

GUSTAVO PENTEADO BATTESINI CARRETERO

**Estudos biofísicos e de atividade de peptídeos
correspondentes ao N-terminal das toxinas
Esticolisinas I e II – contribuição para a elucidação
do mecanismo de ação**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)*

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

São Paulo
2016

GUSTAVO PENTEADO BATTESINI CARRETERO

Estudos biofísicos e de atividade de peptídeos correspondentes ao N-terminal das toxinas Esticolisinas I e II – contribuição para a elucidação do mecanismo de ação

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)*

Aprovado em ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Aos meus pais, Manoel e Vera e aos meus irmãos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à minha família. Aos meus pais, Manoel e Vera, e aos meus irmãos Rafael e Heloísa. Aos meus avós, Sebastião e Augusta, e Carlos e Mari, e à minha bisavó Olívia. E aos meus padrinhos.

Aos membros do laboratório companheiros dessa jornada, em especial à Denise e ao José Carlos, com quem pude dividir grande parte das experiências vivenciadas ao longo do desenvolvimento do projeto. À Alessandra. Também à Joana pela oportunidade de fazer parte do projeto, e ao Fábio Dyszy pela ajuda com os primeiros passos no laboratório.

Aos cubanos parceiros de projeto Professores Carlos Alvarez, Marilyn, Fabiola, Aisel e Uris, à Yadira e à Aracelys. Obrigado pela oportunidade e pela satisfação de dividir o projeto por todos esses anos, pelas conversas acerca ou não do projeto e por todo intercâmbio cultural que pude vivenciar.

Aos meus colegas da Universidade de Roskilde, Biljana, Cihan, Paola, Kirsten, Theis, Martin e Simon. Obrigado por todos os ensinamentos durante o meu período de estágio na Dinamarca e por toda a amizade e companheirismo. Agradeço por tornarem essa minha experiência de um ano em algo único. Também ao Jakob Krake pelo auxílio com o HPLC-MS.

Ao professor Leandro Barbosa do Instituto de Física da USP. Uma enorme gratidão por todo o tempo e ajuda dispensados com os estudos de SAXS, que constituem parte importante desse trabalho. Obrigado também pela amizade e pelas conversas.

Aos colegas do laboratório de Sistemas Biomiméticos, Professora Iolanda Cuccovia, Laura, Greice e Filipe.

Ao professor Bayardo Torres.

Aos meus amigos, por toda motivação e alegria que me trazem. Aos meus companheiros de time, amigos do colégio e de Poços de Caldas.

Ao meu co-orientador na Universidade de Roskilde, Professor Håvard Jenssen. Muito obrigado primeiramente pelo convite e por me abrir as portas do laboratório. Por todos os ensinamentos, por toda atenção e amizade.

E um agradecimento especial à minha orientadora, Professora Shirley Schreier, sem a qual nada disso seria possível. Obrigado por me introduzir ao mundo da ciência, pela confiança, paciência e por todos os ensinamentos.

Obrigado às agências de fomento CNPq, pelo financiamento do meu projeto de pesquisa, e CAPES, pela bolsa de estágio no exterior.

“No universo da cultura, o centro está em toda parte.”

Miguel Reale

RESUMO

Carretero, G.P.B. Estudos biofísicos e de atividade de peptídeos correspondentes ao N-terminal de Esticolisinas I e II – contribuição para a elucidação do mecanismo de ação das toxinas. 2016, 201p. Tese – Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Esticolisinas I e II, citolisinas purificadas da anêmona marinha *Stichodactyla helianthus*, agem lisando membranas biológicas e modelo. O mecanismo de ação proposto consiste na formação de um poro toroidal com o envolvimento do domínio N-terminal. Diferentes aspectos da interação entre peptídeos derivados do N-terminal das toxinas (StI₁₋₃₁ and StI₁₂₋₃₁ SELAGTIIDGASLTFEVLDKVLGELGKVSARK, e StII₁₋₃₀ and StII₁₁₋₃₀ ALAGTIIAGASLTFFQVLDKVLEELGKVSARK) com membranas modelo – micelas e bicamadas – foram estudados com o objetivo de contribuir para a elucidação do mecanismo de ação das toxinas em nível molecular. O emprego dos peptídeos teve como base a hipótese de que fragmentos proteicos podem ser capazes de mimetizar a estrutura e atividade das proteínas inteiras. O análogo contendo o aminoácido paramagnético TOAC (N-TOAC-StII₁₁₋₃₀) também foi estudado. Estudos conformacionais foram realizados empregando-se as técnicas espectroscópicas de dicroísmo circular (CD), ressonância paramagnética eletrônica (EPR) e fluorescência. Foram ainda realizados estudos de predição de estrutura e modelagem molecular. Espectros de CD mostraram que os peptídeos adquirem conformação em α -hélice ao interagir com membranas modelo, de acordo com a conformação observada nessa região para as toxinas. Variando a composição lipídica das membranas modelo estudadas, foi possível investigar a contribuição de forças eletrostáticas e de interações hidrofóbicas para a ligação do peptídeo. Ensaio de supressão de fluorescência de lípidos contendo grupamentos fluorescentes em diferentes posições pelo resíduo paramagnético TOAC e espectros de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) permitiram localizar o resíduo TOAC na interface membrana-água, corroborando o modelo proposto do poro toroidal. A análise dos espectros de CD e EPR também permitiu obter as constantes de ligação dos peptídeos com micelas e bicamadas. Os peptídeos também foram capazes de mimetizar as toxinas do ponto de vista funcional, como mostrado por testes de vazamento de carboxifluoresceína e atividade hemolítica. Peptídeos curtos,

contendo partes da sequência de StII₁₋₃₀, sintetizados com o objetivo de examinar uma eventual atividade antimicrobiana, demonstraram baixa atividade, bem como ausência de atividade hemolítica e de toxicidade para células humanas.

Palavras-chave: Esticolisinas, Peptídeos, Estrutura-atividade, Membrana, Espectroscopia.

ABSTRACT

Carretero, G.P.B. Biophysical and activity studies of peptides corresponding to the N-termini of Sticholysins I and II – a contribution to the elucidation of the toxins' mechanism of action. 2016, 201p. Ph.D. Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo.

Sticholysins I and II, cytolytic peptides purified from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*, act by lysing biological and model membranes. The proposed mechanism of action consists in the formation of a toroidal pore with the involvement of the N-terminal domain [1]. Different aspects of the interaction between peptides from the toxins' N-termini (StI₁₋₃₁ and StI₁₂₋₃₁ SELAGTIIDGASLTFEVLDKVLGELGKVSRL, and StII₁₋₃₀ and StII₁₁₋₃₀ ALAGTIAGASLTQVLDKVLLEELGKVSRL) and model membranes – micelles and bilayers – have been studied to contribute to the elucidation of the toxins mechanism of action at the molecular level. The use of peptides was based on the hypothesis that protein fragments can eventually mimic the structure and activity of the whole protein. An analogue containing the paramagnetic amino acid TOAC (N-TOAC-StII₁₁₋₃₀) was also studied. Conformational studies were performed making use of the spectroscopic techniques circular dichroism (CD), electron paramagnetic resonance (EPR), and fluorescence. Studies of structure prediction and molecular modeling were also performed. CD spectra showed that the peptides acquired α -helical conformation upon interaction with model lipid membranes, in agreement with the conformation found for these segments in the whole proteins. Making use of membranes of variable lipid composition, it was possible to assess the contribution of electrostatic and hydrophobic interactions for peptide binding. Fluorescence quenching of labeled lipids by paramagnetic TOAC and EPR spectra allowed us to locate the TOAC residue at the membrane-water interface, corroborating the proposed model of the toroidal pore. The CD and EPR studies also allowed us to obtain the binding constants for the peptide-micelle and peptide-bilayer interaction. The peptides were also capable of mimicking the toxins function, as shown by assays of carboxyfluorescein leakage and hemolytic activity. Short peptides containing parts of StII₁₋₃₀'s sequence were synthesized with the aim of testing their antimicrobial activity. The peptides displayed low antimicrobial activity, as well as lack of hemolytic activity and toxicity against human cells.

Keywords: Sticholysins, Peptides, Structure-Activity, Membrane, Spectroscopy

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACN:** Acetonitrila
- a_N :** Desdobramento hiperfino isotrópico
- CD:** Dicroísmo circular
- CF:** 5(6)-Carboxifluoresceína
- CFU:** Unidades formadoras de colônia
- DCM:** Diclorometano
- DHPC:** 1,2-Dihexanoil-fosfatidilcolina
- DMEM:** Meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DMF:** Dimetilformamida
- DMPA:** Ácido 1,2-dimiristoil-fosfatídico
- DOPE-Pyr:** 1,2-Dioleoil-3-fosfatidiletanolamina-N-(1-pirenossulfonil)
- DPC:** Dodecilsfosfocolina
- DPPE:** 1,2-Dipalmitoil-fosfatidilcolina
- DPPE-NBD:** 1,2-Dipalmitoil-3-fosfatidiletanolamina-NBD
- EPR:** Ressonância paramagnética eletrônica
- EqII:** Equinatoxina II
- Fmoc:** 9-fluorenilmetiloxycarbonil
- FragC:** Fragaceatoxina C
- FTIR:** Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
- h_0 :** Altura da linha de campo central do espectro de EPR
- h_{+1} :** Altura da linha de campo baixo do espectro de EPR
- h_{-1} :** Altura da linha de campo alto do espectro de EPR
- HBTU:** Hexafluorofosfato de benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametilurônio
- INT:** cloreto de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazólio
- LPC:** 1-Palmitoil-2-hidróxi-fosfatidilcolina
- LPA:** Ácido 1-palmitoil-2-hidróxi-fosfatídico
- LSM:** Esfingosilfosforilcolina
- LUV:** Vesículas unilamelares grandes
- MIC:** Concentração inibitória mínima
- MHB:** Meio de cultura Mueller-Hinton
- MLV:** Vesículas multilamelares
- MTS:** 3-(4-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio

NBD: N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)
NMM: N-metilmorfolina
NMP: N-metilpirrolidina
NMR: Ressonância magnética nuclear
P: Coeficiente de partição
PBC: Tampão Fosfato-Borato-Citrato
PBS: Tampão fosfato em solução salina
PC-6-NBD: 1-Palmitoil-2-[6-[(NBD)amino]hexanoil]-3-fosfatidilcolina
PC-12-NBD: 1-Palmitoil-2-[12-[(NBD)amino]dodecanoil]-3-fosfatidilcolina
PLB: Fosfolambana
POC: Fosfocolina
POPA: Ácido 1-palmitoil-2-oleil-fosfatídico
POPC: 1-Palmitoil-2-oleil-fosfatidilcolina
REES: Red Edge Excitation Shift
S: Parâmetro de ordem
SAXS: Espalhamento de raios-X a baixo ângulo
SM: Esfingomielina
StI: Esticolisina I
StII: Esticolisina II
TEMPO: 2,2,6,6-tetrametil-N-oxil-piperidina
TEMPOL: 2,2,6,6-tetrametil-4-hidroxi-N-oxil-piperidina
TFA: Ácido trifluoroacético
TOAC: Ácido 2,2,6,6-tetrametil-N-oxil-4-amino-4-carboxílico
 τ : Tempo de correlação rotacional
UH: Unidades de hemólise
 $[\theta]$: Elipticidade molar residual
TFE: Trifluoretanol
TIS: Triisopropilsilano
 W_0 : Largura da linha de campo central do espectro de EPR

