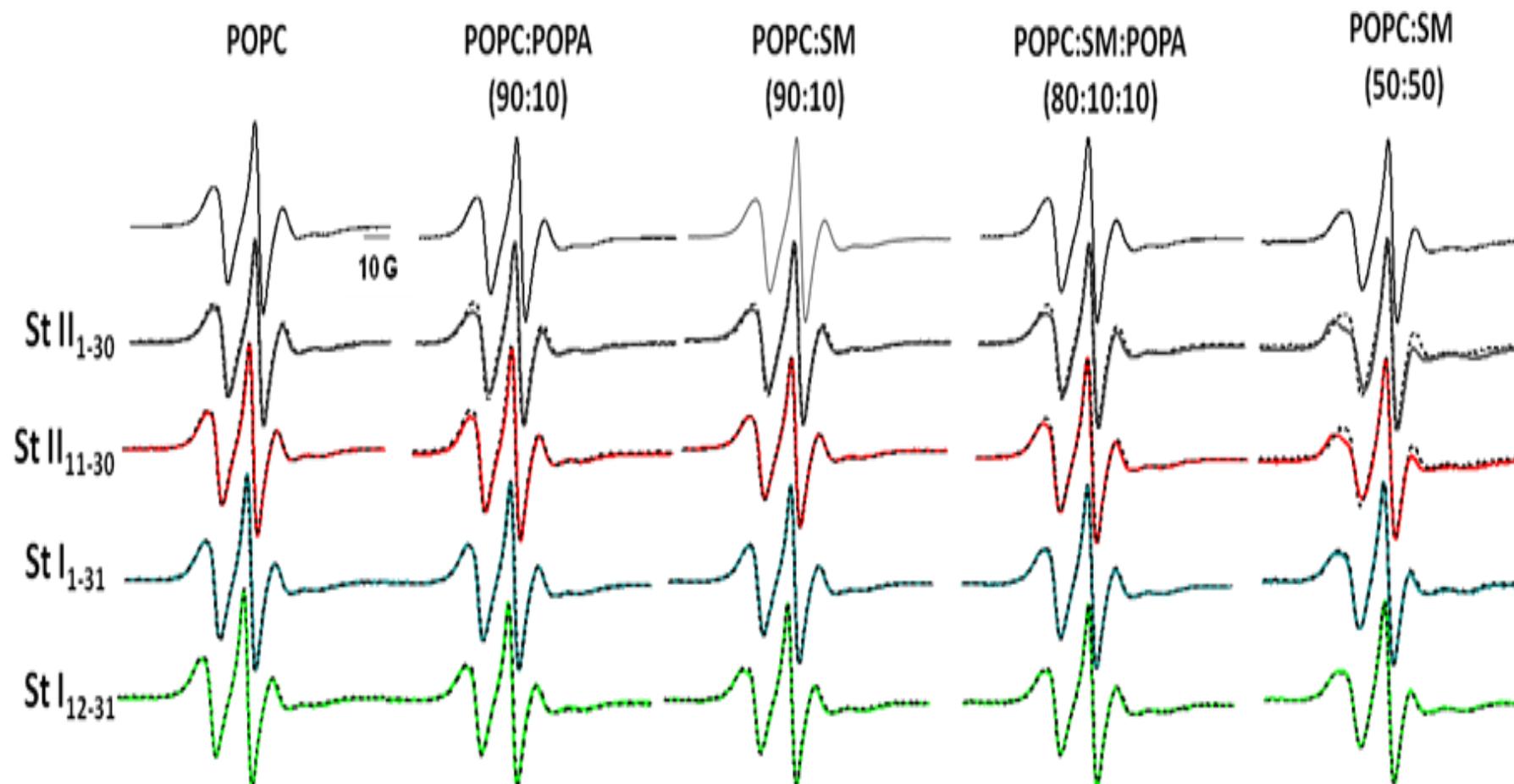


Figura 41. Espectros de EPR do marcador de spin 5-MeSL incorporado em MLV de diferentes composições lipídicas na ausência (espectros em preto e linhas pontilhadas) e na presença de St II<sub>1-30</sub> (cinza), St II<sub>11-30</sub> (vermelho), St I<sub>1-31</sub> (azul) e St I<sub>12-31</sub> (verde), pH 7,0.

Os valores da razão  $h_0/h_{+1}$  para os espectros de 5-MeSL em POPC (Tabela 7) mostram que apenas St II<sub>1-30</sub> promoveu um aumento dessa relação, indicando que o peptídeo se liga às vesículas, mesmo em pequena extensão, causando um aumento da organização molecular dos lipídios.

Tabela 7. Relação  $h_0/h_{+1}$  e parâmetro de ordem S para os espectros de 5-MeSL incorporados em MLV de diferentes composições lipídicas na ausência e na presença de St II<sub>1-30</sub>, St II<sub>11-30</sub>, St I<sub>1-31</sub> e St I<sub>12-31</sub>.<sup>a</sup>

	Razão $h_0/h_{+1}$				Parâmetro de ordem S
	POPC	POPC:POPA (90:10)	POPC:SM (90:10)	POPC:SM:POPA (80:10:10)	POPC:SM (50:50)
Ausência de peptídeo	1,98 ±0,02	1,93 ±0,06	2,02 ±0,06	2,02 ±0,08	0,568 ±0,029
St II <sub>1-30</sub>	2,16	2,26	2,26	2,30	0,673
St II <sub>11-30</sub>	2,07	2,06	2,08	2,10	0,632
St I <sub>1-31</sub>	2,04	1,97	2,01	2,10	0,589
St I <sub>12-31</sub>	2,02	2,09	2,26	2,20	0,575

<sup>a</sup>Desvio padrão calculado pelo programa OringinLAB 6.0 a partir da média de três experimentos.

A incorporação do fosfolípido negativamente carregado POPA às MLV aumentou a interação de St II<sub>1-30</sub> com a bicamada, como mostra o espectro de EPR da figura 41 que apresenta linhas significativamente mais alargadas em relação à ausência do peptídeo. Os valores de  $h_0/h_{+1}$  (Tabela 7) mostram que, enquanto St II<sub>1-30</sub> ligou-se às bicamadas, promovendo um aumento significativo na organização molecular dos lipídios, St II<sub>11-30</sub> e St I<sub>12-31</sub> parecem ter-se ligado em menor extensão, e St I<sub>1-31</sub> parece não se ter ligado.

Esses resultados não concordam com os obtidos por CD para os peptídeos na presença de SUV contendo POPA que indicam ligação de todos os peptídeos às bicamadas (figura 26). É possível que os peptídeos se liguem às bicamadas e permaneçam na interface cabeça polar-água, não penetrando na região hidrofóbica

da membrana. Desta forma, o movimento do marcador de spin, um ester metílico do ácido esteárico contendo o grupamento nitróxido em C5 seria pouco perturbado pela ligação dos peptídeos. O fato de que apenas St II<sub>1-30</sub> levou a alterações significativas na organização molecular dos lipídios de MLV contendo POPA poderia dever-se a que a região rica em resíduos hidrofóbicos (1 a 10), penetraria na bicamada, tendo mais efeito sobre a organização dos lipídios. Enquanto isso, os peptídeos mais curtos, por não possuírem essa região, teriam menor capacidade de alterar o empacotamento da bicamada. St I<sub>1-31</sub> poderia ligar-se, mas não causar alterações na organização molecular dos lipídios devido à presença de resíduos polares e carregados na sua região N-terminal, o que diminuiria a propensão à penetração desta região na bicamada lipídica.

De maneira semelhante ao observado para as MLV contendo 10% de POPA, a incorporação de 10% de SM (terceira coluna da figura 41) promoveu a interação de St II<sub>1-30</sub> com as bicamadas, como indicado pelo alargamento das linhas. Além disso, diferentemente do observado para POPC e POPC:POPA (90:10), St I<sub>12-31</sub> também promoveu um alargamento pequeno, porém significativo das linhas espectrais, o mesmo não ocorrendo para St II<sub>11-30</sub> e St I<sub>1-31</sub>. Esses resultados também concordam apenas parcialmente com o observado nos estudos de CD no caso de SUV de POPC:SM (90:10). Os valores do módulo de  $||[\theta]_{222}|$  (figura 29) e a constante de ligação calculada para St II<sub>1-30</sub> ( $K_{pcsm} = 1,7 \times 10^4$ ) mostraram que St II<sub>1-30</sub> adquiriu maior conteúdo de  $\alpha$ -hélice em relação aos demais peptídeos, porém os valores de  $||[\theta]_{222}|$  para St I<sub>12-31</sub> foram inferiores em relação aos dos outros peptídeos. Como 10% de SM não causa separação de fase (Pokorni et al., 2006), pode-se sugerir que o efeito é pelo menos parcialmente específico para a cabeça polar desse lipídio.

Como mencionado anteriormente, os estudos de EPR permitem uma maior variação da composição lipídica, já que não há perda de informação devido ao espalhamento de luz como ocorre no CD. Assim, foram realizados estudos com uma maior quantidade de SM nas MLV. A figura 41 mostra que os espectros de EPR de 5-MeSL incorporado a MLV de POPC:SM (50:50) apresenta linhas mais largas, com extremos internos e externos, permitindo o cálculo do parâmetro de ordem, S. A tabela 7 apresenta os valores de S (calculado conforme descrito em 3.4.2.3 e 3.4.3) para os espectros na ausência e na presença dos peptídeos. A tabela mostra que o efeito ocorreu na ordem: St II<sub>1-30</sub> > St II<sub>11-30</sub> > St I<sub>1-31</sub> > St I<sub>12-31</sub>.

Para comparar o efeito dos peptídeos nas diferentes composições lipídicas foi calculada a porcentagem de variação ( $\Delta\%$ ) para o parâmetro calculado para cada espectro na presença dos peptídeos:

$$\Delta\% = \left( \frac{P_{pep} - P_0}{P_0} \right) \times 100 \quad (\text{eq.24}),$$

onde  $P_{pep}$  e  $P_0$  são: o valor de S ou  $h_0/h_{+1}$  na presença e ausência dos peptídeos respectivamente. A figura 42 apresenta um histograma de  $\Delta\%$  para os peptídeos nas diferentes MLV.

O histograma da figura 42 mostra que, de maneira geral, St II<sub>1-30</sub> promoveu um maior aumento na organização molecular dos lipídios das bicamadas de todas as composições lipídicas, seguido de St II<sub>11-30</sub> e St I<sub>12-31</sub>. St I<sub>1-31</sub> causou menor alteração na organização molecular das bicamadas em relação aos outros peptídeos no caso das MLV de POPC:POPA (90:10), POPC:SM (90:10), POPC:SM (50:50) e POPC:SM:POPA (80:10:10). Apenas para as MLV de POPC, o valor de  $\Delta\%$  foi

maior do que o valor para  $St I_{12-31}$ , porém devido a limitações na precisão das medidas, mudanças menores que 5% não foram consideradas confiáveis.

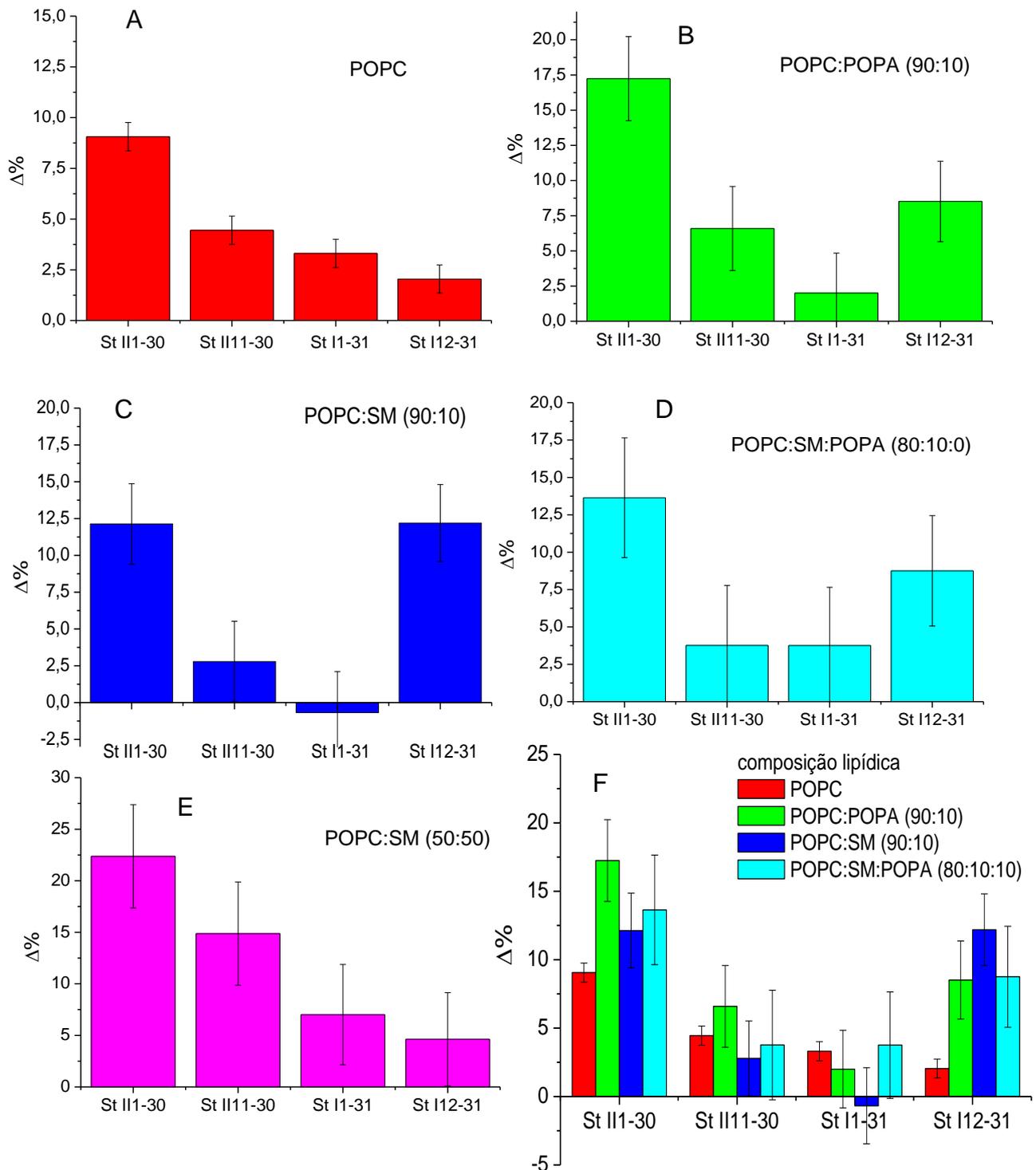


Figura 42. Porcentagem de mudança ( $\Delta\%$ ) de  $h_0/h_{+1}$  (histogramas A-D, F) ou S (histograma E) nos espectros de 5-MeSL causada pela adição de St II<sub>1-30</sub>, St II<sub>11-30</sub>, St I<sub>1-31</sub> e St I<sub>12-31</sub> em MLV de composição variada, pH 7,0. O valor de  $\Delta\%$  para todos os peptídeos foi calculado de acordo com a equação 24. O desvio padrão foi calculado a partir dos valores de desvio padrão obtidos para os espectros na ausência dos peptídeos.

#### 4.2.1.2 Estudo com o marcador 5-PCSL

Os espectros de EPR dos marcadores 5-MeSL, 5-PCSL e 16-PCSL, tanto na ausência quanto na presença dos peptídeos são bastante diferentes. Em sistemas lipídicos de fase fluida 5-PCSL apresenta um espectro contendo extremos internos e externos bem definidos (Hubbell e McConnell, 1971), enquanto que 5-MeSL apresenta um espectro de três linhas estreitas (de Paula e Schreier, 1995; Bianconi et al., 1988). Essas diferenças entre os espectros de 5-PCSL e 5-MeSL refletem as diferenças na anisotropia axial que o grupo nitróxido sente na posição C5 dos dois marcadores, consequência do fato que a cabeça polar do fosfolípido ancora fortemente a molécula à interface membrana-água, restringindo a mobilidade das cadeias acila. em contraposição a baixa polaridade do grupo éster não possibilita o ancoramento de 5-MeSL, fazendo com que o marcador tenha muito maior mobilidade e, possivelmente, monitore uma região mais profunda da bicamada.

Por outro lado, os espectros de 16-PCSL, em sistemas fluídos, também apresentam espectros com três linhas estreitas (Hubbell e McConnell, 1971). As diferenças nas larguras das linhas dos espectros dos marcadores 5-MeSL e 16-PCSL refletem diferenças nos ambientes que os marcadores experimentam dentro da bicamada; os espectros de 16-PCSL refletem o ambiente do core hidrofóbico da bicamada, sendo que o nitróxido se encontra próximo às metilas terminais dos lipídios. Dessa forma o marcador experimenta maior liberdade de movimento.

A figura 43 apresenta os espectros de EPR de 5-PCSL incorporado em MLV de composições: POPC, POPC:POPA (90:10), POPC:SM (90:10), POPC:SM (50:50) e POPC:SM:POPA (80:10:10).

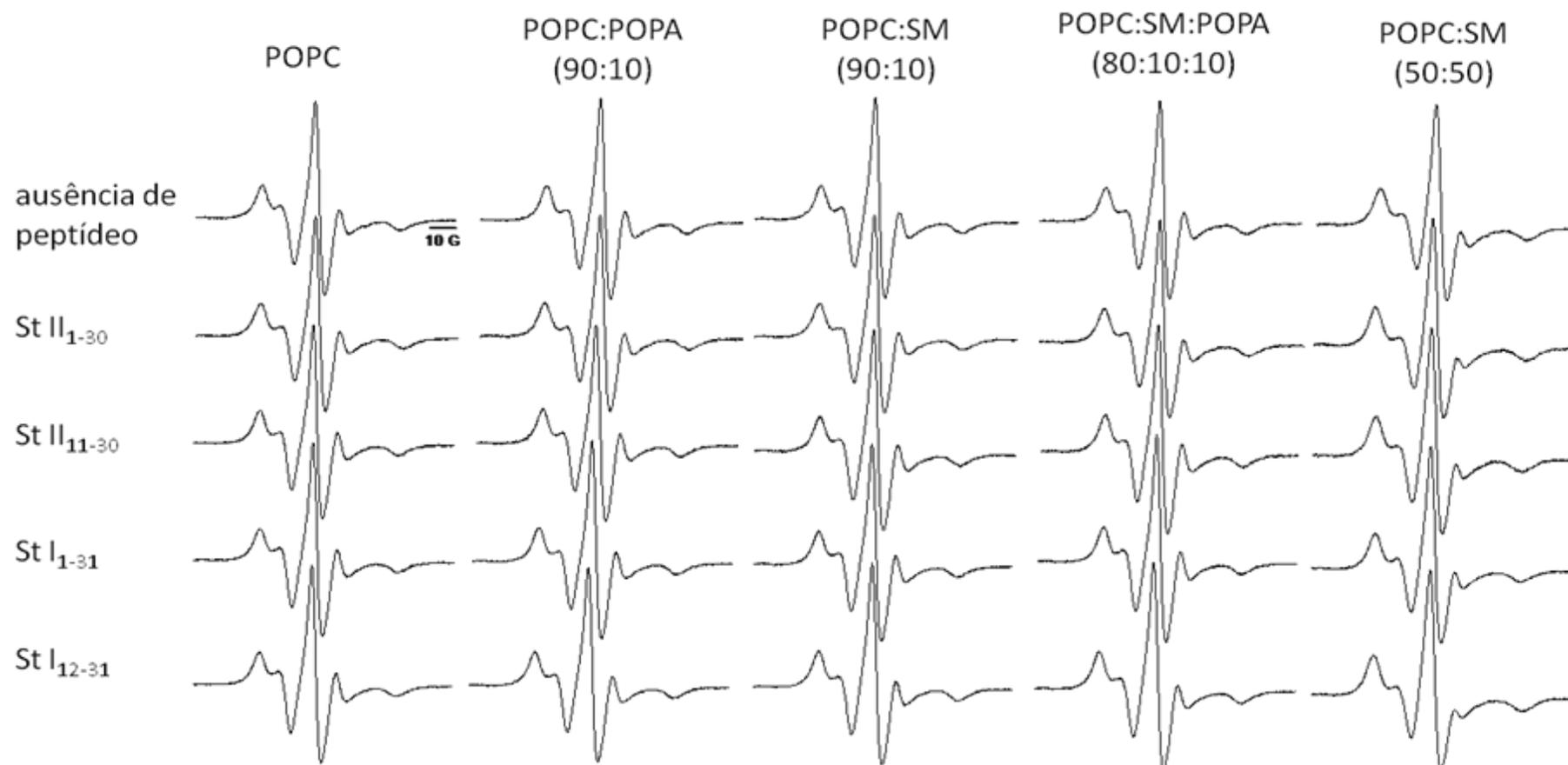


Figura 43. Espectros de EPR do marcador 5-PCSL incorporado em MLV de composição POPC, POPC:POPA (90:10), POPC:SM (90:10), POPC:SM:POPA (80:10:10) e POPC:SM (50:50) na ausência e na presença de St II<sub>1-30</sub>, St II<sub>11-30</sub>, St I<sub>1-31</sub> e St I<sub>12-31</sub>, pH 7,0.