SUMÁRIO

1. Introdução	17
1.1 Actinoporinas e as Esticolisinas I e II	17
1.2 Estrutura tridimensional	17
1.3 Mecanismo de formação do poro	21
1.4 Estudos do mecanismo de ação das actinoporinas por meio de peptídeos correspondentes à região N-terminal	24
1.5 Utilização das esticolisinas e outras actinoporinas na construção de imunocinjugados	27
1.6 Estudos de peptídeos contendo o aminoácido TOAC	28
2. Objetivos	33
3. Materiais e Métodos	35
3.1 Peptídeos	35
3.1.1 Síntese de peptídeos	36
3.1.1.1 Ciclos de desproteção e acoplamento	37
3.1.1.2 Clivagem do peptídeo da resina e desproteção das cadeias laterais	39
3.1.1.3 Eliminação do TFA e precipitação com éter	39
3.1.1.4 Purificação	39
3.1.1.5 Análise dos produtos de síntese por HPLC-UV/Vis-MS	40
3.2 Lipídios	41
3.3 Outros reagentes	42
3.4 Preparação de membranas modelo	43
3.5 Espectroscopia de Dicroísmo circular (CD)	44
3.5.1 Atividade óptica	44
3.5.2 Estudo de propriedades de moléculas quirais por CD	44
3.5.3 Estudo de proteínas e peptídeos por CD	45

3.5.4	Obtenção dos espectros de CD	47
3.5.5	Análise e desconvolução dos espectros de CD	48
3.6	Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR)	49
3.6.1	Método do marcador de spin	50
3.6.2	Espectros de EPR de radicais nítróxido	50
3.6.3	Dependência dos espectros de EPR da orientação	52
3.6.4	Dependência dos espectros de EPR da mobilidade	54
3.6.5	Dependência dos espectros de EPR da polaridade do meio	56
3.6.6	Marcadores de spin em membranas	56
3.6.7	Obtenção dos espectros	59
3.6.8	Medida de parâmetros espectrais	60
3.6.9	Cálculo do coeficiente de partição e constante de ligação	61
3.7	Espectroscopia de Fluorescência	62
3.7.1	Diagrama de Jablonski	64
3.7.2	Supressão de fluorescência	64
3.7.3	Red Edge Excitation Shift (REES)	65
3.7.4	Estudos de supressão de fluorescência de lipídios contendo o fluoróforo NBD por N-TOAC-StII ₁₁₋₃₀	66
3.7.5	Estudos da posição real da sonda fluorescente NBD na bicamada	67
3.7.6	Estudos do movimento transmembranar de lipídios pelo poro toroidal	67
3.7.4	Estudos de atividade dos peptídeos em sistemas de membranas modelo por fluorescência	70
3.8	SAXS	71
3.9	Atividade antimicrobiana	71
3.9.1	Concentração inibitória mínima (MIC)	71

3.9.2 Cinética de crescimento bacteriano	73
3.10 Ensaio de toxicidade dos peptídeos	73
3.10.1 Atividade hemolítica	73
3.10.2 Atividade contra células eucarióticas HeLa	74
3.10.2.1 Cultura de células HeLa WT	75
3.10.2.2 Contagem das células e preparação das placas para os ensaios	76
3.10.2.3 Exposição das células aos peptídeos	76
3.10.2.4 Ensaio de viabilidade celular	77
3.10.2.5 Ensaio de integridade da membrana celular	77
3.11 Modelagem estrutural dos peptídeos <i>in silico</i>	77
3.11.1 Geração dos modelos estruturais	77
3.11.2 Comparação estrutural entre os modelos obtidos e estruturas obtidas experimentalmente	78
4. Resultados	79
4.1 Peptídeos	79
4.2 Estudos conformacionais <i>in silico</i>	85
4.2.1 Predição de estrutura secundária	85
4.2.2 Modelagem estrutural	88
4.3 Estudos em solução	92
4.3.1 Estudos conformacionais dos peptídeos em solução por CD	92
4.3.2 Estudos do peptídeo N-TOAC-StII ₁₁₋₃₀ em solução por EPR	96
4.4 Interação dos peptídeos com membranas modelo	101
4.4.1 Estudos na presença de micelas	101
4.4.1.1 Estudos conformacionais dos peptídeos na presença de micelas por CD	101

4.4.1.2 Estudos do peptídeo N-TOAC-StII ₁₁₋₃₀ em micelas por EPR	113
4.4.1.3 Estudos da interação dos peptídeos com micelas de LPC por SAXS	124
4.4.2 Estudos na presença de bicamadas	128
4.4.2.1 Estudos conformacionais dos peptídeos na presença de LUV por CD	128
4.4.2.2 Estudos do peptídeo N-TOAC-StII ₁₁₋₃₀ em bicamadas por EPR	134
4.4.2.3 Estudos de localização de N-TOAC-StII ₁₁₋₃₀ em bicamadas por fluorescência	143
4.4.2.4 Estudos do efeito de N-TOAC-StII ₁₁₋₃₀ na organização dos lipídios em bicamadas através de REES	148
4.4.2.5 Estudos de fluorescência do movimento transmembranar de lipídios pelo (eventual) poro toroidal	149
4.5 Ensaios de atividade dos peptídeos	152
4.5.1 Ensaio de permeabilização de membranas modelo	152
4.5.2 Ensaios de atividade antibacteriana	154
4.5.2.1 Ensaio de determinação de concentração inibitória mínima (MIC)	154
4.5.2.2 Ensaio inibição de proliferação bacteriana	155
4.5.3 Ensaio de atividade contra células humanas	157
4.5.3.1 Atividade hemolítica	157
4.5.3.2 Toxicidade contra células humanas HeLa	159
5. Discussão	161
5.1 Estudos dos peptídeos de esticolisinas e solução e em presença de membranas modelo	161
5.1.1 Estudos <i>in silico</i>	161
5.1.2 Estudos em solução	163

5.1.3 Estudos na presença de micelas	164
5.1.4 Estudos na presença de vesículas	170
5.1.5 Atividade biológica	182
6. Conclusão	185
7. Referências bibliográficas	188

1. Introdução

1.1 Actinoporinas e as Esticolisinas I e II

Anêmonas marinhas (Actiniaria) e outros cnidários produzem uma grande variedade de compostos bioativos como parte de um arsenal de defesa que inclui neurotoxinas, fosfolipases e citolisinas formadoras de poro (Frazão *et al.*, 2012).

Entre as citolisinas formadoras de poros, destaca-se um grupo de toxinas proteicas isoladas exclusivamente de anêmonas marinhas chamado de actinoporinas. Esse grupo é caracterizado pelo alto grau de homologia, solubilidade em água, peso molecular entre 18 e 20 kDa, riqueza em aminoácidos básicos, ausência de cisteína, e por agir formando poros em membranas biológicas e modelo (Lanio *et al.*, 2001; Anderluh *et al.*, 2002). Também se destaca a alta afinidade dessas toxinas por membranas contendo o esfingofosfolípido esfingomiéline (Tejuca *et al.*, 1996; de los Ríos *et al.*, 1998).

As actinoporinas vêm sendo extensamente reportadas na literatura. Juntamente com as esticolisinas, alvos desse estudo, as toxinas Equinatoxina (EqtlI) e Fragaceatoxina C (FragC) são muito estudadas (Rojko *et al.*, 2015, Yamaji-Hasegawa *et al.*, 2015).

As esticolisinas I e II (StI e StII) são actinoporinas produzidas pela anêmona marinha *Stichodactyla helianthus* (de los Ríos *et al.*, 1999; Lanio *et al.*, 2001). St I e St II são isoformas e possuem 93% de homologia, com substituição de apenas 13 aminoácidos, sendo apenas três modificações não conservativas, presentes na porção N-terminal das proteínas (Glu2/Ala1, Asp9/Ala8, Gly23/Glu22). Apesar do alto grau de identidade, as toxinas possuem diferentes atividades hemolíticas, 21700 UH/mg e 30000 UH/mg para St I e St II respectivamente (de los Ríos *et al.*, 1999; Lanio *et al.*, 2001; Huerta *et al.*, 2001).

1.2 Estrutura tridimensional

As resoluções por cristalografia de raios-X e ressonância magnética nuclear (NMR) das estruturas tridimensionais das esticolisinas (Mancheño *et al.*, 2003; Castrillo *et al.*, 2010; López-Castilla *et al.*, 2014) e das actinoporinas EqtlI (Athanasiadis *et al.*, 2001; Hinds *et al.*, 2002) e FragC (Mechaly *et al.*, 2011) revelam que, além da similaridade de sequência, as actinoporinas apresentam estruturas

semelhantes. Actinoporinas apresentam uma única subunidade composta de um sanduíche de duas folhas β , cada uma formada por 5 fitas β , flanqueado por duas α -hélices, uma próxima à região N-terminal (α 1) e uma no meio da cadeia polipeptídica (α 2) (Fig. 1.1).

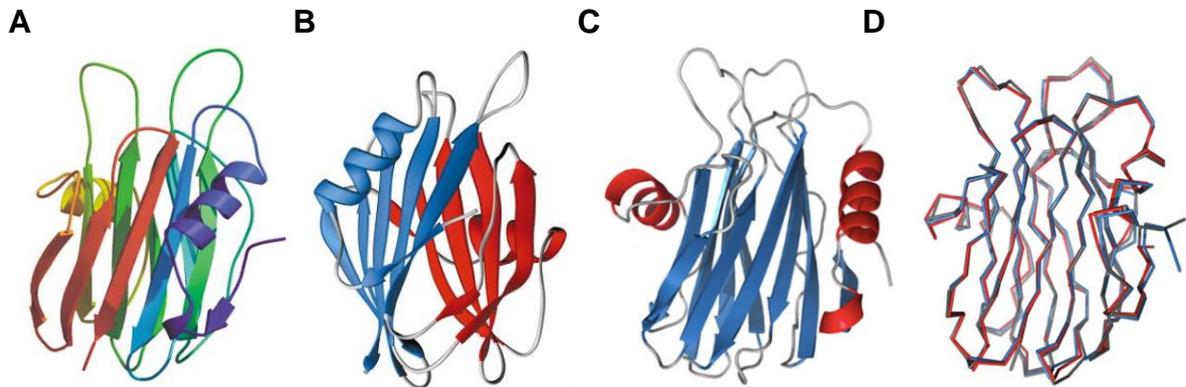


Figura 1.1 Estruturas tridimensionais de StII (A) (Mancheño *et al.*, 2003), EqtII (B) (Athanasiadis *et al.*, 2001) e FragC (C) (Mechaly *et al.*, 2011) e sobreposição das posições dos carbonos α nas estruturas das três toxinas (D) (Mechaly *et al.*, 2011).

Resultados envolvendo estudos de StI e StII através de CD (Mancheño *et al.*, 2001; Alvarez *et al.*, 2003) e de FTIR (Menestrina *et al.*, 1999) também indicaram uma alta proporção de estrutura em folha β e baixo conteúdo de α -hélice.

Na estrutura das esticolisinas e das outras actinoporinas destaca-se a presença de um cluster de resíduos aromáticos relativamente expostos ao ambiente aquoso envolvendo os resíduos 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). Resíduos aromáticos são conhecidos pela alta afinidade pela interface de membranas lipídicas (Killian & von Heijne, 2000) e participam da ligação das toxinas à membrana estando também envolvidos na especificidade dessa por SM (Bakrač *et al.*, 2008).

Estudos recentes de NMR de StI na presença de micelas de DPC e DHPC indicaram mudança no deslocamento químico dos resíduos aromáticos nessa região na passagem da toxina do ambiente aquoso para as micelas, evidenciando a participação dessa região na ligação das toxinas à membrana lipídica (Fig. 1.2A) (Castrillo *et al.*, 2010; López-Castilla *et al.*, 2014).