Para todos os espectros do marcador 5-PCSL incorporado nas diferentes MLV, extremos internos e externos foram observados. Todos os espectros possuem forma bastante similar com exceção do espectro do marcador em MLV contendo 50% de SM. Neste sistema, mesmo na ausência de peptídeo, são observadas maiores valores de  $2A_{\parallel}$  e uma diminuição significativa na altura da linha estreita de campo alto. Os valores de S calculados a partir dos espectros da figura 43 estão na tabela 8.

Tabela 8. Valores de S obtidos dos espectros do marcado 5-PCSL incorporado em MLV de diferentes composições lipídicas na ausência e na presença de peptídeos.<sup>a</sup>

Peptídeo	POPC	POPC:POPA (90:10)	POPC:SM (90:10)	POPC:SM:POPA (80:10:10)	POPC:SM (50:50)
ausência	0,691 ±0,006	0,689 ±0,012	0,709 ±0,003	0,708 ±0,003	0,754 ±0,012
St II <sub>1-30</sub>	0,719	0,733	0,729	0,735	0,789
St II <sub>11-30</sub>	0,689	0,691	0,712	0,705	0,763
St I <sub>1-31</sub>	0,694	0,701	0,709	0,695	0,758
St I <sub>12-31</sub>	0,686	0,699	0,712	0,726	0,776

<sup>a</sup>Desvio padrão calculados pelo programa OringinLAB 6.0 a partir da média de quatro experimentos.

Os valores de S indicam que apenas St II<sub>1-30</sub> promoveu um pequeno, porém significativo, aumento na organização molecular dos lipídios em todas as bicamadas. Pode se dizer que, ou a região de C5 em 5-PCSL não é sensível, ou o peptídeo, ao se encaixar, mantém o mesmo grau de empacotamento existente na sua ausência. Histogramas de  $\Delta\%$ , calculada de acordo com a equação 24, para cada composição lipídica e para cada peptídeo estão apresentados na figura 44.

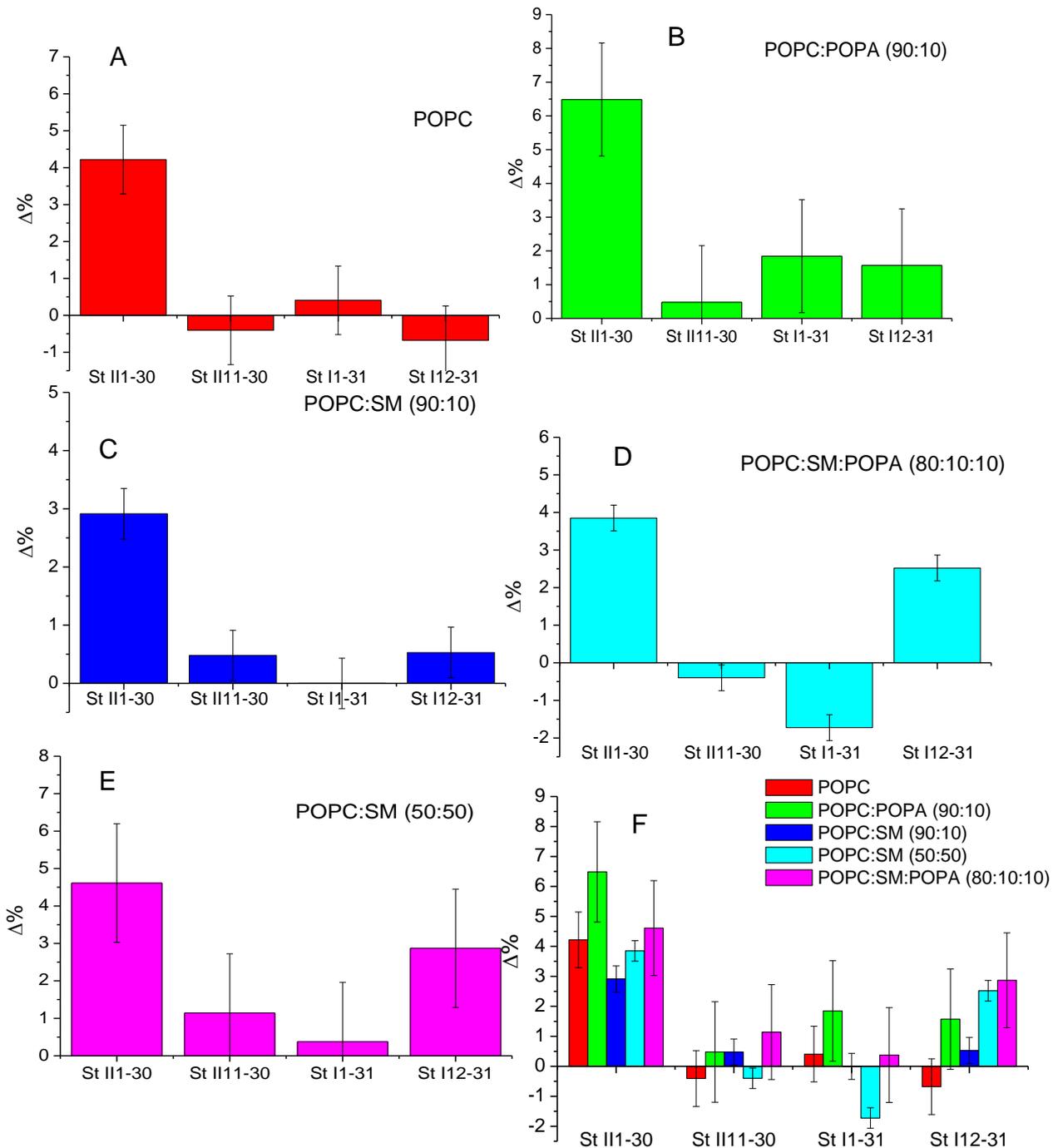


Figura 44. Porcentagem de mudança ( $\Delta\%$ ) de S nos espectros de 5-PCSL causada pela adição de St II<sub>1-30</sub>, St II<sub>11-30</sub>, St I<sub>1-31</sub> e St I<sub>12-31</sub>. (A) a (E) composioes lipídicas POPC, POPC:POPA (90:10), POPC:SM (90:10), POPC:SM:POPA (80:10:10), POPC:SM (50:50), respectivamente, pH 7,0; (F)  $\Delta\%$  para todos os lipídios, pH 7,0. O valor de  $\Delta\%$  foi calculado de acordo com a equação 24. O desvio padrão foi calculado a partir dos valores de desvio padrão obtidos para os espectros na ausência dos peptídeos.

#### **4.2.1.3 Estudos com o marcador 16-PCSL**

A figura 45 apresenta os espectros de EPR do marcador 16-PCSL incorporado em MLV de diferentes composições lipídicas, a pH 7,0.

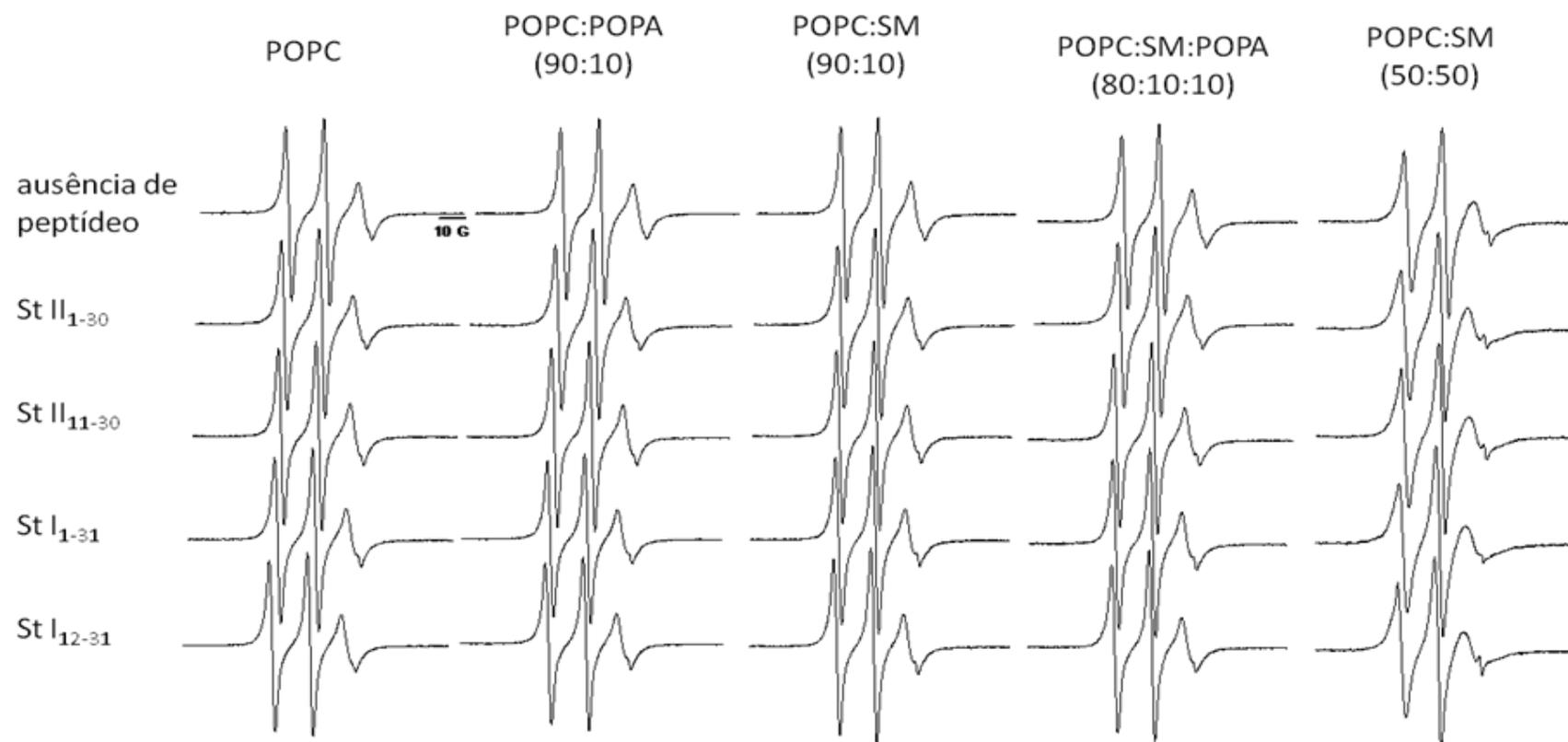


Figura 45. Espectros de EPR do marcador 16-PCSL incorporado em MLV de diferentes composições lipídicas na ausência e na presença de St II<sub>1-30</sub>, St II<sub>11-30</sub>, St I<sub>1-31</sub> e St I<sub>12-31</sub>, pH 7,0.

A incorporação do marcador 16-PCSL nas MLV teve como objetivo verificar se o efeito dos peptídeos sobre a organização molecular dos lipídios também poderia ser observado mais profundamente na bicamada. Um aumento da organização molecular dos lipídios observado na posição C16 pode ser o resultado da penetração dos peptídeos nas bicamadas. Assim, resultados que indicam que não houve alteração na organização molecular da bicamada na posição C16 podem ser entendidos como evidência de que os peptídeos não penetram na bicamada. Os espectros da figura 45 apresentam linhas estreitas, características de um ambiente no qual o marcador possui considerável liberdade de movimento. Assim como observado anteriormente, os espectros do marcador incorporado em MLV contendo 50% de SM apresentam linhas mais alargadas, indicando um ambiente mais organizado (para estes espectros foi observada a presença de um pico de baixa intensidade, em campo alto, característico do marcador em água).

O efeito dos peptídeos nas diferentes bicamadas foi analisado através da relação de alturas  $h_0/h_{+1}$  (tabela 9 e figura 46).

Tabela 9. Relação  $h_0/h_{+1}$  nos espectros do marcador 16-PCSL incorporado em MLV de diferentes composições lipídicas na ausência e na presença de peptídeos.

Peptídeo	POPC	POPC:POPA (90:10)	POPC:SM (90:10)	POPC:SM:POPA (80:10:10)	POPC:SM (50:50)
ausência	1,08 $\pm 0,01^c$	1,09 $\pm 0,01$	1,12 $\pm 0,03$	1,12 $\pm 0,02$	1,35 $\pm 0,004^d$
St II <sub>1-30</sub>	1,13	1,17	1,17	1,16	1,45
St II <sub>11-30</sub>	1,07	1,07	1,10	1,11	1,38
ausência	1,08 $\pm 0,01$	1,09 $\pm 0,01$	1,12 $\pm 0,03$	1,12 $\pm 0,02$	1,47 $\pm 0,01^d$
St I <sub>1-31</sub>	1,11	1,09	1,12	1,12	1,47
St I <sub>12-31</sub>	1,08	1,08	1,11	1,12	1,45

<sup>c</sup> Desvio padrão calculado pelo programa OringinLAB 6.0 a partir da média de quatro experimentos..<sup>d</sup> Desvio padrão obtidos da média de dois experimentos.

Os valores da tabela indicam que apenas St II<sub>1-30</sub> promoveu aumento significativo na relação  $h_0/h_{+1}$ . No caso de MLV contendo 50% de SM, na ausência de peptídeo, diferenças significativas foram encontradas entre os valores de  $h_0/h_{+1}$  para as amostras usadas como controle para St II<sub>1-30</sub>, St II<sub>11-30</sub> e para St I<sub>1-31</sub>, St I<sub>12-31</sub>. Por esse motivo a análise do efeito dos peptídeos derivados de St II foi efetuada em relação a um grupo de espectros enquanto que a análise do efeito dos peptídeos derivados de St I foi realizada relativamente a outro grupo de espectros (Tabela 9).

Foi calculada a porcentagem de mudança ( $\Delta\%$ ) gerada pelos peptídeos na presença das MLV. Os histogramas da figura 44 e 46, mostram mais claramente que apenas o peptídeo St II<sub>1-30</sub> levou a um aumento significativo na organização molecular dos lipídios, tanto na região mais próxima a cadeia polar, como na região mais próxima as metila terminais dos lipídios na bicamada.

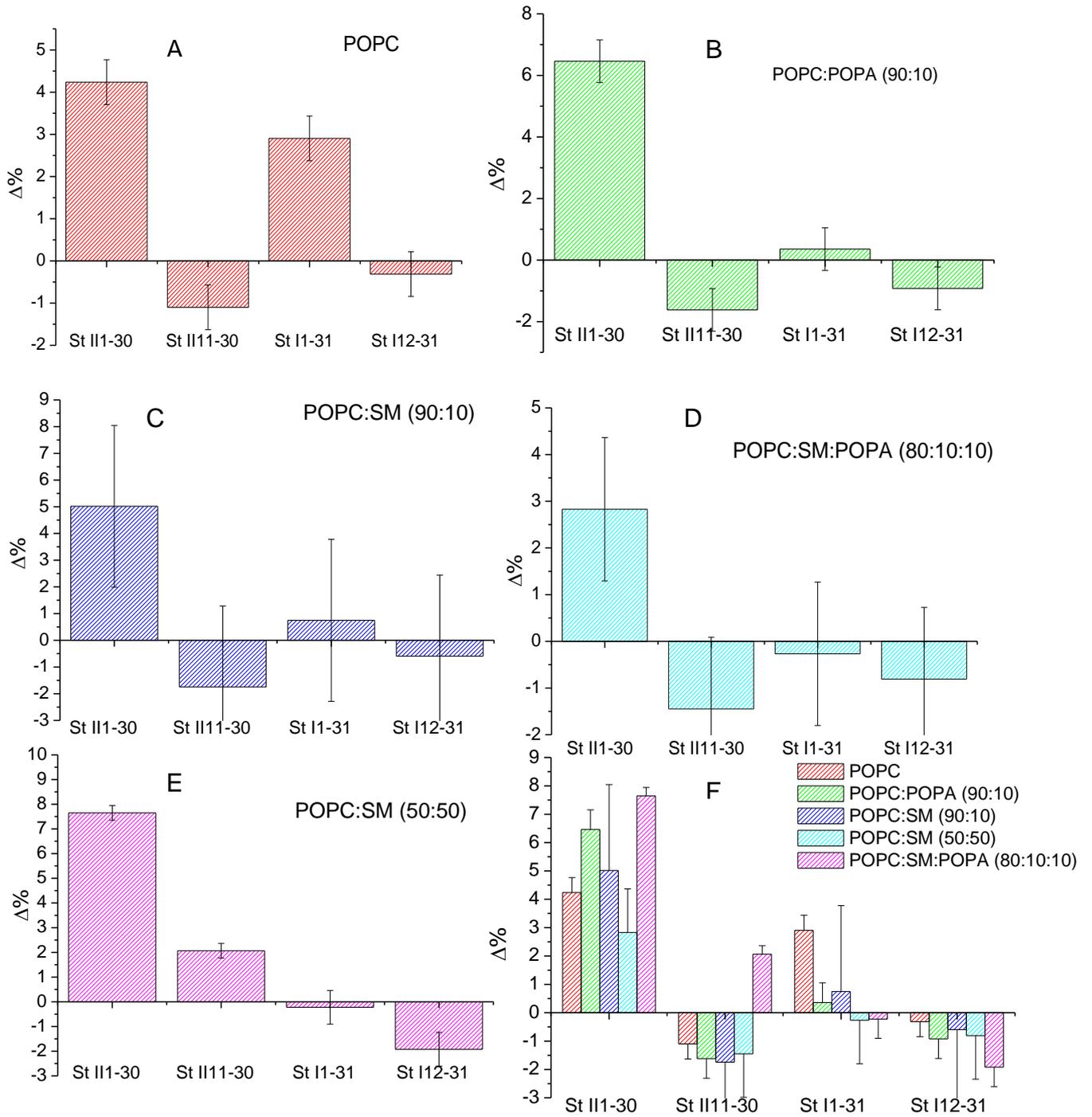


Figura 46.  $\Delta\%$  de  $h_0/h_{+1}$  causada pelos peptídeos St II<sub>1-30</sub>, St II<sub>11-30</sub>, St I<sub>1-31</sub> e St I<sub>12-31</sub> nas MLV, de: (A) POPC, (B) POPC:POPA (90:10), (C) POPC:SM (90:10), (D) POPC:SM (50:50) e (E) POPC:SM:POPA (80:10:10), pH 7,0. (F)  $\Delta\%$  para todos os peptídeos, pH 7,0.