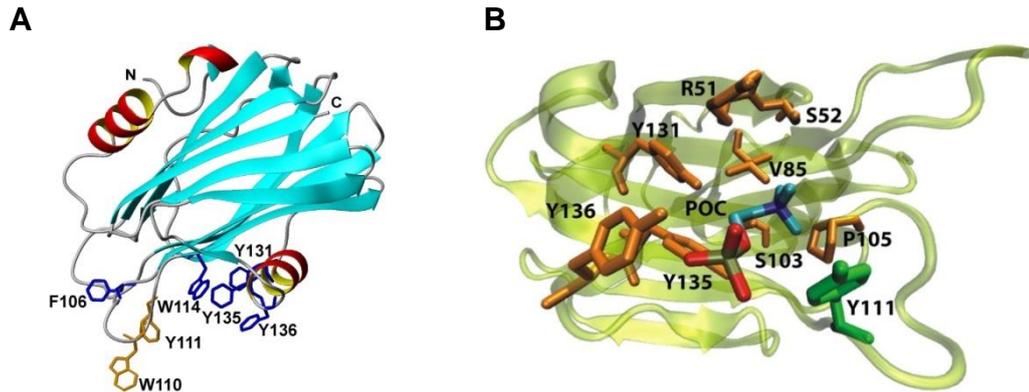


Figura 1.2 Representação da estrutura tridimensional de StII evidenciando: (A) o cluster de resíduos aromáticos (B) o sítio específico de ligação à POC (García-Ortega *et al.*, 2011).

A cavidade formada pelos resíduos aromáticos também apresenta um sítio de ligação específico para fosfocolina (POC), visto pela primeira vez em StII (Fig. 1.2B) e também presente em EqtII e FragC, numa região altamente conservada (Rojko *et al.*, 2015). No sítio observado em StII, a carga positiva do átomo de nitrogênio da colina é estabilizada pelos elétrons π dos resíduos Tyr111 e Tyr135 e a carga negativa no grupo fosfato interage com as hidroxilas de Tyr111 e Tyr136 e é estabilizada pela carga positiva de Arg51 (Fig. 1.2B) (Mancheño *et al.*, 2003; García-Ortega *et al.*, 2011). Estudos com o mutante de StII R52C (R51 em StII) indicam a importância do resíduo na ligação e atividade da toxina (Valle *et al.*, 2011).

Em ensaios de afinidade por ressonância plasmônica de superfície, o sítio de ligação a POC em EqtII, análogo ao observado para StII, mostrou-se altamente específico para o grupo POC ligado a uma cadeia esfingosina (LSM) quando comparado com POC ligado ao glicerol (LPC) evidenciando a origem da alta afinidade das actinoporinas por membranas contendo SM (Bakrač *et al.*, 2008).

O segmento N-terminal das actinoporinas forma uma α -hélice de caráter anfipático (Fig. 1.3B) que se posiciona com a face hidrofóbica em contato com uma porção hidrofóbica do sanduíche de folhas- β (Mancheño *et al.*, 2003; Athanasiadis *et al.*, 2001; Mechaly *et al.*, 2011; Rojko *et al.*, 2015). A α -hélice N-terminal das actinoporinas, segundo o mecanismo proposto para sua ação, sofre a alteração conformacional mais significativa na passagem da toxina para a membrana, além de ser a parte da toxina que é inserida na membrana formando o canal do poro (Hong *et al.*, 2002; Anderluh *et al.*, 2003; Kristan *et al.*, 2007; Tanaka *et al.*, 2015).

StI S ELAGT IIDGA SLTFE VLDKV LGELG KVSrk
StII ALAGT IiAGA SLTFQ VLDKV LEELG KVSrk

Resíduos hidrofóbicos
 Resíduos polares sem carga
 Resíduos carregados negativamente
 Resíduos carregados positivamente

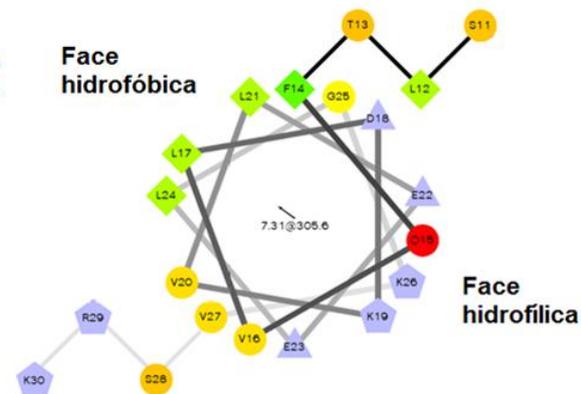


Figura 1.3 Alinhamento das sequências de StI e StII destacando as posições das substituições (numeração dos resíduos pela sequência de StII). Projeção helicoidal do segmento 11-30 de StII com destaque para as faces hidrofílica e hidrofóbica da α -hélice anfipática.

Nas esticolisinas a porção N-terminal apresenta um segmento de aminoácidos hidrofóbicos sem alta probabilidade de se estruturar em solução (resíduos de 1 a 10), bem como um segmento de caráter altamente anfipático (resíduos 11 a 30), estruturado em α -hélice (Fig. 1.3) (Mancheño *et al.*, 2003, Castrillo *et al.*, 2010). Nessa região, residem as únicas três substituições não conservativas entre StI e StII, localizadas nas posições Glu2/Ala1, Asp9/Ala8 e Gly23/Glu22, além de um resíduo extra de serina na posição 1 de StI, conferindo a essa isoforma um caráter mais hidrofílico (Fig. 1.3) (Huerta *et al.*, 2001).

A região N-terminal das actinoporinas mostrou-se crucial para a formação do poro. A deleção da região N-terminal de EqtII inibiu completamente a lise de eritrócitos (Anderluh *et al.*, 1997). A ligação covalente do N-terminal de EqtII por meio de resíduos de cisteína nas posições 8 e 69 gerou mutantes capazes de se ligar, mas incapazes de promover o vazamento do conteúdo interno de vesículas lipídicas (Hong *et al.*, 2002).

A introdução de resíduos de Cys por mutação sítio-dirigida em diferentes posições de EqtII e a ligação de uma sonda fluorescente sensível à polaridade a estes resíduos mostrou que, além da região dos resíduos aromáticos, a região terminal também penetra na membrana (Anderluh *et al.*, 1999; Rojko *et al.*, 2013).

1.3 Mecanismo de formação do poro

A formação do poro pelas esticolisinas e outras actinoporinas inicia-se com a ligação da toxina à membrana lipídica por meio do cluster de resíduos aromáticos acima mencionado (Fig. 1.4A) (Mancheño *et al.*, 2003; Athanasiadis *et al.*, 2001). Essas posições são altamente conservadas entre as actinoporinas (Alvarez *et al.*, 2009) e, pela grande afinidade desses resíduos pela superfície das membranas, acredita-se que nesse primeiro momento a ligação às membranas se dê de forma inespecífica.

Estudos de mutação sítio-dirigida em EqtlI mostraram que os resíduos do cluster aromático são de grande importância na ligação a membranas, uma vez que a mutação dos resíduos de triptofano W116/117 nessa região diminuiu a afinidade da toxina pelas bicamadas, bem como sua atividade hemolítica (Malovrh *et al.*, 2000). Estudos com o mutante de StI W111C também indicam uma diminuição na ligação e atividade da toxina em relação a StI nativa (Antonini *et al.*, 2014).

Posteriormente à ligação da toxina à membrana, ocorreria a ligação específica do sítio de ligação de POC com SM. Uma vez ligada à membrana, o N-terminal da toxina se desprenderia do sanduíche de folhas- β e passaria a interagir com a superfície da bicamada (Fig. 1.4A) (Tejuca *et al.*, 1996; de los Ríos *et al.*, 1998; Mancheño *et al.*, 2003; Menestrina *et al.*, 1999; Anderluh *et al.*, 2003; Malovrh *et al.*, 2003; Guitierrez-Aguirre *et al.*, 2004; Rojko *et al.*, 2013; Rojko *et al.*, 2015). Nessa etapa, ao interagir com os lipídios, ocorreria um aumento no conteúdo helicoidal do segmento N-terminal. No caso das esticolisinas, estudos de CD e FTIR sugerem que a ligação à membrana promove um aumento de 5% do conteúdo de α -hélice, equivalente a 9 resíduos, e 6% no conteúdo de folhas- β . O ganho de estrutura em hélice observado se concentraria majoritariamente na região N-terminal, com a formação de um novo segmento de hélice, ou expansão do já existente na região dos resíduos 1-14 (Menestrina *et al.*, 1999; Alvarez *et al.*, 2003; Castrillo *et al.*, 2010).

Em seguida, ocorreria oligomerização da proteína e a inserção parcial do segmento em α -hélice na membrana juntamente com a reorganização dos lipídios formando um poro de natureza toroidal nos casos das esticolisinas e da EqtlI (Malovrh *et al.*, 2003) (Fig. 1.4A). O lúmen do poro seria recoberto pelos resíduos da

face hidrofílica da α -hélice e pelas cabeças polares dos lipídios em curvatura positiva (Mancheño *et al.*, 2003; Alegre-Cebollada *et al.*, 2007; Anderluh *et al.*, 2003; Alvarez *et al.*, 2003).

Estudos com StI e fosfolipídios marcados com sondas fluorescentes mostraram que a toxina foi capaz de induzir redistribuição dos lipídios entre os folhetos da bicamada, sugerindo a presença de uma região continua entre os folhetos, característica da formação de um poro toroidal (Alvarez *et al.*, 2001). Nessa etapa, ocorreria a última alteração conformacional com a mudança na orientação da hélice N-terminal em relação ao core β por meio de uma região flexível entre os resíduos 30-35.

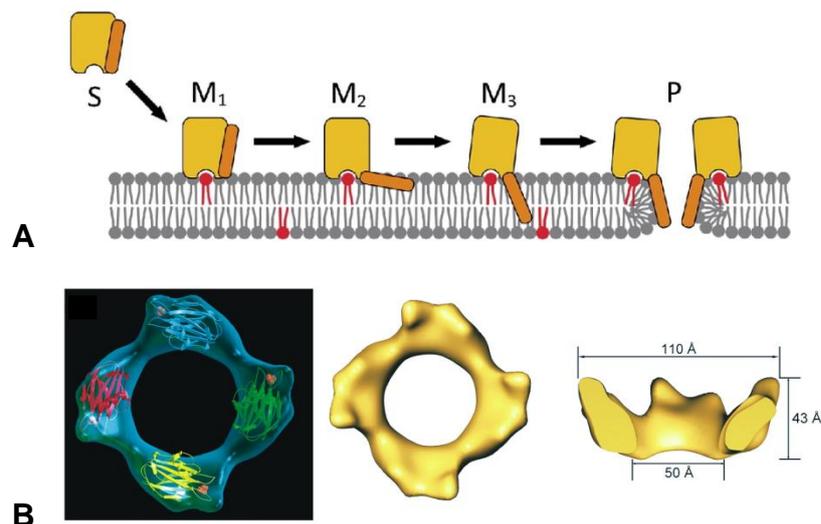


Figura 1.4 (A) Figura esquemática das etapas envolvidas na formação de poro toroidal (Rojko *et al.*, 2015). (B) Modelo do tetrâmero da St II obtido por microscopia eletrônica de alta resolução (Mancheño *et al.*, 2003).