#### 4.2.2 Efeito do conteúdo de SM e de DPPC na interação com St II<sub>1-30</sub>

Os resultados de CD e EPR para a interação de St II<sub>1-30</sub> com bicamadas sugerem que este peptídeo se liga em maior extensão à SUV e, também, produz alteração significativa na organização molecular dos lipídios em MLV. Ainda, resultados de CD mostraram que a interação de St II<sub>1-30</sub> com SUV foi sensível à presença do esfingofosfolipídio SM. Assim, para obter mais informações sobre a natureza da interação deste peptídeo com bicamadas foram realizados estudos de EPR do marcador 5-MeSL incorporado em MLV de composições lipídicas: POPC:SM:POPA (75:15:10), POPC:DPPC (90:10), POPC:DPPC (50:50), DPPC (100) e SM (100).

A figura 47 apresenta os espectros de EPR de 5-MeSL incorporado em MLV de POPC:SM:POPA (75:15:10); para avaliar com mais clareza o efeito do aumento do conteúdo de SM, de 10% (figura 41) para 15%, os espectros de 5-MeSL incorporado em MLV de POPC:SM:POPA (80:10:10) na ausência e na presença de St II<sub>1-30</sub> estão rerepresentados na figura 47.

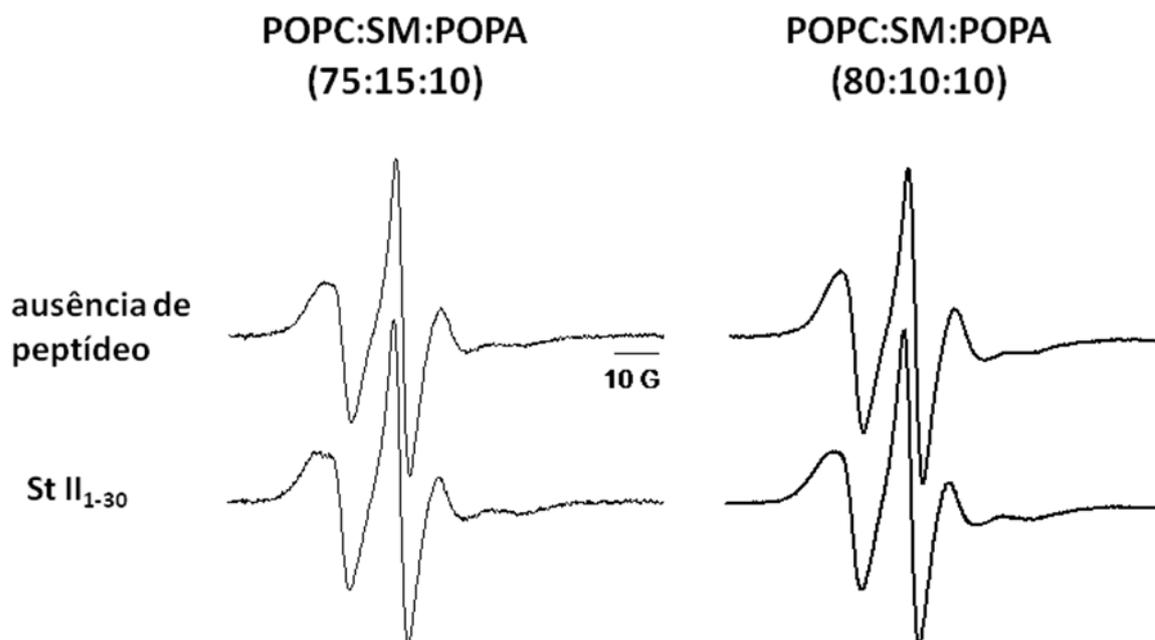


Figura 47. Espectros de EPR do marcador 5-MeSL incorporado em MLV de POPC:SM:POPA (75:15:10) e POPC:SM:POPA (80:10:10), na ausência e na presença de St II<sub>1-30</sub>, pH 7,0.

O aumento de 10% para 15% de SM leva ao alargamento das linhas espectrais, mesmo na ausência dos peptídeos, sugerindo um aumento na organização molecular dos lipídios na bicamada, como indica o aumento da relação  $h_0/h_{+1}$  (Tabela 12). A adição de St II<sub>1-30</sub> a MLV contendo 15% de SM levou ao aparecimento de extremos internos e externos nos espectros, sugerindo que a interação aumentou a ordem da bicamada. Os valores da relação  $h_0/h_{+1}$  ou S, para os espectros da figura 47 (Tabela 12), sugerem que St II<sub>1-30</sub> promoveu o aumento da ordem dos lipídios na bicamada. St II<sub>1-30</sub> promove alteração significativa na organização molecular das MLV contendo 10 e 15% de SM. Os estudos de EPR da interação de St II<sub>1-30</sub> com bicamadas com diferentes conteúdos de SM corroboram os resultados obtidos por CD, indicando que SM tem um papel importante para a interação peptídeo-membrana.

Tabela 12. Relação  $h_0/h_{+1}$  e parâmetro de ordem S para os espectros de 5-MeSL incorporado em MLV de POPC:SM:POPA (80:10:10) e POPC:SM:POPA (75:15:10) na ausência e presença de St II<sub>1-30</sub> e St II<sub>11-30</sub>.

Peptídeo	POPC:SM:POPA (80:10:10)	POPC:SM:POPA (75:15:10)
	$h_0/h_{+1}$	$h_0/h_{+1} / S$
Ausência	2,02	2,29 ( $h_0/h_{+1}$ )
St II <sub>1-30</sub>	2,30	0,51 (S)

Quanto à DPPC, os espectros de CD de St II<sub>1-30</sub> em presença de SUV de POPC:DPPC (90:10) (figuras 35 e 36) indicaram que o peptídeo ligou-se a essas bicamadas. Devido ao fato de que o aumento do conteúdo de DPPC, assim como o de SM, leva ao aumento do espalhamento de luz pela amostra, dificultando a obtenção de espectros de CD com qualidade, foram realizados estudos de EPR da interação do peptídeo com MLV compostas por POPC:DPPC (90:10) e POPC:DPPC (50:50) e também com MLV compostas somente por DPPC ou SM. O estudo da interação com as bicamadas contendo DPPC tem como objetivo avaliar a especificidade da interação de St II<sub>1-30</sub> com SM, já que é reportado que DPPC possui propriedades similares a SM quanto a separação de fases e a formação de microdomínios em membranas modelo (Ribeiro e Dennis, 1974; Curatolo et al., 1985; Ipsen et al., 1987; Silvius et al., 1996; Schroeder et al., 1998; Bakht et al., 2007; M'Baye et al., 2008). A figura 48 apresenta os espectros de 5-MeSL incorporado em MLV destas composições lipídicas. Para maior clareza na comparação, os espectros de 5-MeSL incorporado em MLV de POPC:SM (90:10) e (50:50) são rerepresentados nesta figura.

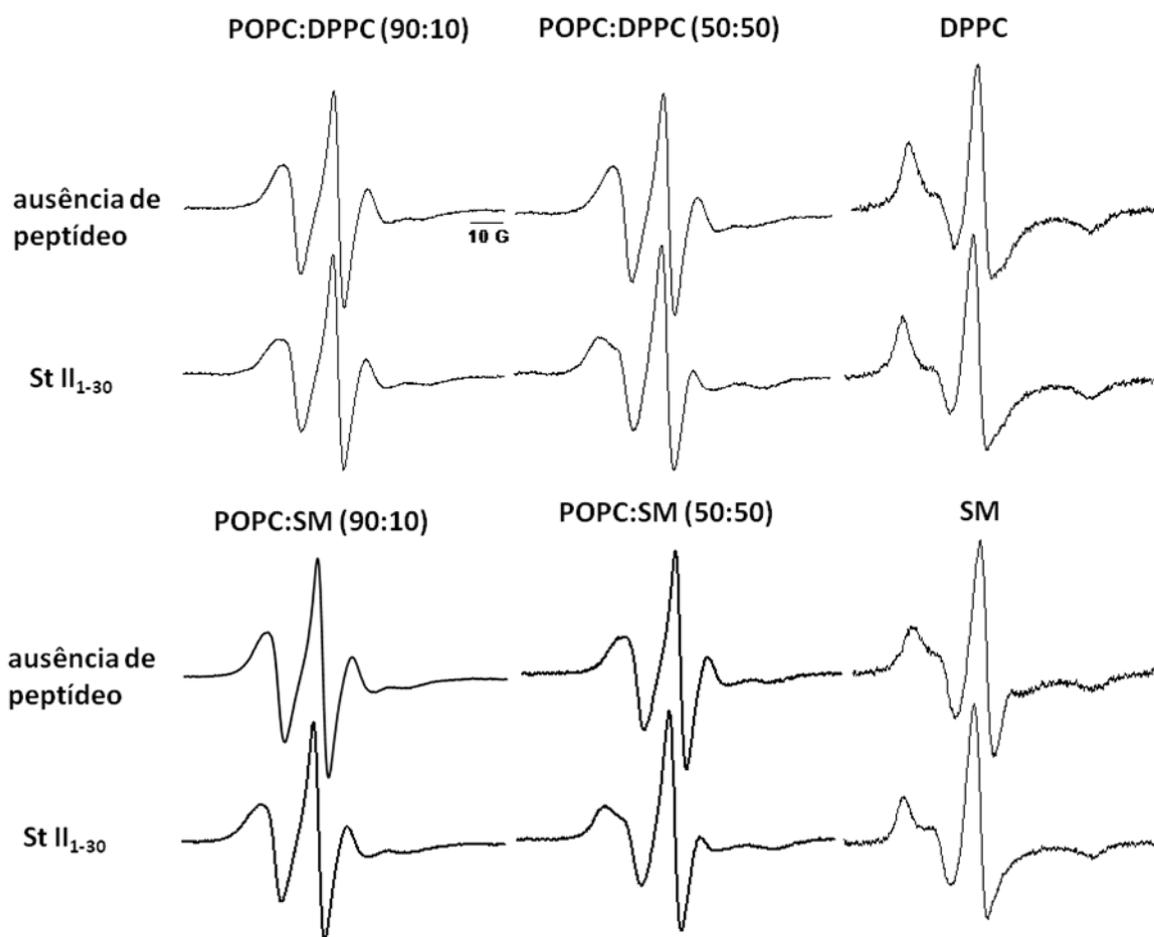


Figura 48. Espectros de EPR do marcador de spin 5-MeSL incorporado em MLV de POPC:DPPC (90:10), POPC:DPPC (50:50), DPPC (100%), POPC:SM (90:10), POPC:SM (50:50) e SM (100%) na ausência e na presença de St II<sub>1-30</sub>, pH 7,0.

De maneira geral, a forma dos espectros de 5-MeSL incorporado em bicamadas contendo SM ou DPPC é bastante similar. A interação de St II<sub>1-30</sub> com bicamadas contendo 10% ou 50% de DPPC ou SM promoveu um alargamento significativo das linhas; para ambas as composições, os espectros resultantes da interação de St II<sub>1-30</sub> com as bicamadas sendo bastante parecidos. Os espectros de MLV compostas apenas por DPPC ou SM são característicos do marcador altamente imobilizado (espectro de pó). Devido à ausência dos extremos internos nesses espectros, a análise foi feita medindo a separação,  $2A_{\max}$ , entre os extremos externos do espectro.

A tabela 13 apresenta os valores de  $2A_{\max}$  para os espectros da figura 48. Enquanto os espectros correspondentes as bicamadas contendo 50% de SM na ausência e na presença de peptídeo possuem extremos internos e externos, no caso das MLV contendo 50% de DPPC o espectro possui linhas de larguras comparáveis às dos espectros contendo apenas 10% de DPPC.

Tabela 13. Valores de  $2A_{\max}$  nos espectros do marcador 5-MeSL incorporado em MLV na ausência e na presença de St II<sub>1-30</sub>.

	POPC:SM (90:10)	POPC:SM (50:50)	POPC:DPPC (90:10)	SM	POPC:DPPC (90:10)	POPC:DPPC (50:50)	DPPC
$2A_{\max}$							
ausência	43,01	47,51	44,18	59,43	44,18	43,21	59,92
St II <sub>1-30</sub>	44,87	53,37	46,82	60,70	46,82	51,61	60,12

<sup>a</sup>Desvio padrão calculado pelo programa OringinLAB 6.0 a partir da média de três experimentos.

Os valores da tabela 13 mostram que em todos os casos a presença de St II<sub>1-30</sub> levou a um aumento da organização molecular dos lipídios na bicamada. O peptídeo interagiu aproximadamente na mesma extensão com bicamadas contendo SM ou DPPC (Tabela 14).

Tabela 14. Porcentagem de mudança de  $2A_{\max}$  nos espectros do marcador 5-MeSL incorporado em MLV de diferentes composições lipídicas.

	POPC	POPC:SM (90:10)	POPC:DPPC (90:10)	POPC:SM (50:50)	POPC:DPPC (50:50)	SM	DPPC
St II <sub>1-30</sub>	4,36	4,31	5,97	12,3	19,4	2,13	0,033

#### 4.2.3 Interação dos peptídeos com micelas

Os resultados de CD da interação dos peptídeos com micelas de LPC e LPC:LPA (90:10) sugerem que os peptídeos se ligam em maior extensão às micelas do que às SUV de POPC e POPC:POPA (90:10) (itens 4.1.2.1 e 4.1.2.2, Tabela 6). Com o objetivo compreender ao nível da organização lipídica a interação dos

peptídeos com micelas, foram obtidos espectros de EPR do marcador de spin 5-MeSL incorporado em micelas de LPC e LPC:LPA (90:10) na ausência e na presença dos peptídeos (figura 49). Os espectros do marcador incorporado nas micelas, na ausência de peptídeo, possuem linhas mais estreitas em relação aos espectros do mesmo marcador incorporado em MLV (figura 41), evidenciando um ambiente menos empacotado onde o marcador experimenta maior liberdade de movimento.

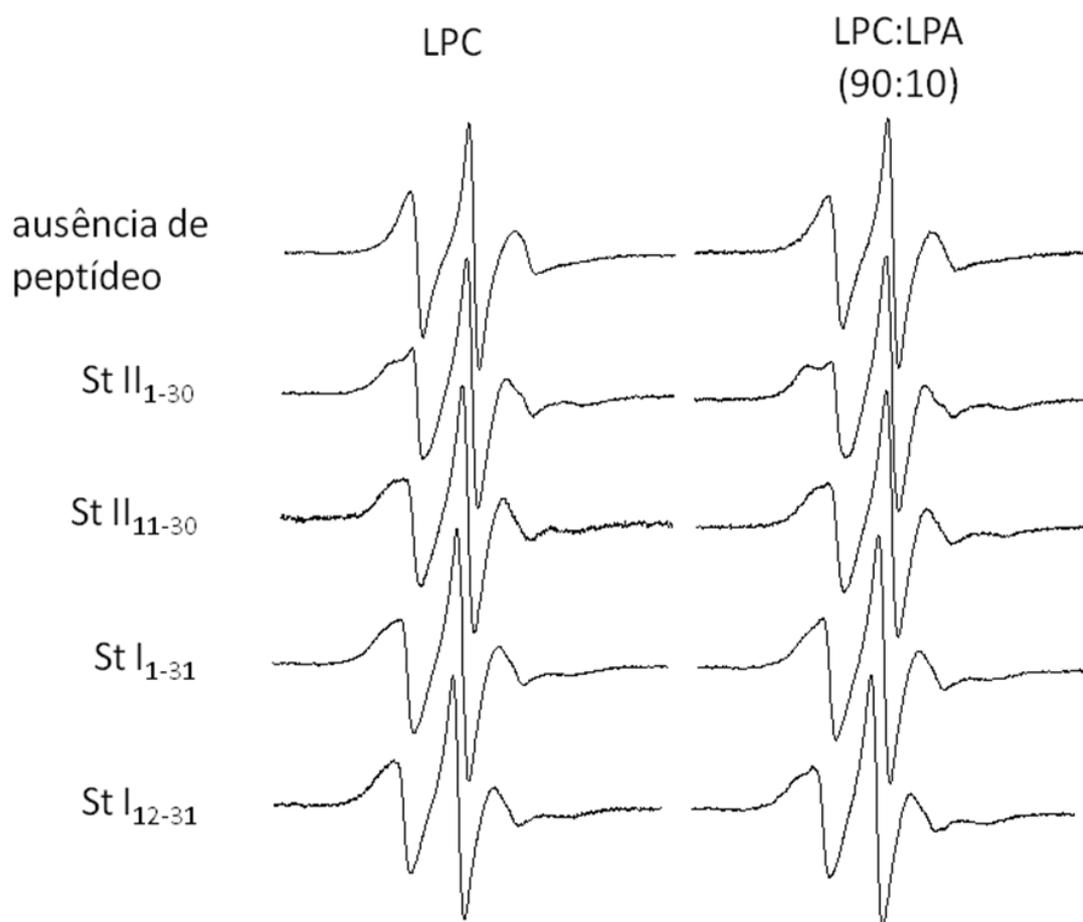


Figura 49. Espectros de EPR do marcador 5-MeSL incorporado em micelas de LPC na ausência e na presença de St II<sub>1-30</sub>, St II<sub>11-30</sub>, St I<sub>1-31</sub> e St I<sub>12-31</sub>, em pH 7,0.

De maneira geral, a interação dos peptídeos com as micelas promoveu o aparecimento de duas componentes no espectro de EPR: um de linhas mais largas característico de um ambiente com maior organização molecular, e outro de linhas estreitas. A quantidade da componente mais imobilizada variou de acordo com os peptídeos. St II<sub>1-30</sub> e St II<sub>11-30</sub> levaram ao aparecimento de extremos internos e externos nos espectros de LPC e LPC:LPA (90:10), sugerindo que estes peptídeos promovem uma grande alteração na ordem dos lisofosfolipídios. Já a adição de St I<sub>1-31</sub> e St I<sub>12-31</sub> levou a um menor alargamento das linhas espectrais, com menor definição do componente imobilizado. No caso de St I<sub>12-31</sub>, enquanto que nos espectros de LPC quase não se observa o componente mais imobilizado, nos espectros de LPC:LPA (90:10) esse componente é claramente visualizado originando extremos externos no espectro.

Para os espectros da figura 49 foram obtidos os valores da relação  $h_0/h_{+1}$  (Tabela 15). Apesar desta análise não ser correta para espectros contendo extremos internos e externos, essa relação foi obtida para poder comparar a interação dos diferentes peptídeos com as micelas. A tabela 15 sugere que todos os peptídeos promoveram aumento na organização molecular dos lisofosfolipídios, sendo que St II<sub>1-30</sub> teve maior efeito.

Tabela 15. Relação  $h_0/h_{+1}$  ou S obtidos de espectros do marcador 5-MeSL incorporado em micelas na ausência e na presença de St II<sub>1-30</sub>, St II<sub>11-30</sub>, St I<sub>1-31</sub> e St I<sub>12-31</sub>.

Peptídeos	LPC	LPC:LPA (90:10)
	$h_0/h_{+1}$	
Ausência	1,71 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,74 ± 0,15 <sup>a</sup>
St II <sub>1-30</sub>	2,59	2,82
St II <sub>11-30</sub>	2,33	2,38
St I <sub>1-31</sub>	2,29	2,21
St I <sub>12-31</sub>	2,23	2,47

<sup>a</sup>Desvio padrão calculado pelo programa OringinLAB 6.0 a partir da média de três experimentos.

A interação dos peptídeos com micelas contendo o lisofosfolípido negativamente carregado LPA sofre influência de interações eletrostáticas. Os maiores valores de  $h_0/h_{+1}$  nos espectros de micelas de LPC:LPA (90:10) na presença de St II<sub>1-30</sub>, St II<sub>11-30</sub> e St I<sub>12-31</sub> indicam que estes peptídeos se ligam mais a estas micelas em comparação com as de LPC. Ainda, a interação de St I<sub>1-31</sub> com as micelas contendo LPA ocorreu em menor extensão. Os valores de  $h_0/h_{+1}$  (Tabela 15) para a interação de St I<sub>1-31</sub> com micelas sugerem que este peptídeo possui um maior efeito sobre a organização molecular de micelas de LPC. Provavelmente a repulsão eletrostática entre os resíduos Glu2 e Asp9 de St I<sub>1-31</sub> e as cargas negativas do grupo fosfato de LPA fazem com que este peptídeo não interaja na mesma extensão com estas micelas em comparação com as micelas zwitteriônicas de LPC.

Os resultados de EPR e CD (figuras 37 a 40, Tabela 6) para a interação dos peptídeos com micelas mostram que a adição de LPA ao sistema leva ao aumento da ligação de St II<sub>1-30</sub>, St II<sub>11-30</sub> e St I<sub>12-31</sub> as micelas e a diminuição da ligação de St I<sub>1-31</sub>.

### 4.3 Estudo da interação de St II<sub>1-30</sub> com micelas de LPC por Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo

Os resultados obtidos por CD e EPR indicaram que a interação peptídeo-micela é bastante diferente da observada em bicamadas. Para avaliar se a interação peptídeo-micela promove alterações na forma e/ou tamanho das micelas foram realizados estudos de SAXS de micelas de LPC na ausência e na presença de St II<sub>1-30</sub>. A figura 50 mostra as curvas de SAXS dos sistemas compostos por LPC em ausência do peptídeo, normalizadas pela concentração de LPC. Como é possível observar, as curvas de SAXS para as diferentes concentrações de LPC possuem um comportamento muito similar na região de médios e grandes valores de  $q$  ( $q > 0,04 \text{ \AA}^{-1}$ ). No entanto, pode ser observado um desvio da curva correspondente à concentração 120 mM na região de pequenos valores de  $q$  ( $q < 0,04 \text{ \AA}^{-1}$ ). Isto se deve ao aparecimento de uma função de interferência entre as micelas devido ao aumento da concentração. Mesmo as micelas sendo eletricamente neutras um grande aumento na concentração pode gerar o aparecimento da função de interferência devido ao fato de que as micelas passam a sentir a presença uma das outras.

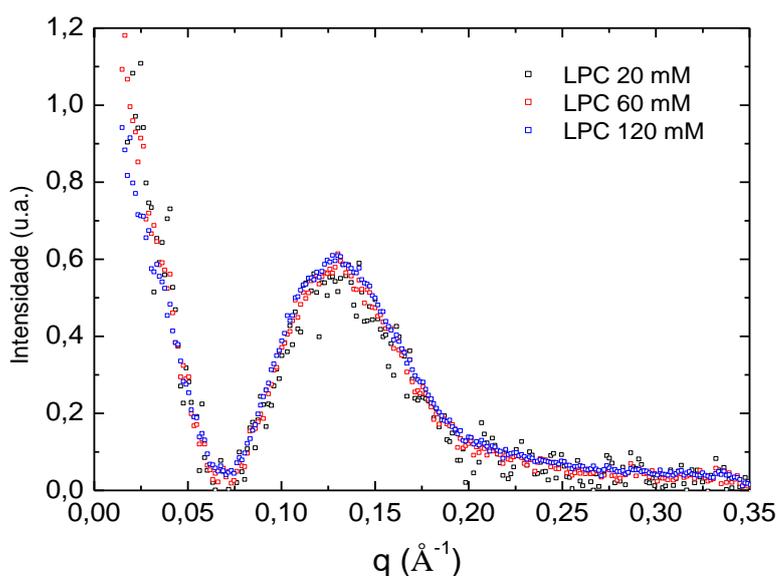


Figura 50. Curvas de SAXS de micelas de LPC (20, 60 e 120 mM) em solução, pH 7,0, normalizadas pela concentração micelar, pH 7,0.

As curvas de SAXS (figura 50) indicam que a micela de LPC não é alterada pelo aumento da concentração de surfactante. Assim, podem-se ajustar os fatores de forma de uma destas curvas de SAXS e impor estes mesmos parâmetros estruturais para as demais curvas. Neste caso, foi utilizado o ajuste Global, empregando o programa desenvolvido pelo grupo de do prof. Paolo Mariani da Università Politecniche delle Marche, Ancona, Itália. Este programa é capaz de analisar diversas curvas de SAXS ao mesmo tempo, possibilitando inclusive a união de diferentes parâmetros de ajustes de diferentes curvas experimentais. Este procedimento garante a unicidade da solução final. A partir desse ajuste para as curvas de SAXS de LPC 20 mM, foram obtidos os valores do raio parafínico,  $R_{par}$ , da anisometria (razão entre os raios) e a densidade eletrônica da cabeça polar,  $\rho_{pol}$ , assim como sua espessura,  $\sigma$  (figura 51, Tabela 16)

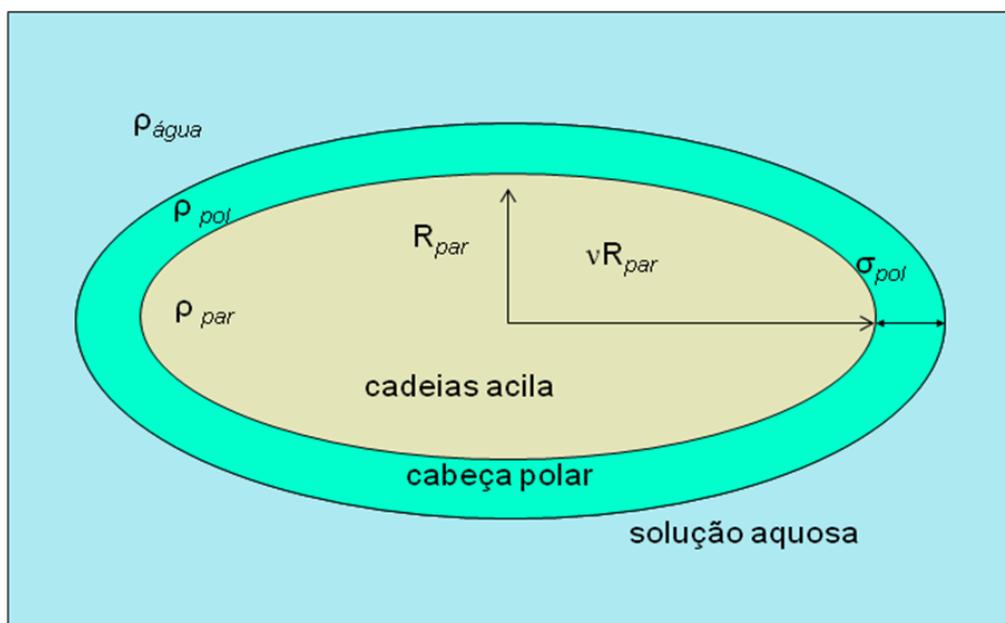


Figura 51. Modelo de elipsóide prolato para a micela de LPC e os parâmetros obtidos pelo ajuste global: raio parafínico,  $R_{par}$ , anisometria ( $v$ ), densidade eletrônica da cabeça polar,  $\rho_{pol}$ .

Tabela 16. Parâmetros  $R_{\text{par}}$ , anisometria e  $\rho_{\text{pol}}$  obtidos para as curvas de SAXS de LPC 20 mM na ausência e presença de St II<sub>1-30</sub> 2 mM.

Parâmetros	LPC (20 mM)	+ St II <sub>1-30</sub> (2 mM)
$R_{\text{par}}$ (Å)	18,5	15,0
anisometria	1,7	1,4
$\rho_{\text{pol}}$ (Å)	10,5	13,5

A interação com St II<sub>1-30</sub> foi estudada com três concentrações de LPC (20, 60 e 120 mM) em ausência e presença de 2 mM de St II<sub>1-30</sub>, obtendo-se razões peptídeo/LPC: 10/100; 3,33/100; 1,67/100 (figura 52). Os gráficos da figura 52 estão organizados em função da razão molar peptídeo/LPC.

A presença do peptídeo induz um deslocamento das curvas de SAXS para maiores valores de  $q$ , dependente da concentração micelar. O deslocamento foi maior em de 20 mM de LPC. O deslocamento das curvas para maiores valores de  $q$  é indicativo de que o peptídeo induz uma diminuição no raio parafínico da micela (Tabela 16). Ainda, a presença de St II<sub>1-30</sub> induz o aparecimento de um pico na região de  $q = 0,025 \text{ \AA}^{-1}$ , indicativo de uma função de interferência entre micelas. Tal função provavelmente é oriunda de um desbalanço de cargas na superfície micelar devido à ligação de St II<sub>1-30</sub> (carga líquida formal +2) A maior diferença entre as intensidades dos picos em  $q = 0,025 \text{ \AA}^{-1}$  para o sistema contendo 20 mM de LPC se deve ao fato de que nessa concentração não há a presença de uma função de interferência devido à concentração de micelas.

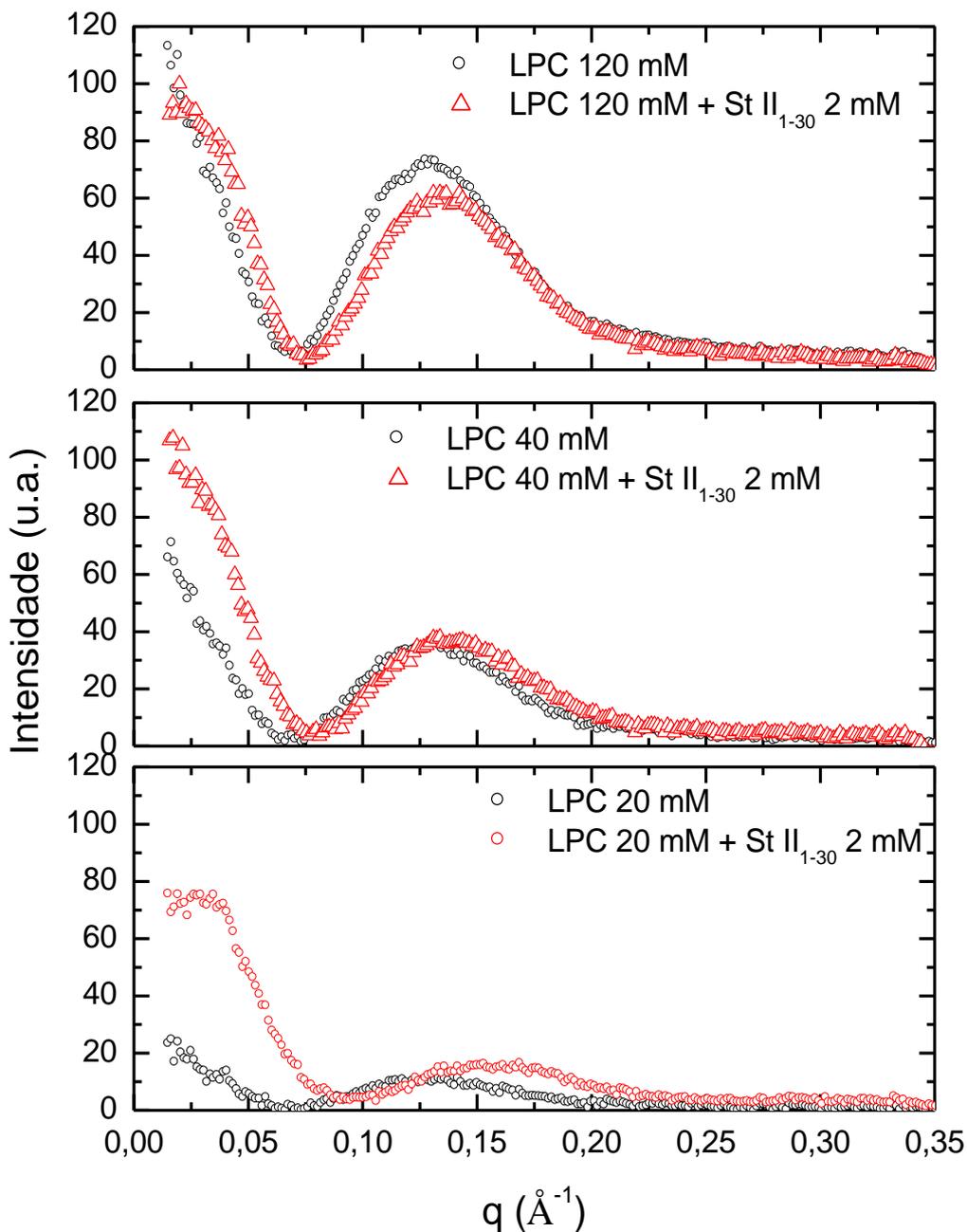


Figura 52. Curvas de SAXS dos sistemas compostos por LPC 20, 40 e 120 mM na ausência e presença de 2 mM de  $\text{St II}_{1-30}$ , pH 7,0.

Para dar continuidade à análise, o sistema contendo 20 mM de LPC foi escolhido já que possui a mesma razão peptídeo/lipídio utilizada nos estudos de EPR e também pelo fato de haver menor interação entre as micelas na ausência de peptídeo. A figura 53 mostra as curvas de SAXS do sistema composto por 20 mM de LPC em presença de 2 mM do peptídeo, juntamente com os ajustes respectivos.

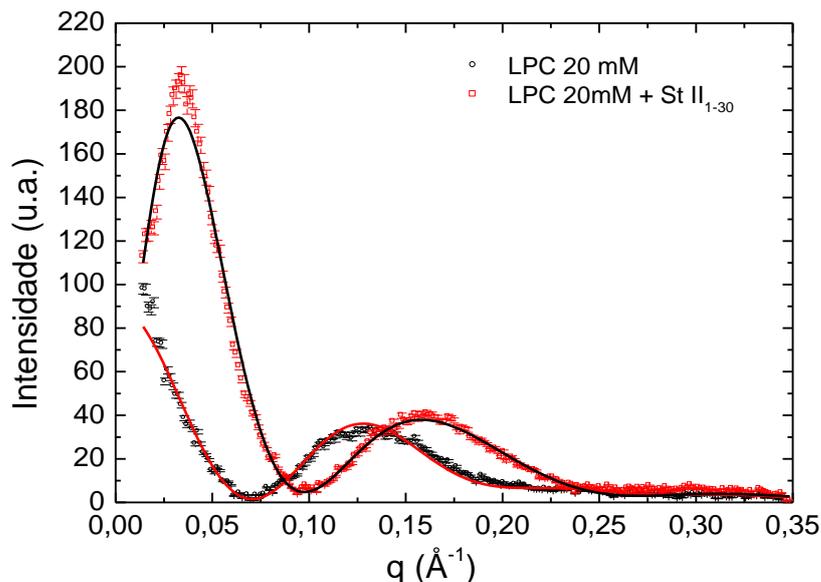


Figura 53. Curvas de SAXS dos sistemas compostos por 20 mM de LPC em ausência (círculos pretos) e presença (quadrados vermelhos) de St II<sub>1-30</sub> 2 mM, pH 7,0, juntamente com os respectivos melhores ajustes através do modelo de elipsóide prolato.

Os parâmetros obtidos para o ajuste da curva de SAXS de LPC na presença de St II<sub>1-30</sub> (Tabela 16) mostram que houve uma diminuição de  $R_{\text{par}}$  de 18,5 Å na ausência de peptídeo para cerca de 15,0 Å em presença do mesmo. Foi também observada uma pequena diminuição na anisometria, de 1,7 para 1,4 assim como um aumento da espessura da cabeça polar, de 10,5 para 13,5 Å. Estes valores indicam que o peptídeo deve se localizar, preferencialmente, na região das cabeças polares de modo a alterar a distribuição de cargas na superfície da micela. Além dos parâmetros estruturais mencionados aqui, a presença do peptídeo induz o aparecimento de uma função de interferência. Nossa análise indica que devem existir cerca de 10 cargas positivas na superfície micelar.

Os valores da Tabela 16 indicam que a presença do peptídeo além de reduzir o o raio parafínico da micela, também altera sua forma, tornando-a mais esférica. A diminuição de  $R_{\text{par}}$  levaria ao aumento do empacotamento dos lipídios, o que está de

acordo com os espectros de EPR da interação de St II<sub>1-30</sub> com micelas de LPC, que indicam o aparecimento de um ambiente bastante organizado (figura 49).

## 5. DISCUSSÃO

Nosso laboratório em colaboração com o Centro de Estudos de Proteínas da Universidade de Havana, Cuba, e com o Laboratório de Peptídeos da UNESP-Araraquara, vem contribuindo para o avanço na compreensão do mecanismo de formação de poro pelas toxinas esticolisina I e esticolisina II, bem como do papel da composição lipídica na formação do poro (Alvarez et al., 1998, 2001, 2003; Lanio et al., 2002, 2003; Martinez et al., 2001; Casallanovo et al., 2006; Pazos et al., 2006; Cilli et al., 2007).

Apesar da alta homologia entre as actinoporinas (93% entre St I e St II e 66% entre St II e Eq2 II (Huerta et al., 2001), são observadas diferenças consideráveis na sua atividade hemolítica: 21700 e 30000 UH/mg para St I e St II, respectivamente (Lanio et al., 2001), sendo St II 4 a 5 vezes mais hemolítica do que Eq2 II (Cilli et al., 2007). Foi sugerido que a diferença na atividade hemolítica seria resultado de diferenças entre as regiões N-terminais das toxinas (Cilli et al., 2007); uma vez que estas regiões são as menos conservadas na família (Huerta et al., 2001), e que estudos comparativos da atividade hemolítica de fragmentos da região N-terminal de St I e St II mostraram que esses fragmentos são capazes de reproduzir as diferenças de atividade hemolítica das toxinas (Cilli et al., 2007).