O número de monômeros de esticolisinas formando o poro toroidal não é fixo, variando entre 2 e 7 subunidades como indicam estudos de medida de corrente do canal formado (Antonini *et al.*, 2014). Medidas de corrente de canal único (single channel) e experimentos de fluorescência com a toxina marcada também indicam que não há uma estequiometria fixa no poro formado por EqtII (Rojko *et al.*, 2013; Tanaka *et al.*, 2015). Entretanto, esses e outros estudos indicam a existência de estados oligoméricos preferenciais, sendo as formas trimérica e tetramérica as mais estáveis e frequentes (Fig. 1.4B) (Mancheño *et al.*, 2003; Rojko *et al.*, 2013). Apesar das variações no número de monômeros formando o poro, o tamanho médio do raio

hidratado do canal formado pelas esticolisinas e pela EqtlI é de 1 nm e não sofre grandes flutuações (Tejuca *et al.*, 1996; Tejuca *et al.*, 2001; Belmonte *et al.*, 1993).

Em contraste com o observado para as esticolisinas e EqtlI, estudos de cristalografia de raios-X e de crio-microscopia eletrônica mostraram que o poro formado por FragC é formado por oito ou nove monômeros, de natureza cônica, e com a parte interna do canal recoberta apenas pelas hélices N-terminais da toxina (Fig. 1.5) (Mechaly *et al.*, 2011; Tanaka *et al.*, 2015). Tal arquitetura do poro de FragC é possível devido à existência de uma rede de contatos toxina-toxina e toxina-lipídio específicos que estabilizam tal arranjo (Mechaly *et al.*, 2011; Tanaka *et al.*, 2015).

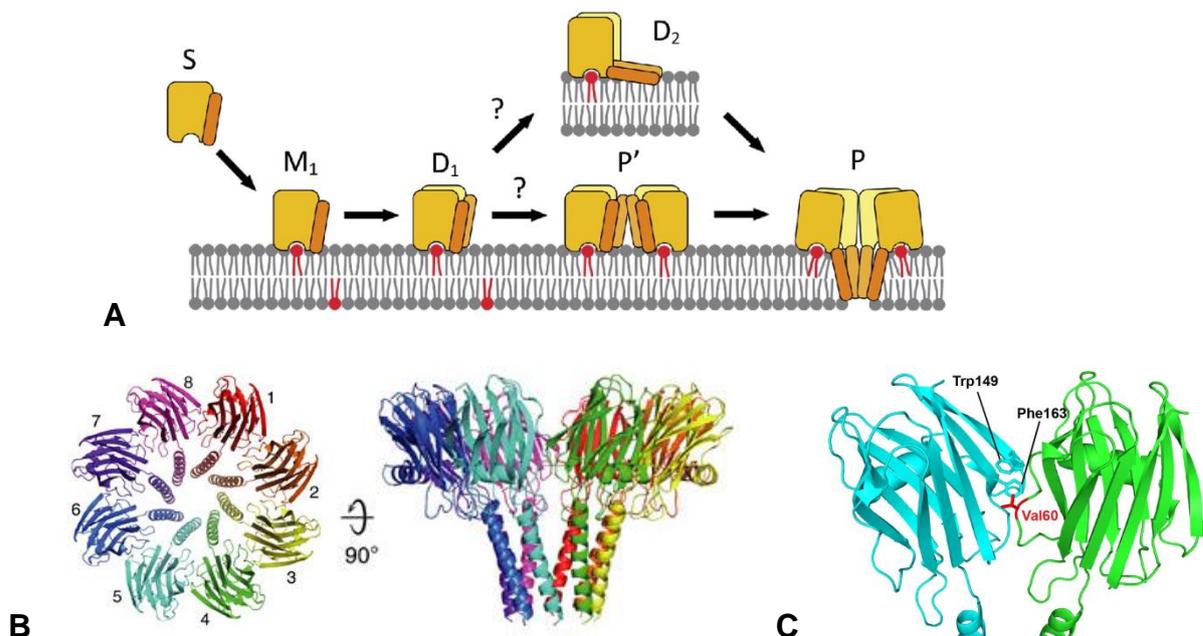


Figura 1.5 (A) Figura esquemática das etapas envolvidas na formação do poro cônico de FragC (Rojko *et al.*, 2015). (B) Arranjo do octâmero de FragC na região do poro (Tanaka *et al.*, 2015). (C) Contato entre dois monômeros de FragC envolvendo Val60, Trp149 e Phe 163 (Morante *et al.*, 2015b).

Mutantes de FragC nas posições Phe16 e Val60 indicam a importância desses resíduos no processo de oligomerização da toxina e nos contatos específicos entre os monômeros. Inicialmente, em solução, a hélice estaria ligada ao corpo da toxina pelo contato Phe16-Val60. Ao ligar-se à membrana, a hélice se desprende do corpo da toxina e Val60 fica livre para então estabelecer contatos com Trp149 e Phe163 de outro monômero (Morante *et al.*, 2015a, 2015b). A formação de dímeros de FragC está diretamente relacionada com as etapas do mecanismo de

formação do poro e montagem do arranjo que aconteceria até a forma octamérica pela adição sucessiva de moléculas dimerizadas (Fig. 1.5A) (Tanaka et al., 2015; Rojko et al., 2015).

1.4 Estudos do mecanismo de ação das actinoporinas por meio de peptídeos correspondentes à região N-terminal

O estudo da estrutura de proteínas em resolução atômica, principalmente de proteínas de membrana, é bastante desafiador uma vez que existem dificuldades na aplicação de técnicas de alta resolução como cristalografia de raios X e ressonância magnética nuclear. Para contornar tal problema, a análise conformacional e dinâmica de fragmentos da proteína tem sido uma alternativa. Similarmente ao que tem sido encontrado para proteínas globulares (Dyson *et al.*, 1985; Dyson & Wright, 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. Em particular, vários estudos têm sido realizados com fragmentos de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) (Shinagawa *et al.*, 1994, Yeagle & Albert, 2007, Pertinhez *et al.*, 1995; Spisni *et al.*, 1996; Pertinhez *et al.*, 1997; Franzoni *et al.*, 1997; Salinas *et al.*, 2002, Schreier *et al.*, 2002).

Peptídeos correspondentes ao N-terminal das actinoporinas têm se mostrado úteis no estudo não só de propriedades conformacionais, mas também de propriedades funcionais e mecanísticas da ação das toxinas. Peptídeos contendo a sequência 1-31 ou 1-30 de StI e StII, respectivamente, mostraram-se inicialmente capazes de mimetizar funcionalmente as toxinas, exibindo atividade formadora de poros em eritrócitos (Casallanovo et al., 2006; Cilli et al., 2007). Esses estudos foram capazes de correlacionar a diferença de atividade entre as isoformas com as substituições contidas nessa região. Os peptídeos também se mostraram ativos em membranas lipídicas em ensaios de vazamento do conteúdo interno de LUV e em experimentos de microscopia óptica com vesículas unilamelares gigantes (GUV) (Ros et al., 2011).

Recentemente, um estudo comparativo entre os peptídeos das esticolisinas, e os fragmentos 1-32 de EqtII e FragC mostrou a correlação entre a atividade das toxinas e o índice de hidrofobicidade do segmento N-terminal. A atividade da toxina,

bem como a do segmento N-terminal, é proporcional ao índice de hidrofobicidade da sequência 1-32 na ordem: StII > EqtII \approx FragC > StI (Ros et al., 2015). O tamanho do poro formado pelos peptídeos em eritrócitos é de 1 nm, assim como o do poro formado pelas toxinas (Casallanovo et al., 2006). O estudo mostrou que, além de mimetizar funcionalmente as toxinas em relação ao tamanho do poro, essa característica é determinada pelas hélices e seu arranjo na região do poro.

A investigação das propriedades conformacionais desses fragmentos tem sido feita tanto em solução como na presença de membranas modelo. Estudos de CD dos peptídeos StII₁₋₃₀ e StI₁₋₃₁ e de fragmentos mais curtos indicaram um aumento no conteúdo de α -hélice na ligação das moléculas a membranas (micelas e bicamadas) (Paulino, 2010). O aumento do conteúdo helicoidal dos peptídeos corrobora a hipótese de que a maior parte da alteração conformacional durante a formação do poro envolve o N-terminal.

Estudos de NMR de StI₁₋₃₀ em solução e ligado a micelas de DPC também mostraram um aumento no conteúdo helicoidal do peptídeo além de evidenciar a região sujeita a tais alterações e resolver a estrutura em alta resolução da forma final da hélice na região do poro. Segundo Castrillo et al., 2010, em solução o peptídeo possui uma estrutura flexível com a região 14-22 com maior propensão de aquisição de estrutura secundária em α -hélice.

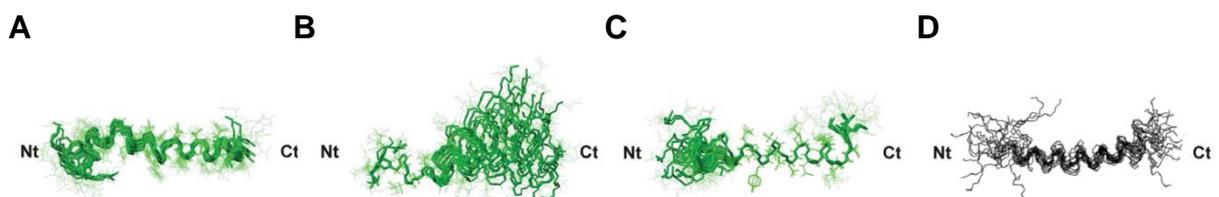


Figura 1.6 Sobreposição dos 20 modelos estruturais do peptídeo StI₁₋₃₀ obtida por NMR em TFE 30% (Castrillo et al., 2010). Sobreposição: (A) global dos 30 resíduos; (B) resíduos 4-9; (C) resíduos 14-22. (D) Sobreposição das 20 estruturas do peptídeo EqtII₁₋₃₂ obtidas por NMR em micelas de DPC (Dreschsler et al., 2006).

Em TFE e micelas de DPC StI₁₋₃₀ apresenta dois segmentos em α -hélice, resíduos 4-9 e 14-25, ligados por um segmento flexível (Fig. 1.6) (Castrillo et al., 2010). A sobreposição global e dos segmentos helicoidais de forma separada evidencia a região flexível bem como o ângulo entre os segmentos em α -hélice.

Estudos de fluorescência utilizando diferentes análogos da sequência StII₁₋₃₀ com resíduos de leucina substituídos por triptofano nas posições 2, 12, 17 e 24 contribuíram para o entendimento da topologia e orientação do segmento N-terminal das toxinas na interação com micelas e bicamadas (Ros et al., 2013). Estudos de ligação em monocamadas, fluorescência intrínseca do triptofano, e supressão de fluorescência por moléculas aquo e lipossolúveis mostraram que apenas a posição 2 encontra-se enterrada na região hidrofóbica da bicamada enquanto o resto do peptídeo estaria mais exposto ao ambiente aquoso na interface membrana-água (Ros et al., 2013). Dessa forma, o peptídeo apresentaria uma região flexível ao redor do resíduo 10 que permitiria à região hidrofóbica 1-10 interagir com as cadeias acila dos lipídios enquanto o resto da molécula permanece na superfície da membrana, assim como na estrutura resolvida por Castrillo et al., 2010.

Diversos estudos funcionais e estruturais foram desenvolvidos com peptídeos do N-terminal de EqtII com resultados semelhantes aos obtidos com os peptídeos das esticolisinas. Estudos de atividade em vesículas lipídicas e em eritrócitos mostraram que os peptídeos de EqtII são capazes de formar poros e que em vesículas lipídicas a atividade é favorecida por interações eletrostáticas e é pouco afetada pela presença de SM na composição da bicamada (Dreschsler et al., 2006).

Do ponto de vista conformacional EqtII₁₋₃₂ se comporta como os peptídeos de esticolisinas, apresentando um baixo conteúdo helicoidal em solução, que aumenta com a ligação em membranas modelo assim como mostrado por estudos de dicroísmo circular com radiação síncrotron, FTIR e NMR (Dreschsler et al., 2006; Dreschsler et al., 2009). Essas observações corroboram o ganho estrutural observado na ligação da toxina a membranas e a hipótese de que a alteração estrutural ocorra majoritariamente no N-terminal.