Trabalhos na literatura, também realizados em nosso laboratório enfocando receptores acoplados a proteínas G (Pertinhez et al., 1995, 1997, 2002; Franzoni et al., 1997, 1999; Salinas et al., 2002), tem revelado que fragmentos de proteínas são capazes de adquirir a conformação conhecida ou predita para essas sequências na proteína inteira. Neste contexto, o estudo conformacional de peptídeos correspondentes à região N-terminal de St I (St I<sub>1-31</sub> e St I<sub>12-31</sub>) e St II (St II<sub>1-30</sub> e St

II<sub>11-30</sub>) e da interação destes com sistemas miméticos de membranas (bicamadas e micelas) foi considerado como uma abordagem promissora para investigar o mecanismo de formação do poro. Já foi observado que esses peptídeos (Casallanovo et al., 2006; Cilli et al., 2007), bem como o peptídeo derivado da região N-terminal de Eqt II (Dreschsler et al., 2006 e 2009; Lam et al., 2009) (Tabela 17), são capazes de adquirir conformação em  $\alpha$ -hélice, observada para esta região nas estruturas de St II (Mancheño et al., 2003) e Eqt II (Athanasiadis et al., 2001; Hinds et al., 2002). Foi também observado que os peptídeos são capazes de mimetizar a atividade lítica das toxinas, porém as concentrações necessárias são de três a quatro ordens de grandeza maiores (Casallanovo et al., 2006; Dreschsler et al., 2006; Cilli et al., 2007). Esses resultados são compreensíveis, uma vez que não está presente a região de resíduos aromáticos, que ancora as proteínas à membrana. Por outro lado, vale notar que as concentrações líticas dos peptídeos são da ordem de micromolar, ou seja, concentrações bastante baixas. É interessante notar ainda que concentrações dessa ordem correspondem às concentrações em que são ativos peptídeos antimicrobianos (Matsuzaki et al., 1998; Travis et al., 2000; de Smet e Contreras, 2005)

Tabela 17. Alinhamento dos peptídeos correspondentes a região N-terminal de St I, St II e Eqt II.<sup>a</sup>

Peptídeo	Toxina	Resíduos	Sequência
St I <sub>1-31</sub>	St I	1-31	-SELAGTIIIDGASLTFEVLDKVLGELGKVS RK
St II <sub>12-31</sub>	St I	12-31	-----SLTFEVLDKVLGELGKVS RK
St II <sub>1-30</sub>	St II	1-30	--ALAGTIIAGASLTFQVLDKVLEELGKVS RK
St II <sub>11-30</sub>	St II	11-30	-----SLTFQVLDKVLEELGKVS RK
Eqt II <sub>1-32</sub>	Eqt II	1-32	SADVAGAVIDGASLSFKILKTVLEALGNV KRK

<sup>a</sup> Alinhamento obtido pelo programa ClustalW.

No presente estudo, a interação de St I<sub>1-31</sub>, St I<sub>12-31</sub>, St II<sub>1-30</sub> e St II<sub>11-30</sub> com membranas modelo foi analisada sob duas perspectivas: o efeito da interação

peptídeo-membrana na estrutura secundária dos peptídeos, monitorado por CD, e sobre a organização molecular dos lipídios e lisofosfolipídios de bicamadas e micelas, monitorado por EPR.

A interação peptídeo-membrana foi examinada em bicamadas contendo apenas fosfolipídios zwitteriônicos como POPC, DPPC e SM e em bicamadas contendo também o fosfolipídio negativamente carregado POPA. A incorporação de POPA teve como objetivo avaliar a importância de interações eletrostáticas na interação. O estudo com SM é de grande interesse uma vez que foi mostrado que as actinoporinas possuem alta afinidade por este esfingolipídio (Bernheimer e Avigard, 1976; de los Rios et al., 1998; Belmonte et al., 1993). Além disso, é conhecido que pode ocorrer coexistência de fases em misturas contendo POPC e SM, tendo sido proposto que tanto a ligação das toxinas, como a formação do poro, estão relacionadas à topografia desses sistemas (Barlic et al., 2004; Schön et al., 2008). Por esse motivo, decidiu-se estudar também bicamadas de POPC onde foi incorporada DPPC. Contudo, a coexistência de fases, tanto no caso de SM como de DPPC, não foi descrita para sistemas contendo 10 % desses lipídios (Pokorny et al., 2006; Curratolo et al., 1985). Porém, estudos de CD só foram possíveis para bicamadas com essa composição, uma vez que conteúdos mais altos produziram sistemas que causaram um grau de espalhamento de luz que inviabilizou a obtenção de espectros. Assim, os estudos de CD envolveram apenas amostras com 10 % de SM ou DPPC. No entanto, como a turvação da amostra não representa um problema para o EPR, estudos com essa técnica foram realizados com amostras contendo além de 10 %, 50 % e 100 % desses lipídios.

### **5.1 Aquisição de estrutura $\alpha$ -helicoidal como indicador qualitativo da ligação a membranas modelo**

Os estudos conformacionais de St II<sub>1-30</sub>, St II<sub>11-30</sub>, St I<sub>1-31</sub> e St I<sub>12-31</sub> na presença de membranas modelo fornecem evidências para a ligação dos peptídeos a SUV e micelas. A aquisição de estrutura  $\alpha$ -helicoidal informa que ocorreu a ligação, uma vez que em solução estes peptídeos se encontram essencialmente ao acaso.

Não se observou ligação dos peptídeos a SUV de POPC, como indicam os valores da porcentagem de estrutura em  $\alpha$ -hélice calculados para os peptídeos a partir dos espectros de CD (Tabela 18). De maneira geral, quando ocorreu ligação, St II<sub>1-30</sub> adquiriu maior conteúdo de estrutura em  $\alpha$ -hélice que os demais peptídeos. Contudo, deve-se considerar que o conteúdo de estrutura em  $\alpha$ -hélice não pode ser diretamente correlacionado com a afinidade dos peptídeos pelas diferentes membranas. Para os casos em que foram obtidas constantes de ligação altas e baixo conteúdo de estrutura em  $\alpha$ -hélice, observou-se aumento no conteúdo de estrutura em folha  $\beta$  (Tabela 19). O aumento do conteúdo de folha  $\beta$  poderia estar relacionado com a agregação dos peptídeos na membrana.

O conteúdo de  $\alpha$ -hélice para St II<sub>1-30</sub> em presença de várias membranas (Tabela 18) corresponde a um número maior de resíduos do que o encontrado para a região N-terminal na estrutura de St II por cristalografia de raios X (10 resíduos, Mancheño et al., 2003), especialmente no caso da interação com micelas de LPC, onde foi observado que praticamente todo o peptídeo forma uma  $\alpha$ -hélice. O mesmo foi observado para os demais peptídeos na presença dessas micelas. A formação de uma hélice de maior extensão foi também observada para St II<sub>1-30</sub> em TFE (Casallanovo et al., 2006): em 40% desse solvente, o peptídeo se encontra 60 % em estrutura  $\alpha$ -helicoidal, o que corresponde a 18 resíduos. Estudos de NMR da região N-terminal de St I (Castrillo et al., 2010) e de Eq<sub>2</sub> II (Dreschsler et al., 2006) (Tabela

17) também mostraram que, tanto na presença de TFE quanto na presença de micelas de dodecilsulfocolina (DPC), praticamente toda a extensão destes peptídeos encontra-se estruturada em  $\alpha$ -hélice. O aumento da extensão da região em  $\alpha$ -hélice para os peptídeos como resultado da interação peptídeo-membrana está de acordo com o aumento do conteúdo de estrutura secundária observado para St I e St II quando as toxinas se ligam a bicamadas lipídicas (Alvarez et al., 2003; Menestrina et al.; 1999; Alegre-Cebollada et al., 2007b).

Tabela 18. Conteúdo de  $\alpha$ -hélice para St II<sub>1-30</sub>, St II<sub>11-30</sub>, St I<sub>1-31</sub> e St I<sub>12-31</sub> na presença de SUV e micelas de diferentes composições lipídicas na concentração correspondente a saturação da aquisição de estrutura secundária<sup>a</sup>.

Peptídeo	Solução		POPC		POPC:POPA (90:10)		POPC:SM (90:10)		POPC:SM:POPA (80:10:10)		POPC:SM:POPA (75:15:10)		LPC		LPC:LPA (90:10)	
	%	n	%	n	%	N	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n
St II <sub>1-30</sub>	18,8 ± 0,84	5,7	16,8 ± 0,84	5,0	73,0 ± 1,58	21,9	29,2 ± 0,84	8,8	67,0 ± 1,58	20,1	46,0*± 1,58	13,8	98,8 ± 0,84	29,7	42,8 * ± 0,84	12,8
St II <sub>11-30</sub>	16,2 ± 0,84	3,3	14,2 ± 0,84	2,8	79,0 ± 1,58	15,8	14,2 ± 0,84	2,8	34,8 ± 0,84	6,9	45,8 ± 0,84	9,2	84,8 ± 0,84	16,9	41,8 * ± 0,84	8,4
St I <sub>1-31</sub>	17,2 ± 0,84	5,3	16,0 ± 0,71	4,9	52,8 ± 0,84	16,4	22,6 ± 0,55	7,0	54,2 ± 0,84	16,8	68,4* ± 1,14	21,2	98,8 ± 0,84	30,6	98,8 * ± 0,84	30,6
St I <sub>12-31</sub>	6,8 ± 0,84	1,4	19,8 ± 0,84	3,9	45,6 ± 0,55	9,1	12,2 ± 0,84	2,4	36,8 ± 0,84	7,4	36,8 ± 0,84	7,4	98,2 ± 0,84	19,7	57,2 * ± 0,84	11,4

<sup>a</sup>Para o caso de SUV concentração de lipídio total = 0,3 mM; para micelas concentração = 5 mM.

Tabela 19. Conteúdo de folhas  $\beta$  e de estrutura ao acaso (R) para os peptídeos na presença de SUV e micelas de diferentes composições lipídicas na concentração correspondente a saturação da aquisição de estrutura secundária.

Peptídeo	Solução		POPC		POPC:POPA (90:10)		POPC:SM (90:10)		POPC:SM:POPA (80:10:10)		POPC:SM:POPA (75:15:10)		LPC		LPC:LPA (90:10)	
	$\beta$	R	$\beta$	R	$\beta$	R	B	R	$\beta$	R	$\beta$	R	$\beta$	R	$\beta$	R
St II <sub>1-30</sub>	16,6	65,6	25,6	57,6	27,0		36,4	34,4	33,0		54,0		0,80	0,40	56,4	2,6
	±	±	±	±	±	0	±	±	±	0	±	0	±	±	±	±
	1,14	0,55	1,14	0,55	1,58		1,14	0,55	1,58		1,58		0,84	0,55	1,14	0,55
St II <sub>11-30</sub>	18,2	65,6	28,2	57,6	21,0		33,2	52,6	53,8	11,4	48,8	5,4	10,8	4,40	52,8	5,40
	±	±	±	±	±	0	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,84	0,55	0,84	0,55	1,58		0,84	0,55	0,84	0,55	0,84	0,55	0,84	0,55	0,84	0,55
St I <sub>1-31</sub>	12,4	70,4	27,0	57,0	20,8	26,4	36,2	41,2	42,2	3,6	31,4		0,80	0,40	0,80	0,40
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	0	±	±	±	±
	1,14	0,55	1,00	0,71	0,84	0,55	0,84	0,84	0,84	0,55	1,14		0,84	0,55	0,84	0,55
St I <sub>12-31</sub>	29,6	63,6	19,8	22,8	28,2	26,2	38,2	49,6	61,6	1,60		2,0	1,4	0,4	42,4	0,4
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	1,14	0,55	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,55	1,14	0,55	59,0	±	1,00	±	1,14	0,55

Os valores da constante de ligação,  $K$ , e o ganho de estrutura secundária para os peptídeos na presença de SUV contendo POPA e de micelas contendo LPA evidenciam a importância de interações eletrostáticas para a ligação dos peptídeos. Ainda, enquanto que St II<sub>1-30</sub> (carga líquida +2 em pH 7,0) se ligou em grande extensão a membranas modelo contendo carga líquida negativa (em pH 7,0 a carga líquida negativa do grupo fosfato de POPA e LPA é de -1), St I<sub>1-31</sub> (carga líquida 0), que possui resíduos com carga negativa em sua porção N-terminal (Glu2 e Asp9) se ligou em menor extensão. O estudo da interação dos peptídeos com membranas contendo SM, na presença ou ausência de POPA, sugere que este esfingofosfolípido tem papel importante para a ligação de St II<sub>1-30</sub> a bicamadas. Esse peptídeo parece ser o único a se ligar a SUV de POPC:SM (90:10). Além disso, o aumento do conteúdo de SM de 10 para 15% em membranas contendo 10% de POPA levou a um aumento significativo da constante de ligação.

A interação de St II<sub>1-30</sub> com SUV de POPC:DPPC (90:10) mostrou que, apesar de haver interação do peptídeo com as SUV ( $K = 6,7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ), esta ocorre em menor extensão quando comparado com SUV contendo 10% de SM. Isso sugere uma possível especificidade de interação com SM. Um estudo de NMR de estado sólido do peptídeo correspondente aos 32 primeiros resíduos da região N-terminal de Eqt II mostrou interação mais intensa com bicamadas contendo SM do que com bicamadas de dimiristoilfosfatidilcolina (Lam et al., 2009). Com mencionado acima, o estudo da interação dos peptídeos com bicamadas contendo maiores conteúdos de SM ou DPPC foi comprometido pelo espalhamento de luz causado por essas amostras.

Enquanto não foi observada ligação dos peptídeos a SUV de POPC, todos se ligaram em grande extensão a micelas de LPC, adquirido conteúdo de hélice

próximo a 100%. Esta interação diferencial indica que a ligação a micelas e bicamadas é dirigida por fatores qualitativa e/ou quantitativamente diferentes. Considerando que as cabeças polares são as mesmas, é provável que diferenças de empacotamento molecular entre micelas e bicamadas influenciem a ligação (ver abaixo).

## **5.2 A ligação a bicamadas e micelas promove alteração na organização molecular dos lipídios**

Os valores de K obtidos para os peptídeos na presença de SUV de composições diversas indicam que a interação peptídeo-membrana é sensível à composição lipídica. Estudos de EPR da interação dos peptídeos com MLV e micelas foram realizados observando alterações promovidas pelos peptídeos no espectro de três marcadores de spin incorporados nas membranas modelo. Com a técnica de EPR é possível utilizar amostras com maior proporção de SM e DPPC, uma vez que a turbidez da amostra não tem influência sobre os espectros.

A análise dos espectros de EPR foi feita medindo a porcentagem de variação promovida pelos peptídeos nos parâmetros: relação de alturas  $h_0/h_{+1}$ , parâmetro de ordem (S), largura da linha de campo central ( $\Delta W_0$ ), e separação entre os extremos externos,  $2A_{max}$ . Aumentos nos valores de todos os parâmetros indicam que a ligação dos peptídeos induz um aumento da ordem e/ou mobilidade dos lipídios na membrana. De uma forma geral, serão empregados as expressões empacotamento ou organização molecular para indicar esses efeitos de forma combinada.

## **5.3 Efeito da Carga**

Para avaliar o efeito da carga da membrana sobre o empacotamento molecular dos lipídios resultante da interação com MLV e micelas, foi comparada a

variação nos valores da relação de alturas  $h_0/h_{+1}$ , para os espectros dos marcadores 5-MeSL e 16-PCSL, e a variação de S para os espectros de 5-PCSL em MLV (Tabelas 20-22) contendo ou não POPA e em espectros de 5-MeSL em micelas contendo ou não LPA (Tabela 23).

Tabela 20. Porcentagem de variação de  $h_0/h_{+1}$  nos espectros de 5-MeSL em MLV.

Peptídeo	POPC	POPC:POPA (90:10)	POPC:SM (90:10)	POPC:SM:POPA (80:10:10)
St II <sub>1-30</sub>	9,09	17,1	11,9	13,4
St II <sub>11-30</sub>	4,55	6,72	2,93	3,96
St I <sub>1-31</sub>	3,03	2,07	-0,5	3,96
St I <sub>12-31</sub>	2,02	8,29	11,9	8,91

Tabela 21. Porcentagem de variação de S nos espectros de 5-PCSL.

Peptídeo	POPC	POPC:POPA (90:10)	POPC:SM (90:10)	POPC:SM:POPA (80:10:10)
St II <sup>1-30</sup>	4,20	5,80	4,23	4,23
St II <sub>11-30</sub>	0	0	0	0
St I <sub>1-31</sub>	0	1,45	0	-1,41
St I <sub>12-31</sub>	0	1,45	0	2,82

Tabela 22. Porcentagem de variação de  $h_0/h_{+1}$  nos espectros de 16-PCSL.

Peptídeo	POPC	POPC:POPA (90:10)	POPC:SM (90:10)	POPC:SM:POPA (80:10:10)
St II <sub>1-30</sub>	4,63	7,34	4,46	3,57
St II <sub>11-30</sub>	-0,92	-1,83	-1,07	-0,89
St I <sub>1-31</sub>	2,78	0	0	0
St I <sub>12-31</sub>	0	-0,92	-0,84	0

Tabela 23. Porcentagem de variação de  $h_0/h_{+1}$  e da largura da linha campo central,  $\Delta W_0$ , nos espectros de 5-MeSL em micelas

Peptídeo	LPC	LPC:LPA (90:10)	LPC	LPC:LPA (90:10)
	$h_0/h_{+1}$		$\Delta W_0$	
St II <sub>1-30</sub>	51,5	62,1	20,01	21,45
St II <sub>11-30</sub>	36,2	26,9	18,00	21,41
St I <sub>1-31</sub>	33,9	27,0	15,01	14,29
St I <sub>12-31</sub>	30,4	42,0	7,16	9,99

Os valores das tabelas 20-23 mostram que, de maneira geral, a introdução de POPA nas bicamadas e de LPA nas micelas promove um aumento da organização molecular, tanto nas bicamadas como nas micelas, em consequência da interação com os peptídeos. Nota-se ainda que os espectros de 5-MeSL foram mais sensíveis à interação com os peptídeos do que os espectros dos fosfolipídios marcados. É também possível observar que o efeito em MLV foi muito mais pronunciado no caso de St II<sub>1-30</sub>, tanto em ausência como em presença dos lipídios carregados negativamente. O fato de que os espectros de 16-PCSL também revelam um aumento do empacotamento no caso de St II<sub>1-30</sub> (Tabela 22) sugere que os resíduos 1-10 do peptídeo penetram na região das cadeias acila.

Quando se comparam os efeitos da incorporação de POPA em MLV contendo SM, observa-se também, de maneira geral, um aumento da organização dos lipídios na presença do fosfolipídio carregado negativamente (Tabelas 20-22).

Alterações consideráveis foram observadas nos espectros de 5-MeSL incorporado em micelas em consequência da interação com todos os peptídeos. A Tabela 23 apresenta a variação dos parâmetros  $h_0/h_{+1}$  e  $\Delta W_0$ . Quando se examina a variação de  $h_0/h_{+1}$ , observa-se que a incorporação de LPA levou a um maior empacotamento molecular no caso da interação com St II<sub>1-30</sub> e St I<sub>12-30</sub>, e uma diminuição desse empacotamento no caso de St II<sub>11-30</sub> e St I<sub>1-31</sub>. A diminuição do efeito no caso de St I<sub>1-31</sub> poderia dever-se às cargas negativas dos resíduos Glu2 e Asp9, que sofreriam repulsão das cabeças polares carregadas negativamente de LPA. Essa possibilidade é corroborada pela observação de um efeito menor também quando se examina a variação de  $\Delta W_0$ . Contudo, seria de se esperar que o efeito aumentasse para St II<sub>11-30</sub>. De fato, isso é observado na análise de  $\Delta W_0$ , sugerindo que a relação das alturas não é um parâmetro adequado para a análise do espectro

do marcador nessa amostra. É possível que a presença de duas componentes espectrais (Seção 4.2.3), especialmente o pico estreito de campo baixo, introduza uma imprecisão significativa nessa medida.

Também foram observados baixos conteúdos de  $\alpha$ -hélice para St II<sub>1-30</sub> na presença LPC:LPA (90:10) em comparação St I<sub>1-31</sub>, enquanto que os valores de K para St II<sub>1-30</sub> foram significativamente maiores. Neste caso foi observado que a interação de St II<sub>1-30</sub> com micelas de LPC:LPA (90:10) levou a um aumento do conteúdo de folhas  $\beta$ , provavelmente devido a agregação do peptídeo.

O maior efeito em micelas quando comparado com bicamadas será discutido mais abaixo (Seção 5.6).

#### 5.4 Efeito de SM

O efeito da presença de SM também foi avaliado utilizando os três marcadores: 5-MeSL, 5-PCSL e 16-PCSL, os valores de  $h_0/h_{+1}$  e S estão apresentados nas tabelas 24 a 26.

Tabela 24. Porcentagem de variação de  $h_0/h_{+1}$  ou S nos espectros de 5-MeSL.

Peptídeo	$h_0/h_{+1}$		S
	POPC	POPC:SM (90:10)	POPC:SM (50:50)
St II <sub>1-30</sub>	9,09	11,9	18,5
St II <sub>11-30</sub>	4,55	2,93	11,3
St I <sub>1-31</sub>	3,03	-0,5	3,70
St I <sub>12-31</sub>	2,02	11,9	1,23

Tabela 25. Porcentagem de variação S nos espectros de 5-PCSL.

Peptídeo	POPC	POPC:SM (90:10)	POPC:SM (50:50)
St II <sub>1-30</sub>	4,20	4,23	3,95
St II <sub>11-30</sub>	0	0	0
St I <sub>1-31</sub>	0	0	0
St I <sub>12-31</sub>	0	0	1,32

Tabela 26. Porcentagem de variação de  $h_0/h_{+1}$  nos espectros de 16-PCSL.

Peptídeo	POPC	POPC:SM (90:10)	POPC:SM (50:50)
St II1-30	4,63	4,46	7,40
St II11-30	-0,92	-1,07	2,22
St I1-31	2,78	0	0
St I12-31	0	-0,84	-1,36

De uma forma geral, os valores nas Tabelas 24-26 sugerem que a incorporação de SM às bicamadas levou a um aumento da organização molecular como resultado da interação com os peptídeos, e, em maior extensão, com St II<sub>1-30</sub>. Novamente apenas os espectros de 5-MeSL se mostraram sensíveis às alterações promovidas por todos os peptídeos; os espectros de 5-PCSL e 16-PCSL se mostraram sensíveis apenas a alterações promovidas por St II<sub>1-30</sub>.

Na tabela 24 são apresentados os valores da variação  $h_0/h_{+1}$  para os espectros de 5-MeSL em POPC e em POPC:SM:POPA 90:10:10 e os valores da variação de S para os espectros do marcador em POPC:SM (50:50). Apesar destes valores se referirem a parâmetros diferentes, a comparação entre eles tem como objetivo mostrar que o aumento do conteúdo de SM levou ao aumento da interação dos peptídeos com a bicamada. A comparação dos valores nas tabelas 25 e 26 sugere que os espectros de 16-PCSL foram mais sensíveis às alterações promovidas por St II<sub>1-30</sub> nas bicamadas, principalmente em bicamadas contendo proporções iguais de POPC e SM. Tal comportamento já foi descrito na literatura: estudos com 5-PCSL incorporado em bicamadas de POPC:SM (50:50) mostraram que nessa composição este marcador não é sensível à presença de uma fase mais ordenada (rica em SM) (Veiga et al., 2000, 2001; Collado et al., 2005).

## 5.5 Efeito da coexistência de fases

Tem sido descrito na literatura que misturas ternárias de POPC:SM:colesterol (Col) em certas proporções apresentam distribuição heterogênea dos lipídios com formação de microdomínios (revisão em Goñi et al., 2008). Esse tipo de comportamento também foi observado para misturas ternárias de POPC:DPPC:Col (Zhao et al, 2007).

Martinez et al (2007) estudaram a ligação de St II a lise de vesículas lipídicas carregadas com sonda fluorescente em membranas compostas de fosfatidilcolina de ovo e/ou SM, contendo ou não Col. componentes Esses estudos mostraram que tanto a ligação da toxina como o vazamento do conteúdo interno das vesículas foram maiores na presença de composições ternárias dos lipídios (Martínez et al., 2007). Além disso, estudos de microscopia de epifluorescência e vazamento (Barlic et al., 2004) e por microscopia confocal da interação de Eqt II com membranas modelo observaram que a formação de poro foi dependente da presença de coexistência de fases em bicamadas de POPC:SM:Col e, também, que Eqt II se localiza na interface entre estas fases (Schön et al., 2008).

Neste trabalho não foi investigado o papel do Col na interação dos peptídeos com bicamadas. Porém, estudos existentes de diagramas de fase dos sistemas binários POPC:SM e POPC:DPPC sugerem a coexistência de fases para certas proporções dos lipídios (Pokorny et al., 2006, figura 54A e Curatolo et al., 1985, figura 54B).

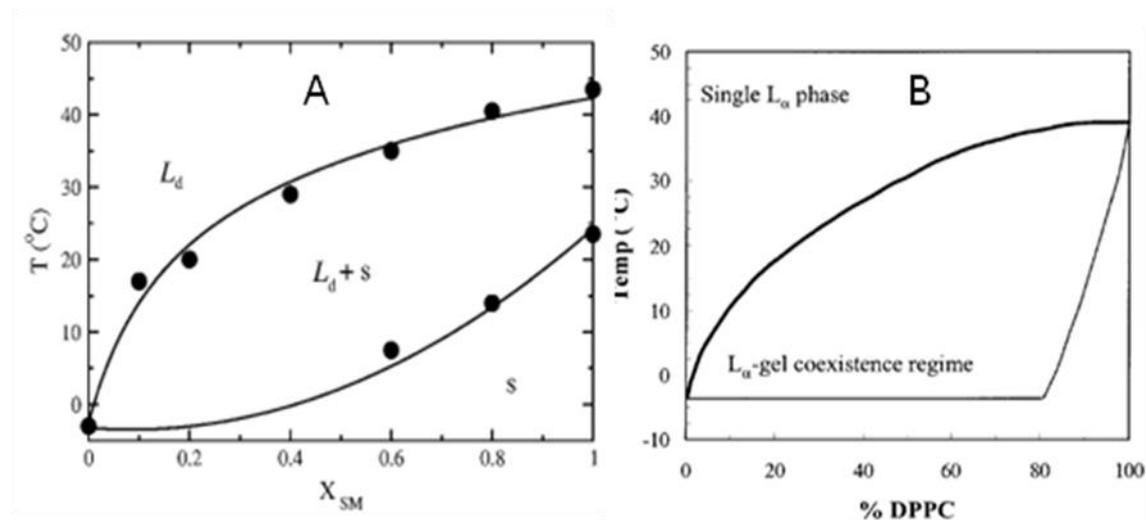


Figura 54. Diagramas de fase dos sistemas binários (A) POPC:SM (Pokorny et al, 2006) e (B) POPC:DPPC (Curatolo et al., 1985).

Com base nessas informações, decidiu-se investigar, por meio de EPR sistemas binários de POPC:SM nas composições 90:10 e 50:50, bem como sistemas binários POPC:DPPC, nas mesmas proporções. Dessa forma, buscou-se verificar se a presença de SM em condições de não formação de microdomínios (10 %, Figura 54A) teria um papel na ligação de StII1-30 à bicamada. Por outro lado, amostras contendo 50 % de SM dão origem a coexistência de fases. Assim, essas amostras permitiram examinar o papel dessa topografia na interação do peptídeo com a bicamada. Ainda, a fim de avaliar a se especificidade atribuída à SM na interação com as toxinas também ocorre em relação aos peptídeos, foram estudadas membranas onde SM foi substituída por DPPC, cujo diagrama de fases apresenta comportamento análogo ao do esfingolípido.

Os estudos de CD da interação de St II<sub>1-30</sub> com SUV contendo 10% de SM apresentados sugeriram que o peptídeo se liga as vesículas mais fortemente do que na ausência desse lipídio e que a presença de 10 % de DPPC também intensifica a

ligação. O efeito de St II<sub>1-30</sub> sobre membranas contendo 10 %, 50 %, e 100 % de SM ou DPPC foi examinado através dos espectros de EPR de 5-MeSL (figura 48). A Tabela 14 (Seção 4.2.2) mostra que a introdução desses lipídios levou a um aumento da organização molecular maior do que o observado para POPC, mas o efeito foi pequeno para os dois lipídios nas proporções de 10 e 100 %. Ao contrário, o efeito foi bastante pronunciado para 50 %. Os resultados para 10% de SM e DPPC estão em contraste com os resultados de CD, que evidenciaram ligação considerável do peptídeo às membranas contendo 10 % desses lipídios ( $K = 1,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  para 10 % de SM e  $6,7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  para 10 % DPPC). A Tabela 27 abaixo reúne a avaliação de vários parâmetros medidos nos espectros de EPR ( $h_0/h_{+1}$ ,  $\Delta W_0$  e  $A_{\max}$ ). Nota-se que, apesar da pequena variação para 10 % de SM e DPPC, a tendência é de um aumento do efeito, quando comparado a POPC sozinha. O efeito também foi pequeno para 100 % de SM e DPPC. Por outro lado, o efeito foi considerável para 50 % desses lipídios. Dessa forma fica claramente evidenciada a importância da coexistência de fases para o efeito de St II<sub>1-30</sub> sobre a organização molecular da bicamada.

Tabela 27. Porcentagem de variação de  $h_0/h_{+1}$ ,  $\Delta W_0$ , e  $A_{\max}$  promovida por St II<sub>1-30</sub> nos espectros de 5-MeSL incorporado em bicamadas de composição variada.

	POPC	POPC:SM (90:10)	POPC:SM (50:50)	SM	POPC	POPC:DPPC (50:50)	POPC:DPPC (50:50)	DPPC
$h_0/h_{+1}$	9,09	11,9	--	--	9,09	15,9	--	--
$\Delta W_0$	6,27	8,81	11,1	5,99	6,27	6,08	16,7	-2,08
$A_{\max}$	4,54	4,08	12,33	0,33	4,54	5,98	19,44	2,10

## 5.6 Ligação a micelas – possível modelo do poro toroidal

A ligação dos peptídeos a micelas de LPC e LPC:LPA (90:10) foi observada tanto por CD como por EPR; ambas as técnicas indicaram extensas alterações conformacionais dos peptídeos, com quase todos os resíduos adquirindo

conformação helicoidal (Tabela 18) e pronunciado aumento do grau de empacotamento dos agregados micelares (Tabela 28). Os resultados mostraram claramente que a ligação a micelas ocorre de forma qualitativa (diferente influência de interações eletrostáticas) e quantitativamente (valores de K, Tabela 6) diferente da ligação a bicamadas, mesmo considerando que as cabeças polares dos compostos formadores de ambas as estruturas são as mesmas. Além do alto conteúdo de  $\alpha$ -hélice, observado por CD (Tabela 18), o aumento da organização molecular das micelas, observado por EPR (Tabela 28), ocorreu em muito maior extensão do que em bicamadas. A interação com os peptídeos promoveu o aparecimento de uma componente bastante imobilizada, apresentando extremos externos e internos, no espectro de 5-MeSL (figura 49), enquanto que a interação com as bicamadas levou apenas ao alargamento das linhas espectrais.

Tabela 28. Porcentagem de variação de  $h_0/h_{+1}$  nos espectros de 5-MeSL incorporado em micelas e MLV.

Peptídeo	POPC	LPC	POPC:POPA (90:10)	LPC:LPA (90:10)
St II <sub>1-30</sub>	9,09	51,5	17,1	62,1
St II <sub>11-30</sub>	4,55	36,2	6,72	26,9
St I <sub>1-31</sub>	3,03	33,9	2,07	27,0
St I <sub>12-31</sub>	2,02	30,4	8,29	42,0

Os valores da porcentagem de variação do parâmetro  $h_0/h_{+1}$  (Tabela 28) indicam que St II<sub>1-30</sub> teve maior efeito sobre a organização molecular das micelas, possivelmente devido à interação do segmento hidrofóbico compreendendo os resíduos 1 a 10 com as cadeias acila dos lisofosfolípídios.

Estudos de SAXS tiveram como objetivo verificar se a interação com St II<sub>1-30</sub> teria um efeito sobre a forma e tamanho de micelas. Foi realizado um estudo preliminar com micelas de LPC. Os resultados mostraram que a ligação do peptídeo

a essas micelas levou à diminuição do raio parafínico ( $R_{\text{par}}$ , raio da região hidrofóbica, figura 51), enquanto a espessura da região polar da micela ( $\rho_{\text{pol}}$ , figura 51) aumentou (Tabela 16). Assim, apesar da interação com St II<sub>1-30</sub> diminuir o raio hidrofóbico da micela, o aumento da espessura da região polar faz com que não haja alteração significativa no seu tamanho. Também foi observada diminuição na anisometria (relação entre os raios da micela, que possui forma elipsóide), de 1,7 para 1,4, indicando que a interação com o peptídeo promove alteração da forma do agregado.

A partir dos valores de  $R_{\text{par}}$ ,  $\rho_{\text{pol}}$  e da anisometria foram calculados os raios da micelas na ausência e na presença de St II<sub>1-30</sub>, e a partir destes valores foi calculado o tempo de correlação rotacional  $\tau$ , na ausência e presença do peptídeo, fazendo uso da equação de Stokes-Einstein (equação 11, Seção 3.5.3) (Tabela 29).

Tabela 29. Raio da micela de LPC e tempo de correlação rotacional  $\tau$  na ausência e na presença de St II<sub>1-30</sub>.

	eixo curto		eixo longo	
	raio (Å)	$\tau$ ( $10^{-8}$ s)	raio (Å)	$\tau$ ( $10^{-8}$ s)
Sem peptídeo	29,0	2,4	41,95	7,3
St II <sub>1-30</sub>	28,5	2,3	34,50	4,03

Os valores de  $\tau$  indicam que as micelas se encontram paradas na escala de tempo do EPR e que os espectros refletem as propriedades de organização molecular de seus componentes. Assim, as alterações espectrais induzidas pela ligação de St II<sub>1-30</sub> permitem concluir que ocorreu um pronunciado aumento no empacotamento molecular. Por outro lado, os resultados de SAXS mostraram que não ocorreram alterações drásticas na forma ou tamanho da micela (por exemplo, agregação de micelas). O aumento da espessura da região da cabeça polar é provavelmente resultante da inserção do peptídeo nessa região e a diminuição do

raio parafínico poderia ser decorrente (de um aumento) da interdigitação das cadeias alifáticas. Vale lembrar que os resíduos 1-10 do peptídeo provavelmente também se encontram inseridos nessa região.

A interação diferencial entre micelas e bicamadas é provavelmente decorrente de diferenças no empacotamento molecular entre os dois tipos de agregados. O empacotamento resultante da curvatura positiva em uma micela possivelmente se assemelha àquele presente na estrutura do poro toroidal (figura 55). Assim, enquanto a interação com a bicamada representaria a etapa de ligação da região N-terminal das toxinas, com a  $\alpha$ -hélice anfipática acomodada na interface membrana-água e a penetração inicial dos resíduos 1-10 (ou 1-11) na região das cadeias acila, a topografia da sequência 1-30 (ou 1-31) nas micelas corresponderia ao comportamento dessa região no poro toroidal, agora com o segmento 1-10 ancorando mais fortemente a hélice anfipática à região das cadeias acila. A hélice anfipática permaneceria na região das cabeças polares formando, juntamente com estas as paredes do poro. Essa localização é também sugerida pelo aumento da espessura da região das cabeças polares evidenciado por SAXS. Tem sido proposto que a região do poro consistiria de lipídios formadores de curvatura positiva, como os lisofosfolipídios, formadores de micelas (Valcarcel et al., 2001; Lohner e Blondele, 2005).

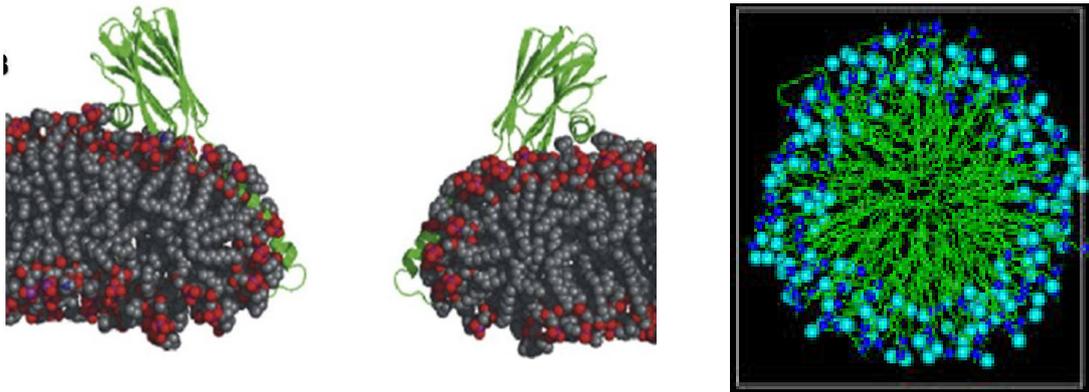


Figura 55. Empacotamentos e curvatura dos lipídios no poro toroidal são semelhantes aos observados em uma micela.

### 5.7 Implicações para o mecanismo de ação das toxinas

Os resultados obtidos neste estudo fornecem subsídios para a compreensão a nível submolecular das alterações conformacionais e do mecanismo de ligação e interação com membranas alvo das toxinas St I e St II. Detalhes mecânicos e topográficos da formação do poro podem ser propostos em base a esses resultados.

O conhecimento existente a respeito da interação de actinoporinas com membranas biológicas e modelo tem levado à proposta de que essas toxinas, (cuja estrutura é conhecida para St II e Eq II) ligam-se à membrana alvo através de um grupo de resíduos aromáticos, ancorando-se na bicamada sem que o corpo da proteína penetre profundamente na mesma. SM tem sido vista como desempenhando papel importante na ligação das toxinas.

Em seguida, ocorreria dissociação da região N-terminal do corpo da proteína com a acomodação da hélice anfipática na interface membrana-água. A habilidade do segmento anterior a essa hélice (resíduos 1-10 (ou 1-11) de penetrar na membrana dependeria do caráter hidrofóbico desse segmento e poderia ser

responsável, ao menos, parcialmente pela diferente atividade hemolítica dessas toxinas.

Numa etapa posterior, ocorreria a oligomerização das proteínas e, num processo dependente da presença de lipídios com propensão à formação de curvatura positiva, formar-se-ia um poro toroidal, cuja superfície seria recoberta pela hélice anfipática da proteína e as cabeças polares dos lipídios. Vários estudos, tanto com as proteínas inteiras como com fragmentos da região N-terminal, tem mostrado que a extensão da hélice determinada em solução aumenta em consequência da interação com a membrana.

Em estudos de epifluorescência e microscopia confocal com a Eq II, foi observado que a proteína tende a se concentrar na região de fronteira entre domínios líquido-ordenados (Lo, formados pelo enriquecimento em SM e Col) e líquido-desordenados (Ld, formados por fosfolipídios insaturados como POPC). Devido à diferença de empacotamento entre Lo e Ld e, eventualmente da espessura dos dois tipos de domínios (mismatch), a fronteira entre ambos seria uma região irregular, criando espaços inexistentes em outras regiões da membrana. Em base a esses dados foi proposto que as actinoporinas ligam-se preferencialmente a regiões Lo e que a formação do poro ocorreria nos espaços da fronteira Lo-Ld.