A resolução da estrutura de EqtII em micelas de DPC por NMR mostrou que diferentemente do peptídeo StI₁₋₃₀, este adota uma conformação com apenas um segmento helicoidal (Fig. 1.6D). A hélice de caráter anfipático expande-se do resíduo 6 ao 28 do peptídeo (Dreschsler et al., 2006).

Por meio de medidas de distâncias entre núcleos marcados nos resíduos Phe16-¹⁹F, Leu19-¹³C e Leu23-¹⁵N, experimentos de NMR no estado sólido (SS-NMR) em diferentes condições indicaram alterações conformacionais nessa região

ao longo dos passos no mecanismo de formação do poro (Lam et al., 2010). A variação na distância entre Phe16-¹⁹F e Leu19-¹³C de 10,8 Å em solução, para 5,0 e 6,4 Å em DMPC e PC:SM, respectivamente, evidencia a estruturação do peptídeo nessa região (Lam et al., 2010). As distâncias entre Phe16-¹⁹F e DMPC-³¹P junto com estudos de simulação de dinâmica molecular, apresentados no mesmo trabalho, indicam também a presença de contatos entre as cargas positiva do peptídeo e o grupo fosfato negativo dos lipídios. Os estudos de simulação de dinâmica molecular de EqtII e EqtII₁₋₃₂ mostraram também que em ambos a região 21-24 se estrutura em hélice enquanto a região 1-15 permanece mais flexível. Na passagem da molécula para o ambiente da membrana, as simulações, assim como visto por outras técnicas, mostram um aumento do conteúdo helicoidal do peptídeo.

1.5 Utilização das esticolisinas e outras actinoporinas na construção de imunocinjugados

Imuconjugados são moléculas híbridas contendo uma porção designada para reconhecimento e ligação nos alvos desejados e outra porção efetora, normalmente uma toxina, que têm sua atividade direcionada pela porção de ligação (Tejuca et al., 2009). Entre os alvos mais comuns encontram-se células infecciosas, células tumorais, subconjuntos de células normais e células de parasitas.

A primeira tentativa de utilização de um imunocinjugado envolvendo uma toxina que age na membrana foi descrita nos trabalhos de Avila et al., 1988 e 1989. A porção hemolítica do extrato da anêmona *Stichodactyla helianthus* for ligada aos anticorpos monoclonais para reconhecimento de antígenos em células T imaturas (Avila et al., 1988) e células de carcinoma embrionário (Avila et al., 1989). Nesses estudos, observou-se a ação dos imunocinjugados contra células expressando os antígenos especificados e ausência de ação em mutantes com tais epítomos deletados.

O imunocinjugado formado por StI ligada ao anticorpo IOR C5, específico para um antígeno associado a tumores de colo de útero, mostrou-se capazes de ligar preferencialmente pela região do anticorpo em células tumorais (Tejuca et al., 2004). A taxa entre a citotoxicidade (ação desejada) e atividade hemolítica do imunocinjugado é sete vezes maior comparada à toxina livre, evidenciando a especificidade da molécula híbrida.

Imunoconjugados baseados na afinidade biotina-avidina utilizando mutantes da EqtII apesar de envolver um número maior de subunidades se mostraram mais versáteis e de montagem mais fácil (Tejuca et al., 1999). Por depender da ligação de um anticorpo secundário ao anticorpo de reconhecimento do antígeno, a escolha e teste de possíveis alvos é mais flexível em comparação com a montagem mais simples envolvendo a ligação direta anticorpo-toxina.

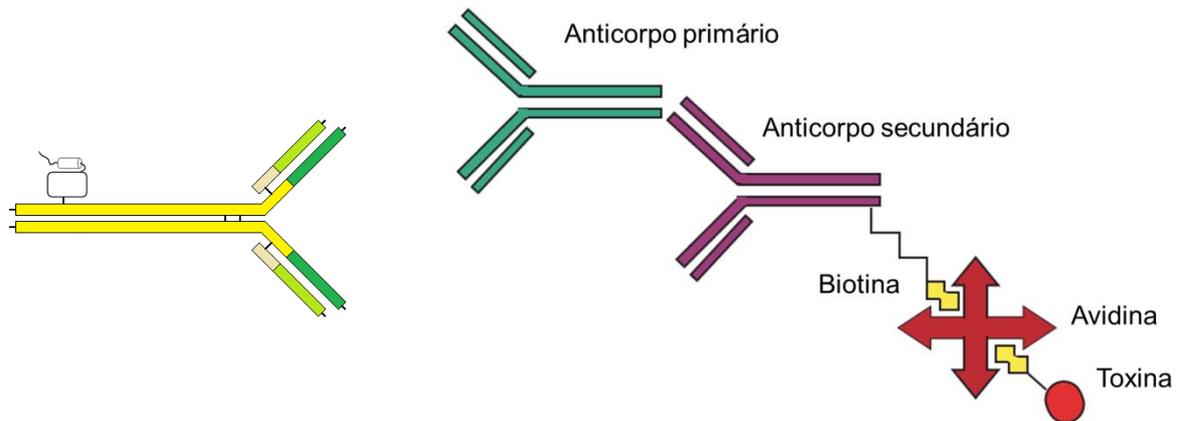


Figura 1.7. Esquema da construção de um imunoc conjugado de ligação direta toxina-anticorpo (direita) e baseado no sistema biotina-avidina (esquerda).

1.6 Estudos de peptídeos contendo o aminoácido TOAC

Em colaboração com os grupos dos Professores Antônio C.M. Paiva e Clovis R. Nakaie, nosso grupo desenvolveu o emprego do aminoácido paramagnético TOAC para a inclusão em peptídeos a fim de estudar suas propriedades conformacionais através da técnica de EPR (Nakaie et al., 1981; Nakaie et al., 1983; Marchetto et al., 1993). O uso dessa metodologia é amplamente relatado na literatura, como mostra revisão recente de Schreier e colaboradores (Schreier et al., 2012).

A molécula de TOAC, que teve sua síntese descrita em 1967 (Rassat & Rey, 1967), é caracterizada por uma estrutura heterocíclica saturada contendo um radical nitróxido estabilizado por átomos de carbono tetrassubstituídos (Fig. 1.8).

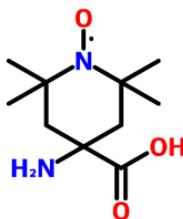


Figura 1.8 Estrutura do α -aminoácido TOAC.

Estudos pioneiros das propriedades físico-químicas do TOAC foram realizados com o aminoácido em solução e também com acetil-TOAC (grupo amino acetilado) e com o dipeptídeo TOAC-Gly (Nakaie et al., 1981). Os espectros de EPR de TOAC e seus análogos se mostraram sensíveis ao estado de ionização dos grupos amino ou carboxila livres, ou seja, são pH-dependentes. Medidas de desdobramento hiperfino, da relação de alturas entre as linhas e da assimetria das linhas espectrais se mostraram sensíveis à protonação/desprotonação das moléculas.

Os primeiros estudos de um peptídeo biologicamente ativo contendo TOAC foram reportados pelo nosso grupo em Nakaie et al., 1983. O hormônio peptídico angiotensina II e análogos contendo TOAC adicionado na posição zero ou substituído na posição 1 foram sintetizados e estudados do ponto de vista funcional e físico-químico. Além de reter parte da atividade em comparação com o peptídeo nativo, os análogos contendo TOAC se mostraram úteis para investigação das propriedades conformacionais do peptídeo em diferentes condições de pH (Nakaie et al., 1983).

Outros peptídeos de interesse biológico têm tido suas propriedades exploradas por meio do uso de análogos contendo TOAC ligado em diferentes posições da cadeia polipeptídica. Entre eles destacam-se outros hormônios peptídicos, peptídeos de defesa do hospedeiro, fragmentos de proteínas além de outras classes de peptídeos que atuam na membrana ou de alguma forma interagem com agregados lipídicos (Schreier et al., 2012).

Pelo fato de TOAC estar conectado diretamente à cadeia polipeptídica, os espectros de EPR do aminoácido são sensíveis a conformação e dinâmica do peptídeo. Juntamente com o emprego de outras técnicas espectroscópicas, como CD e fluorescência, propriedades de conformação e dinâmica podem ser analisadas

variando a posição do resíduo de TOAC ao longo da molécula (Vieira et al., 2002; Schreier et al., 2004; Teixeira et al., 2015). Apesar da conhecida influência de TOAC sobre a conformação do peptídeo (Toniolo et al., 1998), análogos de angiotensina e bradicinina contendo TOAC foram estudados por EPR em soluções de diferentes pHs, na presença de TFE e sistemas de membranas modelo, possibilitando a correlação de suas propriedades conformacionais com a atividade biológica (Vieira et al., 2002; Schreier et al., 2004; Vieira et al., 2009; Teixeira et al., 2015).

A dupla marcação de peptídeos com TOAC também tem sido usada para estudo conformacional de peptídeos por possibilitar medidas de distância entre os centros paramagnéticos (Smythe et al., 1995). Peptídeos modelo ricos em Ala com simples e dupla marcação com TOAC possibilitaram, por meio de medição de distâncias, CD e modelagem molecular, distinguir entre a formação de hélices do tipo α e 3_{10} (Smythe et al., 1995). A marcação dupla em diferentes posições do peptídeo de defesa do hospedeiro, tricogina, mostrou que ambas as porções N e C-terminal apresentam caráter helicoidal, e que as flutuações de distâncias observadas entre as extremidades é devida à flexibilidade dos resíduos de glicina nas posições 5 e 6 (Anderson et al., 1999; Monaco et al., 1999). A dupla marcação nas posições 8 e 14 de magainina-2, um peptídeo de defesa do hospedeiro, mostrou-se útil para medidas de distância e orientação relativa entre os nitróxidos de modo a contribuir para estudo da conformação do peptídeo. A distância entre os nitróxidos de TOAC medida por EPR foi de 15,3 Å, corroborando estudos anteriores de modelagem molecular que indicaram 13,3 Å de distância entre as posições 8 e 14 (Sahu et al., 2014). Ainda, a orientação relativa dos nitróxidos também corrobora estudos de modelagem do peptídeo (Sahu et al., 2014).

A interação de peptídeos contendo TOAC com membranas modelo pode ser estudada por EPR fornecendo informações relativas a diversos aspectos de tais sistemas. Agregados moleculares como micelas e bicamadas apresentam propriedades de polaridade e dinâmica diferentes da solução aquosa, de modo que espectros de EPR de TOAC são sensíveis a mudanças de ambiente do peptídeo marcado. Baseado em valores de desdobramento hiperfino isotrópico, medido pela separação entre as linhas espectrais em sistemas isotrópicos, parâmetro sensível à polaridade (Griffith et al., 1974, Marsh & Toniolo, 2008), é possível confirmar a ligação de peptídeos a membranas, bem como investigar a profundidade de imersão

do resíduo de TOAC em membranas lipídicas por meio da calibração relacionando o desdobramento hiperfino isotrópico e a posição de TOAC na membrana (Marsh & Toniolo, 2008). A ligação e a posição do peptídeo alameticina contendo TOAC nas posições 1, 8 e 16 na membrana foram investigadas pela medida de desdobramento hiperfino isotrópico adicionando informações relevantes sobre a profundidade e orientação relativa do peptídeo na membrana (Marsh, 2009).

A orientação de peptídeos marcados com TOAC estruturados em α -hélice ou folha- β em relação à superfície da membrana pode ser acessada em sistemas de bicelas ou bicamadas orientadas. Nesses sistemas, os espectros EPR de TOAC são sensíveis à orientação do resíduo paramagnético em relação ao campo magnético aplicado e, correlacionando as coordenadas dos eixos do nitróxido com a estrutura do peptídeo, é possível estudar a orientação desses na membrana (Marsh, 2006). Por meio estudos de espectros de EPR de peptídeos modelo e de alameticina, um peptídeo formador de canais iônicos, marcados com TOAC, Marsh et al., 2006 e 2007, calcularam a inclinação do peptídeo em membranas orientadas. Outra forma de estudar a orientação de α -hélices contendo TOAC é utilizando bicelas orientadas no campo magnético. Estudos com a hélice M2 do receptor de acetilcolina apresentaram valores de inclinação entre 14° e 16° , próximos aos medidos por SS-NMR e calculados por simulações de dinâmica molecular (Inbaraj et al., 2006; Inbaraj et al., 2007). Experimentos com marcação dupla e medidas de distâncias entre as posições 7 e 13 em sistemas orientados também contribuíram nos estudos desse sistema (Ghimire et al., 2012)

TOAC também tem sido usado em estudos da proteína integral de membrana, fosfolambana. A proteína, que na membrana é encontrada na forma de um pentâmero, tem a função de inibir a enzima Ca-ATPase do músculo cardíaco do retículo sarcoplasmático. A regulação da inibição exercida pela proteína é feita por uma proteína quinase que, ao fosforilar/desfosforilar a PLB, deflagra a transição entre diferentes estados de dinâmica molecular. A incorporação de TOAC nas posições 0, 11, 24 e 46 do polipeptídeo de 52 resíduos, descrita pela primeira vez em Karim et al., 2004, permitiu o estudo da dinâmica dos segmentos intra e extramembranar da cadeia. A posição 46, localizada na região da hélice transmembrana, apresentou uma única população fortemente imobilizada, enquanto nas posições 0 e 11, na porção citoplasmática da proteína, foi verificado um

equilíbrio entre um estado com alta mobilidade e outro imobilizado (Karim et al., 2004). Esses diferentes estados conformacionais observados foram caracterizados de acordo com sua dinâmica em estudos com os análogos de PLB reconstituídos na presença ou não da Ca-ATPase alvo da inibição. O estado de menor mobilidade do N-terminal, no qual a extremidade da cadeia interage com os lipídios, é denominado estado T (tenso) e refere-se à forma na qual o complexo PLB-Ca-ATPase é mantido e a enzima inibida. A fosforilação da PLB desloca o equilíbrio para a forma de maior mobilidade (R, relaxado), forma na qual Ca-ATPase se dissociaria da proteína de membrana e passaria para a forma ativa (Karim et al., 2006). Também foi possível estudar as interações proteína-proteína entre PLB e a enzima por meio dos espectros de EPR sensíveis a tais mudanças na estrutura e dinâmica da molécula na membrana (James et al., 2012). Estudos de simulação de dinâmica molecular dos análogos de PLB estudados permitiram aperfeiçoar a interpretação dos espectros de EPR. A correlação da posição do nitróxido em relação à hélice transmembrana possibilita o cálculo do ângulo entre a hélice e a membrana nas diferentes condições do sistema (Reid et al., 2015).

2. Objetivos

O objetivo do projeto consiste em dar continuidade aos estudos do mecanismo de ação das esticolisinas por meio do uso de peptídeos da região N-terminal das toxinas enfocando aspectos diversos das moléculas em solução e na presença de membranas modelo.

O efeito da interação com os lipídios sobre a conformação dos peptídeos, bem como a sua topografia nas membranas modelo será examinado por meio das técnicas espectroscópicas de dicroísmo circular (CD), fluorescência e ressonância paramagnética eletrônica (EPR). A interação peptídeo-micela será também estudada por meio de espalhamento de raios-X de baixo ângulo (SAXS). Será ainda investigada a capacidade dos peptídeos de mimetizar as toxinas e por meio de ensaios de atividade.

Ainda, por meio de síntese de peptídeos e ensaios de atividade, pretende-se buscar peptídeos curtos derivados das sequências de St I e II que exibam atividade antibacteriana e baixa toxicidade de modo a se constituírem em candidatos à aplicação em tratamento de infecções causadas por bactérias.

Objetivos específicos:

- por meio de estudos *in silico*, investigar as propriedades de aquisição de estrutura secundária das sequências e obter modelos estruturais em escala atômica dos peptídeos.

- avaliar a ligação e conformação dos peptídeos por meio de estudos CD dos peptídeos em solução e em presença membranas modelo (micelas e bicamadas), e avaliar a influência da forma, composição, e fase dos agregados lipídicos nessas propriedades.

- estudar por EPR aspectos dinâmicos, de afinidade e topologia da interação do peptídeo N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ com agregados lipídicos; estudos de supressão de fluorescência de lipídios marcados também pretendem avaliar a profundidade de penetração do peptídeo.

- estudar a capacidade dos peptídeos de mimetizar as toxinas formando poros em vesículas lipídicas e confirmar a possível estrutura toroidal do poro em

experimentos de vazamento de CF e translocação de lipídios marcados, respectivamente, utilizando fluorescência.

- experimentos de SAXS, realizados em colaboração com o grupo dos professores Leandro Barbosa e Rosangela Itri (IF-USP), pretendem estudar alterações no tamanho e forma de micelas de LPC decorrentes da interação peptídeo-micela.

- ensaios de atividade biológica pretendem investigar ação dos peptídeos em diferentes modelos celulares e enfocando diferentes aspectos como perturbação da membrana celular, e alterações na viabilidade e proliferação das células.

3. Materiais e Métodos

3.1 Peptídeos

Os peptídeos Stl₁₋₃₁, Stl₁₂₋₃₁, Stll₁₋₃₀, Stll₁₁₋₃₀ e N-TOAC-Stll₁₁₋₃₀ foram sintetizados no laboratório do Prof. Dr. Eduardo M. Cilli, do Instituto de Química, UNESP-Araraquara. Os peptídeos foram sintetizados e analisados como descrito em Casallanovo et al., 2006. A síntese foi realizada pela técnica de fase sólida (Merrifield, 1963; Stewart & Young, 1984) através da metodologia Fmoc (Atherton & Sheppard, 1989).

Os peptídeos Stll₁₋₁₀, Stl₂₀₋₃₁, Stl₂₀₋₃₁ E24A, Stl₂₀₋₃₁ E24K e Stl₂₀₋₃₁ E24Q foram sintetizados durante o desenvolvimento do projeto para “screening” de atividade de fragmentos curtos derivados do N-terminal de Stl e Stll.

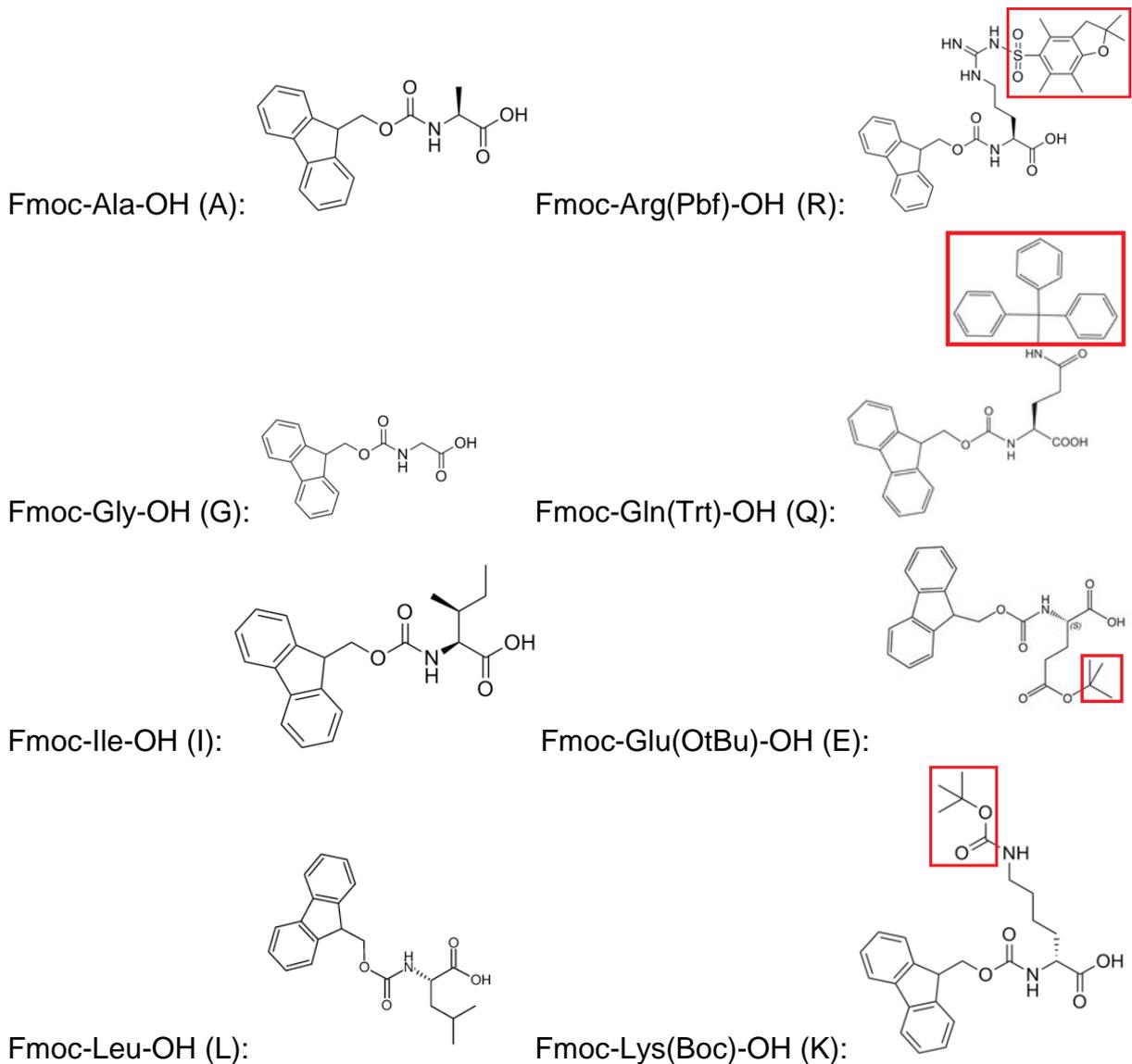
Tabela 3.1 – Peptídeos correspondentes ao N-terminal de St I e II.