A figura 56 apresenta um esquema das várias possíveis etapas (conhecidas ou propostas) envolvidas na interação das actinoporinas com membranas.

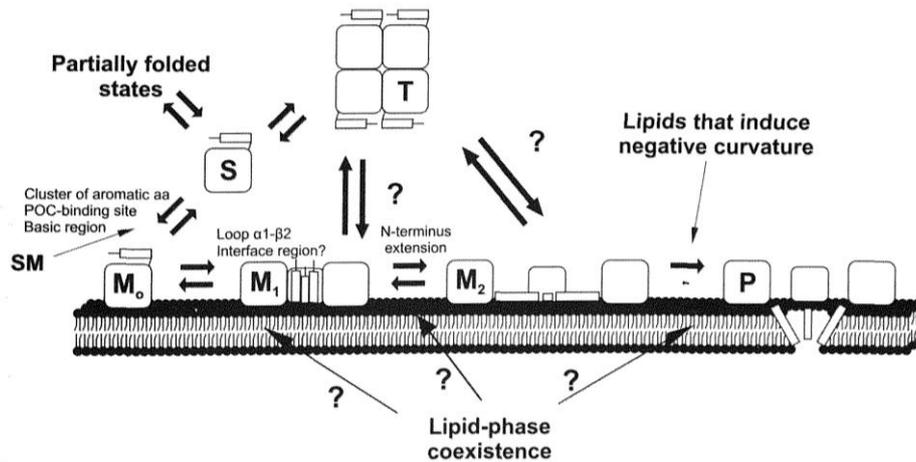


Figura 55. Modelo proposto para a formação de poro por actinoporinas (tirado de Alegre-Cebollada et al., 2007a). Monômeros das toxinas estão desenhados como quadrados (representando o sanduiche de folhas  $\beta$  e a hélice C-terminal) e um apêndice retangular (representando a  $\alpha$ -hélice N-terminal). S: monômero em água. T: tetrâmero em água.  $M_0$ : monômero ligado a membrana.  $M_1$  e  $M_2$ : tetrâmeros ligados a membrana sem formar poro. P: poro tetramérico.

No contexto das idéias existentes, acima apresentados, para a descrição do mecanismo de interação das actinoporinas com membranas e formação de poro por essas proteínas, os resultados obtidos neste trabalho para os peptídeos derivados de St I e St II corroboram de forma inequívoca vários aspectos dos eventos propostos como etapas desse mecanismo. Assim, foi inicialmente, observado que os fragmentos são capazes de causar hemólise, sendo St II<sub>1-30</sub> mais ativo que St I<sub>1-31</sub>, mostrando que essa região da proteína é capaz de formar poros.

Estudos conformacionais mostraram que os peptídeos, ao se ligar a membranas modelo possuem a capacidade de adquirir estrutura  $\alpha$ -helicoidal, como essa mesma região nas proteínas inteiras. Foi ainda visto que a extensão da hélice é maior do que a determinada para as proteínas em solução (10-11 resíduos).

Estudos com variação da composição lipídica mostraram a importância da presença de SM para a ligação. Contudo, observou-se que a presença de microdomínios teve um papel mais importante para a ligação dos peptídeos. Em base a esses resultados, é concebível que a molécula individual de SM seja necessária para o ancoramento do grupo de resíduos aromáticos da proteína (ausente nos peptídeos estudados), tendo sido determinado o sítio de ligação de fosforilcolina na estrutura cristalina de St II, mas que a molécula individual não tenha um papel tão relevante na ligação da região N-terminal à membrana.

Por outro lado, a coexistência de microdomínios ordenados e desordenados, mesmo sem a presença de SM, levou a um aumento considerável da ligação dos peptídeos, corroborando o papel proposto para essa topografia no mecanismo de ação das actinoporinas.

Finalmente, os estudos com micelas representaram uma mimetização da topografia do próprio poro toroidal. É extremamente interessante que os peptídeos adquiriram conformação  $\alpha$ -helicoidal em praticamente toda a sua extensão quando da ligação a esses agregados.

Assim, foram obtidos uma série de resultados que corroboram as propostas existentes para a sequência de eventos que ocorrem no processo de ligação das actinoporinas a membranas e da formação de poro por essas proteínas. Os resultados mostraram ainda que fragmentos de proteínas são capazes de mimetizar o comportamento dessas proteínas, tanto do ponto de vista conformacional como funcional.

## 6. REFERÊNCIAS

- Ahmed SN, Brown DA, London E. On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent insoluble liquid-ordered lipid phase in model membranes. *Biochemistry* 1997; **36**:10944-10953.
- Alegre-Cebollada J, del Pozo AM, Gavilanes JG, Goormaghtigh E. Infrared spectroscopy study on the conformational changes leading to pore formation of the toxin Sticholysin II. *Biophys J* 2007b; **93**: 3191-3201.
- Alegre-Cebollada J, Oñaderra M, Gavilanes JG, Martínez Del Pozo A. Sea anemone actinoporins: The transition from a folded soluble state to a functionally active membrane-bound oligomeric pore. *Curr Protein Pept Sci* 2007a; **8**: 558-572.
- Alvarez C, Casallanovo F, Shida CS, Nogueira LV, Martinez D, Tejuca M, Pazos IF, Lanio ME, Menestrina G, Lissi E, Schreier S. Binding of sea anemone pore-forming toxins sticholysins I and II to interfaces - modulation of conformation and activity and lipid-protein interaction. *Chem Phys Lipids* 2003; **122**: 97-105.
- Álvarez C, Mancheño JM, Martínez D, Tejuca M, Pazos F, Lanio ME. Sticholysins two pore-forming toxins produced by Caribbean sea anemone *Stichodactyla helianthus*: their interaction with membranes. *Toxicon* 2009; **54**: 1135-1147.
- Alvarez, C, Lanio, ME, Tejuca, M, Martínez, D, Pazos, F, Campos, AM, Encinas, MV, Pertinhez, T, Schreier, S, Lissi, EA. The role of ionic strength on the enhancement of the hemolytic activity of Sticholysin I, a cytolysin from *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* 1998; **36**:165-178.
- Alvarez, C, Pazos IF, Lanio, ME, Martínez, D, Schreier, S, Casallanovo, F, Campos, AM, Lissi, EA. Effect of pH on the conformation, interaction with membranes and hemolytic activity of Sticholysin II, a pore forming cytolysin from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* 2001; **39**: 539-553.
- Anderluh G, Barlic A, Podlesek Z, Macek P, Pungercar J, Gubensek F, Zecchini ML, Serra MD, Menestrina G. Cysteine-scanning mutagenesis of an eukaryotic pore-forming toxin from sea anemone. *Eur J Biochem* 1999; **263**: 128-136.

- Anderluh G, Dalla Serra M, Viero G, Guella G, Macek P, Menestrina G. Pore formation by equinatoxin II a eukaryotic protein toxin occurs by induction of nonlamellar lipid structures. J Biol Chem 2003; **46**: 45216-45223.
- Anderluh G, Macek P. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemone (Anthozoa:Actiniaria). Toxicon 2002; **40**: 111-124.
- Anderluh G, Pungencar J, Krizaj I, Strukelj B, Gubensek F, Macek P. N-terminal truncation mutagenesis of equinatoxin II a pore-forming protein from the sea anemone *Actinia equina*. Protein Eng 1997; **10**: 751-755.
- Anderluh G, Razpotnik A, Podlesek Z, Macek P, Separovich F, Norton RS. Interaction of the eukaryotic pore-forming cytolysin equinatoxin II with model membranes: <sup>19</sup>F NMR studies. J of Mol Biol 2005; **347**: 27-39.
- Athanasiadis A, Anderluh G, Macek P, Turk D. Crystal Structure of the Soluble Form of Equinatoxin II a Pore-Forming Toxin from the Sea Anemone *Actinia equina*. Structure 2001; **39**: 341-346.
- Atherton E, Sheppard R C. Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach. Oxford University Press 1989.
- Bakht O, Pathak P, London E. Effect of the Structure of Lipids Favoring Disordered Domain Formation on the Stability of Cholesterol-Containing Ordered Domains (Lipid Rafts): Identification of Multiple Raft-Stabilization Mechanisms. Biophys J 2007; **93**: 4307-4318.
- Bakrac B, Gutiérrez-Aguirre I, Podlesek Z, Sonnen AFP, Gilbert RJ, Macek P, Lakey JH, Anderluh G. Molecular determinants of sphingomyelin of a eukaryotic pore-forming toxin. J Biol Chem 2008; **283**: 18665-18677.
- Barbosa LR, Wilker C, Itri R, Homem de Mello P, Santiago PS, Tabak M. Interaction of Phenothiazine Compounds with Zwitterionic Lysophosphatidylcholine Micelles: Small Angle X-ray Scattering Electronic Absorption Spectroscopy and Theoretical Calculations. J Phys Chem B 2006; **110**: 13086-13093.
- Barlic A, Gutierrez-Aguirre I, Caaveiro JMM, Cruz A, Ruiz-Argüello MB, Pérez-Gil J, González-Mañas JM. Lipid phase coexistence favors membrane insertion of

equinatoxin-II apore forming toxin from *Actinia equina*. J Biol Chem 2004; **279**: 34209-34216.

Belmonte G, Pederzoli C, Macek P, Menestrina G. Pore formation by the sea anemone cytolyisin equinatoxin II in red blood cells and model lipid membranes. J of Memb Biol 1993; **131**: 11-22.

Berliner LJ, McConnell HM. A spin-labeled substrate for  $\alpha$ -chymotrypsin. PNAS 1966; **55**: 708-712.

Bernheimer AW, Avigad LS. Properties of a toxin from the sea anemone *Stoichactis heliantus* including specific binding to sphingomyelin. PNAS 1976; **73**: 467-471.

Bianconi ML, do Amaral AT, Schreier S. Use of membrane spin label spectra to monitor rates of reaction of partitioning compounds: hydrolysis of a local anesthetic analog. Biochem Biophys Res Commun 1988; **152**:344-50.

Birk C, Damian L, Marty-Detraves C, Lougarre A, Schulze-Briese C, Koehl P, Fournier D, Paquereau L, Samara JP. A new lectin family with structure similarity to actinoporins revealed by crystal structure of *Xenocomus chrysenteron* lectin XLC. J Mol Biol 2004; **344**: 1409-1420.

Boeyens CA, McConnell HM. Spin-labeled hemoglobin. PNAS 1966; **56**: 22-25.

Boocock DGB, Ullman EF. Studies of stable free radicals. III. A 13-dioxy-2-imidazolidone zwitterion and its stable nitronyl nitroxide radical anion. JACS 1968; **90**: 6873-6874.

Brown DA, London E. Functions of lipids rafts in biological membranes. Annu Rev Cell Dev Biol 1998a; **14**: 111-136.

Brown DA, London E. Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. J Membr Biol 1998b; **15**: 103-114.

Brown DA, Rose JK. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipids-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. Cell 1992; **68**:533-544.

- Bustamante C, Tinoco I, Maestre MF. Circular differential scattering can be an important part of the circular dichroism of macromolecules. PNAS 1983; **80**: 3568-3572.
- Casallanovo F, Oliveira F J, Souza F C, Ros U, Martínez Y, Pentón D, Tejuca M, Martínez D, Pazos F, Pertinhez T A, Spisni A, Cilli EM, Lanio ME, Alvarez C, Schreier S. Model Peptides Mimic the Structure and Function of the N-terminus of the Pore-Forming Toxin Sticholysin II. Biopolymers 2006; **84**: 169-180.
- Castrillo I, Alegre-Cebollada J, del-Pozo AM, Gavilanes JG, Bruix M.  $^1\text{H}$   $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  NMR assignments of StnII-R29Q a defective lipid binding mutant of the sea anemone actinoporin Sticholysin II. Biomol NMR Assign 2009b; **3**: 239-241.
- Castrillo I, Alegre-Cebollada J, del-Pozo AM, Gavilanes JG, Santoro J, Bruix M.  $^1\text{H}$   $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  NMR assignments of the actinoporin Sticholysin I. Biomol NMR Assign 2009a; **3**: 5-7.
- Castrillo I, Araujo NA, Alegre-Cebollada J, Gavilanes JG, del-Pozo AM, Bruix M. Specific interaction of sticholysin I with model membranes: An NMR study. Proteins 2010; **78**: 1959-1970.
- Cilli EM, Pigossi FT, Crusca EJr, Ros U, Martinez D, Lanio ME, Alvarez C, Schreier S. Correlations between differences in amino-terminal sequences os Sticholysins. Toxicon 2007; **50**: 1201-1204.
- Cole C, Barder JD, Barton GJ. The Jpred 3 secondary structure prediction server. Nucleic Acids Res 2008; **36**: 197-201.
- Collado MI, Goñi FM, Alonso A, Marsh D. Domain formation in sphingomyelin/cholesterol mixed membranes studied by spin-label electron spin resonance spectroscopy. Biochemistry 2005; **44**: 4911-4918.
- Curatolo W, Sears B, Neuringer L J. A Calorimetry and Deuterium NMR Study of Mixed Model Membranes of 1-palmitoyl-2-oleylphosphatidylcholine and Saturated Phosphatidylcholines. Biochim Biophys Acta 1985; **817**: 261-270.

- de los Ríos V, Mancheño JM, Lanio ME, Onaderra M, Gavilanes JG. Mechanism of the leakage induced on lipid model membranes by the hemolytic protein sticholysin II from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. Eur J Biochem 1998; **252**: 284-289.
- de los Ríos V, Mancheño JM, Martínez Del Pozo A, Alfonso C, Rivas G, Onaderra M, Gavilanes JG. Sticholysin II a cytolysin from the sea anemone *Stichodactyla helianthus* is a monomer-tetramer associating protein. FEBS Lett 1999; **455**: 27-30.
- de Paula E, Schreier S. Use of a novel method for determination of partition coefficients to compare the effect of local anesthetics on membrane structure. Biochim Biophys Acta 1995; **1240**:25-33.
- de Smet K, Contreras R. Human antimicrobial peptides: defensins cathelicidins and histatins. Biotechnol Lett 2005; **27**: 1337-1347.
- Drechsler A, Miles AJ, Norton RS, Wallace BA, Separovic F. Effect of lipid on the conformation of the N-terminal region of equinatoxin II: a synchrotron radiation circular dichroism spectroscopic study. Eur biophys J 2009; **39**: 121-127.
- Drechsler A, Poltrich C, Sabo JK, Frisanco M, Guella G, Dalla Serra M, Anderluh G, Separovic F, Norton RS. Structure and activity of the N-terminal region of the eukaryotic cytolysin equinatoxin II. Biochemistry 2006; 45: 1818-1828.
- Dyson HJ, Cross KJ, Houghten RA, Wilson IA, Wright PE, Lerner RA. The immunodominant site of a synthetic immunogen has a conformational preference in water for a type-II reverse turn. Nature 1985; **318**: 480-483.
- Dyson HJ, Wright PE. Antigenic peptides. FASEB J 1995; 9 37-42.
- Edidin M. The state of lipid rafts: from model membranes to cells. Annu Rev Biomol Struct 2003; **32**:257-283.
- Ferlan I, Lebez D. Equinatoxin a lethal protein from *Actinia equinal*. Purification and characterization. Toxicon 1974; **12**: 57-61.

- Franzoni L, Nicastro G, Pertinhez TA, Oliveira E, Nakaie CR, Paiva ACM, Schreier S, Spisni A. () Structure of two fragments of the third cytoplasmic loop of the rat Angiotensin II AT<sub>1</sub> receptor: implications with respect to receptor activation and G-protein selection and coupling. J Biol Chem 1999; **274**: 227-235.
- Franzoni L, Nicastro G, Pertinhez TA, Tatò M, Nakaie CR, Paiva AC, Schreier S, Spisni A. Structure of C-terminal fragment 300-320 of the rat angiotensin II AT<sub>1A</sub> receptor and its relevance with respect to G-protein coupling. J Biol Chem 1997; **272**: 9734-9741.
- Gaffney B.J., McConnell H.M. (1974) The paramagnetic resonance of spin labels in phospholipid membranes. J. Magn. Res. **16**: 1-28.
- Goñi MF, Alonso A, Bagatolli LA, Brown RE, Marsh D, Prieto M, Thewalt JL. Phase diagrams of lipid mixtures relevant to the study of membrane rafts. Biochim Biophys Acta 2008; **1781**: 665-684.
- Griffith OH, McConnell HM. A nitroxide-maleimide spin label. PNAS 1966; **55**: 8-11.
- Griffith OH, Waggoner AS. Nitroxide free radical: spin labels for probing biomolecular structure. Acc Chem Res 1969; **2**: 17-24.
- Guermeur Y, Geourjon C, Gallinari P, Deléage G. Improved performance in protein secondary structure prediction by inhomogeneous score combination. Bioinformatics 1999; **15**: 413-421.
- Gutierrez-Aguirre I, Podlesek Z, Barlic A, Macek P, Anderluh G, Gonzalez-Manas JM. Membrane insertion of the N-terminal alpha-helix of equinatoxin II a sea anemone cytolytic toxin. Biochem J 2004; **384**: 421-428.
- Gutiérrez-Aguirre I, Trontelj P, Macek P, Lankey JH, Anderluh G. Membrane binding of zebrafish actinoporin-like protein: af domains a novel superfamily of cell membrane binding domains. Biochem J 2006; **398**: 381-392.
- Heerklotz H e Epand RM. The enthalpy of acyl chain packing and the apparent water-accessible apolar surface area of phospholipids. Biophys J 2001; **80**: 271-279.
- Heller H, Schaefer M, Schulten K. Molecular dynamics simulation of a bilayer of 200 lipids in the gel and in the liquid crystal state. J Phys Chem 1993; **97**: 8343.

- Hoessli D, Rungger-Brandle E. Association of specific cell-surface glycoproteins with a Triton X-100-resistant complex of plasma membrane isolated from T-lymphoma cells. *Exp Cell Res* 1985; **156**: 239-250.
- Hinds MG, Zang W, Anderluh G, Hansen PE, Norton RS. Solution Structure of the Eukaryotic Pore-forming Cytolysin Equinatoxin II: Implications for Pore Formation. *J Mol Biol* 2002; **315**: 1219-1229.
- Hoffmann AK, Henderson AT. A new stable free radical: di-t-butyl nitroxide. *JACS* 1961; **83**:4671-4672.
- Hong Q, Gutierrez-Aguirre I, Barlic A, Malovrh P, Kristan K, Podlesek Z, Macek P, Turk D, González-Mañas J, Lakey J, Anderluh G. Two-step Membrane Binding by Equinatoxin II a Pore-forming Toxin from the Sea Anemone Involves an Exposed Aromatic Cluster and a Flexible Helix. *J Biol Chem* 2002; **277**: 41916-41924.
- Hooper NM, Turner A J. Ectoenzymes of the kidney microvillar membrane. *Biochem J* 1988; **250**: 865-869.
- Hsia JC, Schneider H, Smith ICP. Spin label study of the effects of cholesterol in liposomes. *Chem. Phys. Lipids* 1970; **4**: 238-242.
- Hubbell WL, McConnell HM. Spin-label studies of the excitable membranes of nerve and muscle. *PNAS* 1968; **61**: 12-16.
- Huerta V, Morera V, Guanche Y, Chinea G, Gonzalez LJ, Betancourt L, Martinez D, Alvarez C, Lanio ME, Besada V. Primary structure of two cytolysin isoform from *Stichodactyla heliantus* differing in their hemolytic activity. *Toxicon* 2001; **39**: 1253-1256.
- Ipsen JH, Karlström G, Mouritsen OG, Wennerström H, Zuckermann MJ. Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *Biochim Biophys Acta* 1987; **905**:162-172.
- Ipsen JH, Jorgensen K, Mouritsen OG. Density fluctuations in saturated phospholipid bilayers increase as the acyl-chain length decreases. *Biophys J* 1990; **58**: 1099-1107.