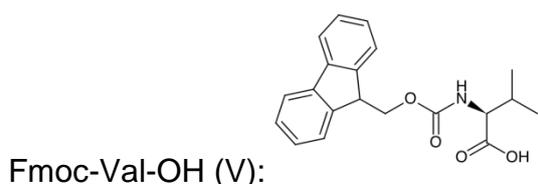
Peptídeo	Sequência	MM (Da)	Carga em pHs:		
			3	7	11
StI ₁₋₃₁	S ELAGT IIDGA SLTFE VLDKV LGELG KVS RK	3245,7	+ 4,6	0	- 3,2
StI ₁₂₋₃₁	SLTFE VLDKV LGELG KVS RK	2217,6	+ 4,7	+ 2	- 1,2
StII ₁₋₃₀	ALAGT IIAGA SLTFQ VLDKV LEELG KVS RK	3127,7	+ 4,7	+ 2	- 1,2
StII ₁₁₋₃₀	SLTFQ VLDKV LEELG KVS RK	2288,7	+ 4,7	+ 2	- 1,2
StII ₁₋₁₀	ALAGT IIAGA	856,0	+ 1	+ 1	+ 0,2
StI ₂₀₋₃₁	KV LGELG KVS RK	1312,6	+ 4,9	+ 4	+ 0,8
StI ₂₀₋₃₁ E24A	KV LGALG KVS RK	1254,6	+ 5	+ 5	+1,8
StI ₂₀₋₃₁ E24K	KV LGKLG KVS RK	1311,7	+ 6	+ 6	+ 2
StI ₂₀₋₃₁ E24Q	KV LGQLG KVS RK	1311,6	+ 5	+ 5	+1,8
N-TOAC-StII ₁₁₋₃₀	TOAC SLTFQ VLDKV LEELG KVS RK	2485,7	+ 4,7	+ 1	- 1,3

3.1.1 Síntese de peptídeos

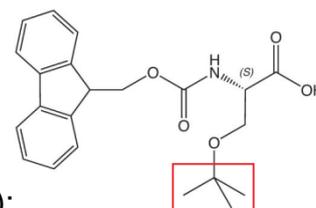
Foi empregada a síntese em fase sólida pela metodologia Fmoc em um equipamento Intavis ResPep SL (Intavis AG, Alemanha). A síntese foi realizada na escala de 50 micromoles utilizando-se colunas de 6 mL. Para tal escala, 110 mg de resina Rink Amide 200-400 mesh (Bachem, Suíça) foram pesados e deixados em DMF por 40 minutos para inchamento.

Os seguintes aminoácidos com o grupo amina protegido pelo Fmoc e as cadeias laterais protegidas, foram comprados da Intavis AG (Alemanha).

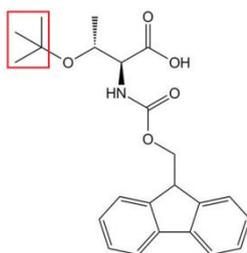




Fmoc-Ser(tBu)-OH (S):



Fmoc-Thr(tBu)-OH (T):



A proteção das hidroxilas de serina e treonina e da carboxila da cadeia lateral de ácido glutâmico foi feita pelo grupo tBu ou OtBu (terc-butil). O grupo amina da cadeia lateral de lisina foi protegido por Boc (terc-butiloxicarbonil), o grupo amida de glutamina por Trt (trifenilmetil), e a cadeia lateral de arginina por Pbf (2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofurano-5-sulfonil). Grupos destacados em vermelho.

Os aminoácidos, pesados de acordo com sequência dos peptídeos e a escala da síntese e a, foram dissolvidos em DMF para uma concentração final de 0,5 M. O reagente usado como ativador do grupo carboxila, HBTU, foi pesado de acordo com a escala da síntese e dissolvido em DMF para uma concentração de 0,6 M. Para evitar racemização, a ativação foi feita na presença de NMM. Para as reações de desproteção da extremidade N-terminal da cadeia polipeptídica crescente foi utilizada uma solução de piperidina 20% (v/v) em DMF.

3.1.1.1 Ciclos de desproteção e acoplamento

A desproteção inicial pela remoção do grupamento Fmoc ligado à resina, bem como as desproteções subsequentes pela remoção do Fmoc ligado à extremidade N-terminal da cadeia crescente foram realizadas com piperidina 20% em DMF por 10 minutos, seguido de lavagem da coluna com DMF.

Quantidade equimolares de aminoácido protegido e de HBTU foram utilizadas na reação de ativação da carboxila anteriormente ao acoplamento. O acoplamento de cada aminoácido foi realizado em dois ciclos, o primeiro de 15 e o segundo de 20 min, sendo a coluna a coluna lavada com DCM entre cada ciclo. A lavagem da resina após a desproteção do aminoácido final foi realizada em dois ciclos com a base NMP, e por último com DCM para secagem do produto.

3.1.1.2 Clivagem do peptídeo da resina e desproteção das cadeias laterais

A clivagem é realizada utilizando o coquetel contendo TFA (92,5%), TIS (5%) e água (2,5%), preparado no momento da clivagem. Além da clivagem, nessa etapa os grupos protetores das cadeias laterais também são removidos do peptídeo. Em uma seringa contendo a resina seca com o peptídeo sintetizado, 2 mL do coquetel são aspirados e a mistura é deixada sob agitação por uma hora. Em seguida, a fase líquida, agora com o peptídeo em solução, é coletada em um frasco de vidro de fundo redondo. O processo é repetido por mais duas vezes para assegurar a clivagem total do peptídeo da resina.

3.1.1.3 Eliminação do TFA e precipitação com éter

Eliminação do TFA foi realizada por secagem do solvente com um fluxo de nitrogênio reduzindo o volume para aproximadamente 0,5 mL. Posteriormente, adicionam-se aproximadamente 200 mL de éter gelado. Nessa etapa o TFA permanece na fase aquosa e o peptídeo forma uma fase sólida; assim é possível separar por filtração as fases líquida e sólida, obtendo-se o peptídeo livre da maior parte do TFA usado na clivagem. O restante do éter é removido por roto-evaporação.

3.1.1.4 Purificação

O peptídeo sólido obtido após a roto-evaporação é dissolvido em uma mistura de ACN 5 ou 10% (v/v) em água contendo 0,1% de TFA. A solução é em seguida centrifugada para separação de resíduos sólidos.

A purificação dos peptídeos foi realizada por cromatografia de fase reversa utilizando uma coluna do tipo C18 (5 μ m / 250x4,6 mm) (Phenomenex, CA, EUA) acoplada a um equipamento de cromatografia (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) Akta Basic 10 (GE Healthcare Lifescience, Inglaterra).

Amostras diluídas dos peptídeos foram inicialmente estudadas para estabelecimento do método a ser utilizado para a purificação em maior escala do material obtido na síntese. Antes da injeção de 1 mL do peptídeo dissolvido em ACN 5 ou 10% em água, a coluna foi previamente equilibrada com o mesmo solvente. Para a eluição do peptídeo utilizou-se como fase móvel um gradiente de água e

ACN ambos contendo 0,1% de TFA. Ao atingir o máximo pré-estabelecido da porcentagem de ACN na fase móvel do gradiente, outros solutos apolares foram eluídos com ACN 95% em água para limpeza da coluna e esta foi novamente reequilibrada com a mistura inicial de ACN em água. O fluxo de passagem da fase móvel pelo sistema variou de 3 até 5 mL/min, conferindo uma pressão ao sistema de 6 até 8 MPa. Durante a corrida, foi monitorada a absorbância nos comprimentos de onda de 214, 235 e 280 nm para a composição do cromatograma e seleção dos picos. Os peptídeos foram coletados em frações em um sistema automático Äkta Fraction Collector Frac-900 (GE Healthcare Lifescience, Inglaterra) acoplado ao controle do programa de corrida. As frações contendo o peptídeo foram em seguida liofilizadas para obtenção do peptídeo purificado em pó.

3.1.1.5 Análise dos produtos de síntese por HPLC-UV/Vis-MS

A análise e identificação dos peptídeos foram realizadas pela técnica de cromatografia analítica em fase líquida acoplada a um detector UV-visível seguido de um espectrômetro de massa em um equipamento LTQ XL Linear Ion Trap Mass Spectrometer (ThermoFisher Scientific, MA, EUA).

O método desenvolvido para análise consiste na injeção de 6 µL de solução dos peptídeos obtidos durante a purificação em uma coluna analítica de separação em fase reversa C18 (Kinetex 2,6 µm / 100x2,1 mm) (Phenomenex, CA, EUA). As amostras são preparadas a partir do peptídeo liofilizado dissolvendo-os em ACN 5% em água. A concentração de ACN é variada de 5 até 100% para eluição do soluto a uma taxa de aproximadamente 15%/minuto em um tempo total de corrida de 6 minutos e 30 segundos.

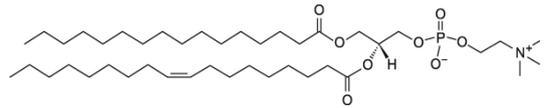
Espectros de absorção entre 200 e 800 nm do material eluído pela coluna são obtidos a cada 2,5 segundos para composição do cromatograma, permitindo também a análise do espectro de absorbância de cada ponto do cromatograma. Em seguida, o material eluído é direcionado ao espectrômetro de massa, passando por um sistema de ionização por “electrospray”, e um espectro de massa no modo positivo é registrado para análise da identidade das espécies na amostra e confirmação da massa esperada.

3.2 Lipídios

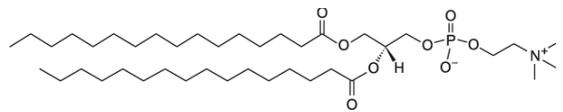
Para preparação de micelas e vesículas foram utilizados lisofosfolipídios, lisofosfoesfingolipídio, fosfolipídios e fosfoesfingolipídio comprados da Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, EUA.

Fosfolipídios e fosfoesfingolipídio:

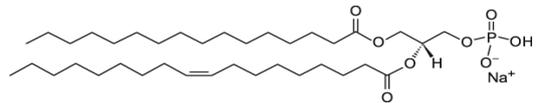
1-Palmitoil-2-oleil-fosfatidilcolina (POPC):



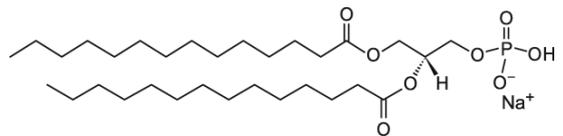
1,2-Dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC):



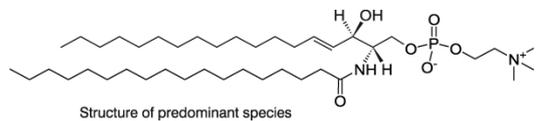
Ácido 1-palmitoil-2-oleil-fosfatídico (POPA):



Ácido 1,2-dimiristoil-fosfatídico (DMPA):

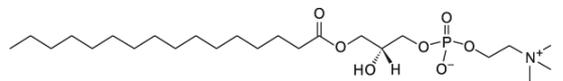


Esfingomielina de cérebro de porco (SM):

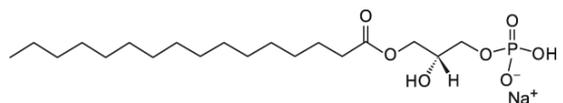


Lisofosfolipídios e lisofosfoesfingolipídio:

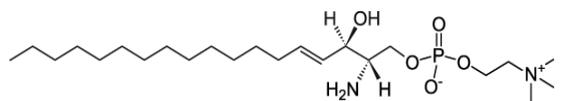
1-Palmitoil-2-hidróxi-fosfatidilcolina (LPC):



Ácido 1-palmitoil-2-hidróxi-fosfatídico (LPA):

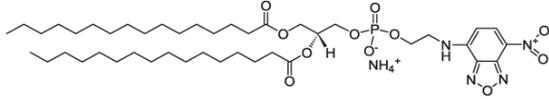


Esfingosilfosforilcolina (LSM):

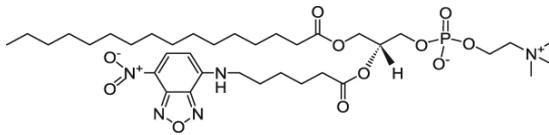


Lipídios com sondas fluorescentes:

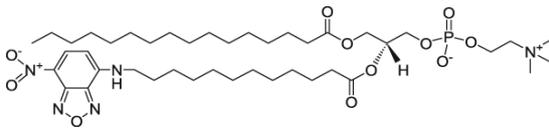
1,2-Dipalmitoil-3-fosfatidiletanolamina-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il) (DPPE-NBD):



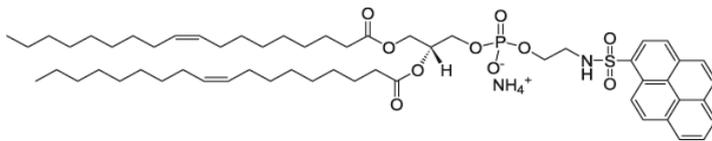
1-Palmitoil-2-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)amino]hexanoil]-3-fosfatidilcolina (PC-6-NBD):



1-Palmitoil-2-[12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)amino]dodecanoil]-3-fosfatidilcolina (PC-12-NBD):



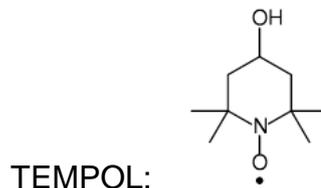
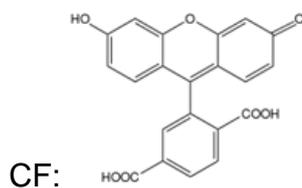
1,2-dioleoil-3-fosfatidiletanolamina-N-(1-pirenosulfonil) (DOPE-Pyr):



3.3 Outros reagentes

Carboxifluoresceína (Eastman Kodak Co., NY, EUA) foi recristalizada em etanol para eliminação de contaminantes polares.