- Jost P, Libertine LJ, Hbert VC, Griffith OH. Lipid spin labels in lecithin multilayers. A study of motion along fatty acid chains. J Mol Biol 1971; **59**:77-98.
- Kawashima Y, Nagai H, Ishida M, Nagashima Y, Shiomi K. Primary structure of echotoxin 2 an actinoporin-like hemolytic toxin from the salivary gland of the marine gastropod *Monoplex echo*. Toxicon 2003; **42** 491-497.
- Killian JA, von Heijne G. How proteins adapt to a membrane-water interface. Trends Biochem Sci 2000; **25**: 429–434.
- Koynova R, Caffrey M. Phases and Phase Transitions of the Sphingolipids. Biochim Biophys Acta 1995; **1255**: 213-236.
- Kristan K, Podlesek Z, Hojnik V, Gutiérrez-Aguirre I, Guncar G, Turk D, Gonzalez-Mañas JM, Lakey JH, Macek P, Anderluh G. Pore formation by equinatoxin a eukaryotic pore-forming toxin requires a flexible N-terminal region and a stable beta-sandwich. J Biol Chem 2004; **279**: 46509-46517.
- Kristan K, Viero G, Macek P, Dalla Serra M, Anderluh G. The equinatoxin N-terminus is transferred across planar lipid membranes and helps to stabilize the transmembrane pore. FEBS J 2007; **274**: 539-550.
- Kristan KC, Viero G, Dalla Serra M, Macek P, Anderluh G. Molecular mechanism of pore formation by actinoporins. Toxicon 2009; **54**: 1125-1134.
- Lam YH, Hung A, Norton RS, Separovic F, Watts A. Solid-state NMR and simulation studies of equinatoxin II N-terminus interaction with lipid bilayers. Proteins 2010; **78**: 858-872.
- Lanio ME, Morera V, Alvarez C, Tejuca M, Gomez T, Pazos F, Besada V, Martinez D, Huerta V, Padron G, Chavez MA. Purification and characterization of two hemolysins from *Stichodactyla helianthus*. Toxicon 2001; **39**: 187-194.
- Lanio, ME, Alvarez, C, Martinez, FD, Casallanovo, F, Schreier, S, Campos, AM, Abuin, E, Lissi, E. Effect of a zwitterionic surfactant (HPS) on the conformation and hemolytic activity os St I and St II, two isotoxins purified from *Stichodactyla helianthus*. J Protein Chem 2002; **21**: 401-405.

- Lanio, ME, Alvarez, C, Pazos, F, Martinez, D, Martinez, Y, Casallanovo, F, Abuin, E, Schreier, S, Lissi, E. Effects of sodium sosecyl sulfate on the conformation and hemolytic activity of St I and St II, two isotoxins. Purified from *Stichodactyla Helianthus*. *Toxicon* 2003, **41**: 65-70.
- Libertini LJ, Waggoner AS, Jost PC, Griffith OH. Orientation of lipid spin labels in lecithin multilayers. *PNAS* 1969; **64**: 13-19.
- Lingwood D, Kaiser HJ, Levental I, Simons K. Lipid rafts as functional heterogeneity in cell membranes. *Biochem Soc Trans* 2009; **37**: 955-960.
- Lohner K Blondelle SE. Molecular mechanisms of membrane perturbation by antimicrobial peptides and the use of biophysical studies in the design of novel peptide antibiotics. *Comb Chem High Throughput Screen* 2005; **8**: 241-56.
- Macek P, Belmonte G, Pederzoli C, Menestrina G. Mechanism of action of equinatoxin II a cytolytic from the sea anemone *Actinia equina L.* belonging to the family of actinoporins. *Toxicology* 1994; **87**: 205-227.
- Mailer C, Taylor CPS, Schreier-Muccillo S, Smith ICP. The influence of cholesterol on molecular motion in egg lecithin bilayers – A variable frequency electron spin resonance study of a cholestane spin probe. *Arch Biochem Biophys* 1974; **163**: 671-678.
- Malovrh P, Barlic A, Podlesek Z, Macek P, Menestrina G, Anderluh G. Structure–function studies of tryptophan mutants of equinatoxin IIa sea anemone pore-forming protein. *Biochem J* 2000; **346**: 223-232.
- Malovrh P, Viero G, Serra MD, Podlesek Z, Lakey JH, Macek P, Menestrina G, Anderluh G. A novel mechanism of pore formation: membrane penetration by the N-terminal. *J Biol Chem* 2003; **278**: 22678-22685.
- Mancheño JM, Benito JM, Martinez-Ripoll M, Gavilanes JG, Hermoso J.A. Crystal and electron microscopy structures of sticholysin II actinoporin reveal insights into the mechanism of membrane pore formation. *Structure* 2003; **11**: 1319-1328.

- Martínez D, Otero A, Alvarez C, Pazos F, Tejuca M, Lanio ME, Gutierrez-Aguirre I, Barlic A, Iloro I, Arrondo JL, Gonzales-Mañas JM, Lissi E. Effect of sphingomyelin and cholesterol on the interaction of St II with lipidic interfaces. *Toxicon* 2007; **49**: 68–81
- Martinez, D, Campos, AM, Pazos F, Alvarez C, Lanio, ME, Casallanovo, F, Schreier, S, Salinas, RK, Vergara, C, Lissi, E. Properties of St I and St II, two isotoxins isolated from *Stichodactyla Helianthus*: a comparison. *Toxicon* 2001, **39**: 1547-1560.
- Matsuzaki K, Sigishita K, Ishibe N, Ueha M, Nakat S, Miyajima K, Epanand R. Relationship of membrane curvature to the formation of pores by magainin 2. *Biochemistry* 1998; **37**: 11856-11863.
- M'Baye G, Mély Y, Duportail G, Klymchenko A S. Liquid Ordered and Gel Phases of Lipid Bilayers: Fluorescent Probes Reveal Close Fluidity but Different Hydratation. *Biophys J* 2008; **95**: 1217-1225.
- McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT. The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* 2000; **16**: 404-405.
- Menestrina G, Cabiaux V, Tejuca M. Secondary structure of sea anemone cytolysins in soluble and membrane bound form by infrared spectroscopy. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **254**: 174-180.
- Merrifield R B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *JACS* 1963; **85**: 2149-2154.
- Niemelä P, Hyvönen MT, Vattulainen I. Structure and Dynamics of Sphingomyelin Bilayer: Insight Gained through Systematic Comparison to Phosphatidylcholine. *Biophys J* 2004; **87**: 2976-2989.
- Norton RS. Structures of sea anemones toxins. *Toxicon* 2009; **54**: 1075-1088.

- Parasassi T, Loiero M, Raimondi M, Ravagan G, Gratton E. Absence of lipid gel-phase domains in seven mammalian cell lines and in four primary cell types. *Biochim Biophys Acta* 1993; **1153**:143-154.
- Pardo-Cea MA, Alegre-Cebollada J, del-Pozo AM, Gavilanes JG, Bruix M.  $^1\text{H}$   $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  NMR assignments of StnII-Y111N a highly impaired mutant of the sea anemone actinoporin Sticholysin II. *Biomol. NMR Assign* 2010; **4**: 69-72.
- Pazos F, Valle A, Martínez D, Ramírez A, Calderón L, Pupo A, Tejuca M, Morera V, Campos J, Fando R, Dyszy F, Schreier S, Horjales E, Alvarez C, Lanio ME, Lissi E. Structural and functional characterization of a recombinant Sticholysin I (rSt I) from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* 2006; **48**: 1083-94
- Pertinhez TA, Krybus R, Cilli EM, Paiva AC, Nakaie CR, Franzoni L, Sartor G, Spisni A, Schreier S. Conformational flexibility of three cytoplasmic segments of the angiotensin II AT1A receptor: a circular dichroism and fluorescence spectroscopy study. *J Pept Sci* 2002; **8**: 23-35.
- Pertinhez TA, Nakaie CR, Carvalho RS, Paiva AC, Tabak M, Toma F, Schreier S. Conformational changes upon binding of a receptor loop to lipid structures: possible role in signal transduction. *FEBS Lett.* 1995; **375**: 239-242.
- Pertinhez TA, Nakaie CR, Paiva AC, Schreier S. Spin-labeled extracellular loop from a seven-transmembrane helix receptor: studies in solution and interaction with model membranes. *Biopolymers* 1997; **42**: 821-829.
- Pokorny A, Yandek LE, Elegbede A I, Hinderliter A, Almeida PF. Temperature and Composition Dependence of the Interaction of delta-Lysin with Ternary Mixtures os Sphingomyelin/Cholesterol/POPC. *Biophys J* 2006; **91**: 2184-2197.
- Ramstedt B, Slotte J P. Sphingolipids and the Formation of Sterol-Enriched Ordered Membranes Domains. *Biochim Biophys Acta* 2006; **1758**: 1945-1956.
- Recktenwald DJ, McConnell HM. Phase equilibria in binary mixtures of phosphatidylcholine and cholesterol. *Biochemistry* 1981; **20**:4505-4510.

- Reed J, Reed TA. A Set of Constructed Type Spectra for the Practical Estimation of Peptide Secondary Structure from Circular Dichroism. Anal Biochem 1997; **254**: 36-40.
- Reyes Mateo C, Acuña AU, Brochont JC. Liquid-Crystalline Phases of Cholesterol/Lipid Bilayers as Revealed by the Fluorescence of trans-Parinaric Acid. Biophys J 1995; **68**:978-987.
- Ribeiro AA, Dennis EA. Effect of thermotropic phase transitions of dipalmitoylphosphatidylcholine on the formation of mixed micelles with Triton X-100. Biochim Biophys Acta 1974; **332**: 26-35.
- Rouser G, Fleicher S, Yamamoto A. Two Dimensional Thin Layer Chromatographic Separation of Polar Lipids and Determination of Phospholipids by Phosphorus Analysis of Spots. Lipids 1970; **5**: 494-496.
- Salinas RK, Shida CS, Pertinhez TA, Spisni A, Nakaie CR, Paiva AC, Schreier S. Trifluoroethanol and binding to model membranes stabilize a predicted turn in a peptide corresponding to the first extra-cellular loop of the angiotensin II AT<sub>1A</sub> receptor. Biopolymers 2002; **65**: 21-31.
- Sankaram MB, Thompson TE. Cholesterol-induced fluid-phase immiscibility in membranes. Biophysics 1991; **88**:8686-8690.
- Schön P, Garcia-Sáez AJ, Malovrh P, Bacia K, Anderluh G, Schwille P. Equinatoxins II permeabilizing activity depends on the presence of sphingomyelin and lipid phase coexistence. Biophys J 2008; **95**: 691-698.
- Schreier S, Frezzatti WA, Araujo PS, Chaimovich H, Cuccovia IM. Effect of lipid membranes on the apparent pK of the local anesthetic tetracaine. spin label and titration studies. Biochim Biophys Acta 1984; **769**: 231-237.
- Schreier S, Polnaszek C F, Smith I C. Spin Labels in Membranes: Problems in Practice. Biochim Biophys Acta 1978; **515**: 375-436.
- Schroeder R, London E, Brown D. Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol GPI- anchored

proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. PNAS 1994; **91**: 12130-12134.

Schroeder RJ Ahmed SN, Zhu Y, London E, Brown DA. Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains. J Biol Chem 1998; **273**: 1150-1157.

Seelig J. Spin labels studies of oriented smectic liquid crystals a model system for bilayer membranes. JACS 1970; **92**: 3881-3887.

Shoemaker S D, Vanderlick T K. Material Studies of Lipids Vesicles in the L $\alpha$  and L $\alpha$ -Gel Coexistence Regimes. Biophys J 2003; **84**: 998-1009.

Silvius JR, del Giudice D, Lafleur M. Cholesterol at Different Bilayer Concentrations Can Promote or Antagonize Lateral Segregation of Phospholipids of Differing Acyl Chain Length. Biochemistry 1996; **35**: 15198-15208.

Simons K, van Meer G. Lipid sorting in epithelial cells. Biochemistry 1988; **27**:6197-6202.

Smith IC, Schreier-Muccillo S, Marsh D. Spin Labeling. In: Pryor WA. Free Radicals in Biology Vol. I. New York: Academic Press; 1976.

Stafford RE, Fanni T, Dennis EA. Interfacial properties and critical micelle concentration of lysophospholipids. Biochem 1989; **28**: 5113-5120.

Stewart JM, Young JD. Solid Phase Peptide Synthesis. Rockford: Pierce Chemical Co; 1984.

Stone TJ, Buckman T, Nordio, PL, McConnell HM. Spin-labeled biomolecules. PNAS 1965; **54**: 1010-1017.

Tejuca M, Dalla Serra M, Potrich C, Alvarez C, Menestrina G. Sizing the radius of the pore formed in erythrocytes and lipid vesicles by the toxin sticholysin I from the sea anemone Stichodactyla helianthus. J Membr Biol 2001; **183**:125-35.

- Tejuca M, Serra MD, Ferreras M, Lanio ME, Menestrina G. Mechanism of membrane permeabilization by sticholysin I a cytolysin isolated from the venom of the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biochemistry* 1996; **35**: 14947-14957.
- Toke O, Maloy WL, Kim SJ, Blazyk J, Schaefer J. Secondary structure and lipid contact of a peptide antibiotic in phospholipid bilayers by REDOR. *Biophys J* 2004; **87**: 662-74.
- Travis SM, Anderson NN, Forsyth WR, Espiritu C, Conwa BD, Greenberg EP, Mccray PB, Lehrer RI, Welsh MJ, Tack BF. Bactericidal Activity of Mammalian Cathelicidin-Derived Peptides. *Infect Immun* 2000; **68**: 2748–2755.
- Valcarcel CA, Dalla Serra M, Potrich C, Bernhart I, Tejuca M, Martinez D, Pazos F, Lanio ME, Menestrina G. Effects of Lipid Composition on Membrane Permeabilization by Sticholysin I and II Two Cytolysins of the Sea Anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biophys J* 2001; **80**: 2761-2774.
- Veatch SL, Keller SL. Miscibility phase diagrams of giant vesicles containing sphingomyelin. *Phys Rev Lett* 2005; **94**:1-4.
- Veiga MP, Arrondo JLR, Goñi FM, Alonso A, Marsh D. Interaction of cholesterol with sphingomyelin in mixed membranes containing phosphatidylcholine studied by spin-label esr and ir spectroscopies. A possible stabilization of gel-phase sphingolipid domains by cholesterol. *Biochemistry* 2001; **40**: 2614-2622.
- Veiga MP, Goñi FM, Alonso A, Marsh D. Mixed Membranes os sphingolipids and glycerolipids as studied by spin-label esr spectroscopy. A search for domain formation. *Biochemistry* 2000; **39**: 9876-9883.
- Wallace BA, Mao D. Circular dichroism analyses of membrane proteins: an examination of differential light scattering and absorption flattening effects in large membrane vesicles and membrane sheets. *Anal Biochem* 1984; **141**: 317-328.

- Wallace BA, Teeters CL. Differential absorption flattening optical effects are significant in the circular dichroism spectra of large membrane fragments. Biochem 1987; **26**: 65-70.
- Wertz J E, Bolton J R. Electron spin resonance: Elementary Theory and Practical Application. New York: McGraw-Hill; 1972.
- Williams RW, Chang A, Juretić D, Loughran S. Secondary structure predictions and medium range interactions. Biochim Biophys Acta 1987; **916**: 200-4.
- Wilmot CM, Thornton JM. Analysis and prediction of the different types of beta-turn in proteins. J Mol Biol 1988; **203**: 221-32
- Woody RW. Theory of Circular Dichroism of Proteins In: Fasman, GD. Circular Dichroism and the Conformational Analysis of biomolecules. Ed. New York: Plenum Press; 1996.
- Yeagle PL, Albert AD. G-protein coupled receptor structure. Biochim Biophys Acta 2007; **1768**: 808-824.
- Zhao J, Wu J, Shao H, Kong F, Jain N, Hunt G, Feigenson G. Phase studies of model biomembranes: Macroscopic coexistence of  $L\alpha + L\beta$  with light-induced coexistence of  $L\alpha + L\beta$  phases. Biochim Biophys Acta 2007; **1768**: 2777-2786.

## SÚMULA CURRICULAR

### 1. DADOS PESSOAIS

Joana Paulino

Local e data de nascimento: São Paulo/SP Brasil - 24/08/1984

### 2. EDUCAÇÃO

Escola Nossa Senhora das Graças, São Paulo/SP Brasil, 1999-2001.

Universidade de São Paulo, São Paulo/SP, Brasil, 2003-2007.

Bacharel em Química com atribuições em Biotecnologia

### 3. FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

I Escola de Moléculas e Biomoléculas. Universidade de São Paulo, USP, Brasil. **2009**

Summer School on Biophysics. Ruder Boskovic Institute **2009**

Latin American Postgraduate Program of Biophysics. Sociedade Brasileira de

Biofísica. **2009**

Avanços em Eng. de Proteínas e Síntese de Peptídeo. Fundação Oswaldo Cruz. **2008**

**4. OCUPAÇÃO:** Bolsista de Mestrado, CNPq, 2008-2010

### **5. PUBLICAÇÕES (Artigos Completos e Resumos em Congressos)**

PAULINO, J. ; Oliveira, F.J.F. ; CILLI, E. M. ; Ros, U. ; Martinez, D. ; LANIO, M. E. ; Alvarez, C. M. ; SCHREIER, S. . Conformational and Functional Studies of Peptides Corresponding to the N-Terminal Region of the Cytolysins Sticholysin I and Sticholysin II. In: 6th International Conference of Biological Physics, 2007, Mantevidéu. 6th International Conference of Biological Physics Abstract Book. Uruguai : UNESCO, 2007. p. 81-81.

SCHREIER, S. ; Oliveira, F.J.F. ; PAULINO, J. ; Souza, F.C. ; Crusca, E.J. ; Ros, U. ; Tejuca, M. ; Martinez, D. ; Pazos, F. ; CILLI, E. M. ; LANIO, M. E. ; Alvarez, C. M. . Model Peptides Mimic the Structure and Function of the N-terminus of the Pore-Forming Toxin Sticholysin II. In: 6 th International Congress on Chemistry and Chemical Engineering, 2006, Havana. III International Symposium of Biochemistry and Molecular Biology of the 6 th International Congress on Chemistry and Chemical Engineering, 2006.

Alvarez, C. M. ; Martinez, D. ; Ros, U. ; Turra, F. ; PAULINO, J. ; Crusca, E.J. ; Valle, A. ; Pazos, F. ; Tejuca, M. ; CILLI, E. M. ; LANIO, M. E. ; SCHREIER, S. . Differential Interaction with Lipid Interfaces and Biological Membranes of the Pore-Forming Proteins Sticholysins and their N-terminus Mimetic Peptides. In: 6 th International Congress on Chemistry and Chemical Engineering, 2006, Havana, Cuba. II International Symposium of Biochemistry and Molecular Biology of the 6 th International Congress on Chemistry and Chemical Engineering, 2006.