O radical livre aquossolúvel TEMPOL usado na dosagem do peptídeo N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ por EPR foi comprado da Sigma-Aldrich (MO, EUA).



3.4 Preparação de membranas modelo

Os lipídios foram inicialmente pesados e dissolvidos em solução de clorofórmio e etanol (50:50, em volume) para a preparação de soluções estoque. Essas soluções foram quantificadas pela dosagem de fosfato mineralizado de acordo com o método de Rouser (Rouser *et al.*, 1970).

Para a preparação dos filmes lipídicos, alíquotas foram retiradas dos estoques e, em um tubo de ensaio, o solvente foi evaporado sob fluxo de nitrogênio. Obtém-se um filme, que é dissolvido em clorofórmio puro. Essa solução é seca com fluxo de nitrogênio para obter um filme uniforme no fundo do tubo. Finalmente, o filme lipídico é seco sob vácuo por 2 horas para total retirada do solvente. A preparação desse segundo filme é realizada pois, como os lipídios são estocados em solução com misturas de solventes, o primeiro filme não se distribui uniformemente pelo tubo.

As micelas foram obtidas pela ressuspensão dos filmes de lisocompostos em um volume calculado de tampão PBC 5,0 mM, em pHs 3,0, 7,0 ou 11,0.

Vesículas unilamelares grandes (LUV) foram obtidas pela ressuspensão dos filmes de lipídios em tampão PBC 5,0 mM. Nessa etapa obtém-se vesículas MLV que, após passarem por seis ciclos de congelamento e descongelamento, são extrusadas, num total de 32 passagens, por membranas de policarbonato com poros de 100 nm em um extrusor LiposoFast Basic (Avestin, Canadá), resultando nas LUV. No caso do experimento de permeabilidade em sistemas de membranas modelo, o filme lipídico é ressuspenso em solução de CF 50 mM para posterior extrusão.

Para os experimentos de SAXS, LPC em pó foi pesada e dissolvida em uma solução aquosa já contendo o peptídeo na concentração de 2 mM.

Os números entre parênteses após a composição lipídica de micelas e bicamadas referem-se à proporção molar dos lipídios nesses sistemas.

3.5 Espectroscopia de Dicroísmo circular (CD)

3.5.1 Atividade óptica

Macromoléculas em geral possuem assimetria molecular, de forma que sua estrutura não é sobreponível à sua imagem especular.

Moléculas assimétricas podem ser caracterizadas espectroscopicamente de acordo com sua atividade óptica em dextrorrotatórias (giram o plano da luz plano-polarizada para direita) ou levorrotatórias (giram o plano da luz plano-polarizada para esquerda). Esse fenômeno, primeiramente observado em cristais de tartarato de sódio e amônio tetra-hidratado por Louis Pasteur em 1848, é chamado de quiralidade (Flack, 2009).

As propriedades quirais das moléculas relacionadas às suas estruturas são estudadas por dois métodos espectroscópicos principais (Woody, 1996). O primeiro e mais simples é a polarimetria, método em que a amostra é analisada por um feixe de luz monocromática plano-polarizada. A amostra interage com a radiação girando em um determinado ângulo (α) o plano de polarização da luz sendo que, além das propriedades ópticas da molécula (rotação específica, $[\alpha]$), depende da concentração da molécula quiral (C) e do caminho percorrido pela luz na amostra (l).

A polarimetria segue a lei de Lambert-Beer:

$$\alpha = [\alpha].C . l \quad \text{Equação 3.1}$$

3.5.2 Estudo de propriedades da moléculas quirais por CD

Outro método de estudo das propriedades quirais das moléculas é o dicroísmo circular. No CD, quantidades iguais de duas componentes de luz circularmente polarizada, uma à esquerda e outra à direita, passam por uma amostra quiral que absorve diferencialmente cada uma delas, e a diferença de absorção de cada uma das componentes é medida.

A absorção de cada uma das componentes obedece à lei de Beer-Lambert, sendo medida no final a diferença de absorção de cada uma das componentes (ΔA).

$$\Delta A = A_E - A_D = (\epsilon_E - \epsilon_D) \cdot C \cdot l \quad \text{Equação 3.2}$$

onde A_E e A_D são as absorvâncias da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita, respectivamente; ϵ_E e ϵ_D são os coeficientes de absorção molar da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita, respectivamente; C é a concentração do soluto e l é o caminho óptico (Woody, 1996).

A absorção diferencial das componentes resulta numa luz elipticamente polarizada (Fig. 3.1) definida por um ângulo θ medido em graus (deg).

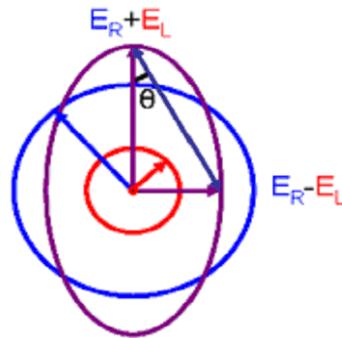


Figura 3.1. Esquema da luz elipticamente polarizada (roxo) formada pela luz circularmente polarizada à direita (azul) e à esquerda (vermelho) com intensidades diferentes.

A absorção diferencial (ΔA) e o ângulo da elipse formada pela luz elipticamente polarizada (θ) se relacionam por (Woody, 1996):

$$\theta = 2,303 \cdot \Delta A \cdot 180/4\pi = 2,303 \cdot (\epsilon_E - \epsilon_D) \cdot C \cdot l \cdot 180/4\pi \quad \text{Equação 3.3}$$

3.5.3 Estudo de proteínas e peptídeos por CD

O CD é amplamente usado no estudo estrutural de moléculas quirais como proteínas e peptídeos (Kelly *et al.*, 2005).

No estudo da estrutura secundária de proteínas e peptídeos o principal cromóforo é a ligação peptídica que apresenta assimetria, e, portanto, CD. O grupo amida das ligações peptídicas apresenta transições eletrônicas de baixa energia dos tipos $n \rightarrow \pi^*$ (entre 215 e 230 nm) e $\pi_0 \rightarrow \pi^*$ (entre 185 e 200 nm) que são as principais responsáveis pelo sinal de CD de polipeptídeos na região do ultravioleta distante (abaixo de 260 nm). Resíduos aromáticos apresentam transições eletrônicas do tipo $\pi_0 \rightarrow \pi^*$ na região do ultravioleta próximo (entre 250 e 300 nm)

embora, em muitos casos, tais resíduos contribuam para o espectro de proteínas na região do ultravioleta distante. Pontes de dissulfeto também apresentam CD relacionado à transição $n \rightarrow \sigma^*$ (ao redor de 260 nm) (Woody, 1996; Kelly *et al.*, 2005).

A luz ultravioleta circularmente polarizada ao passar por uma amostra de um polipeptídeo tem suas componentes diferencialmente absorvidas de acordo com o conjunto dos ângulos de torção ϕ (C_{α} -N) e ψ (C_{α} -C) que determinam a estrutura secundária do polipeptídeo (Fig. 3.2). Assim, por meio dos espectros de CD na região do ultravioleta distante é possível caracterizar a estrutura secundária de proteínas e peptídeos.

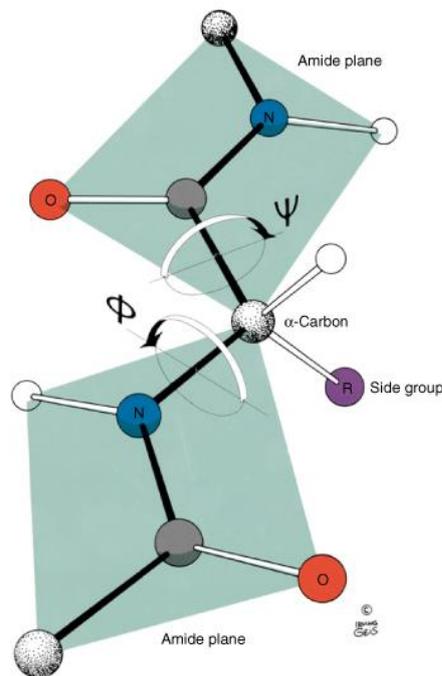


Figura 3.2. Representação esquemática da ligação peptídica, evidenciando os ângulos de torção ϕ e ψ (Voet & Voet, 2004).

Cada tipo de estrutura secundária, correspondendo a conjuntos específicos dos ângulos de torção ϕ (C_{α} -N) e ψ (C_{α} -C), origina um espectro de CD característico no ultravioleta distante (Fig. 3.3).

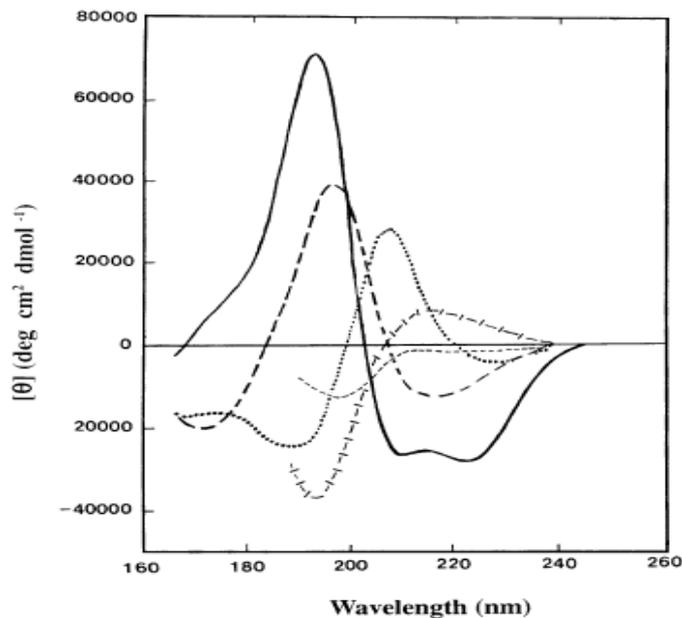


Figura 3.3. Espectros de CD na região do ultravioleta distante associados a diferentes tipos de estruturas secundárias. (—), α -hélice; (----), folha- β antiparalela; (.....), dobra- β do tipo I; (-·-·-·-), hélice estendida 3_{10} ou hélice de poli(Pro); (- - - - -), estrutura randômica (Kelly *et al.*, 2005).

Nos espectros de CD, para eliminar a dependência linear do caminho óptico, da concentração e do número de resíduos define-se elipticidade molar residual ($[\theta]$):

$$[\theta] = \theta / (10 \cdot C \cdot n \cdot l) \quad \text{Equação 3.4}$$

onde C é a concentração do peptídeo em mol/L, n é o número de resíduos, e l é o caminho óptico da cela utilizada expresso em cm. As unidades de θ e $[\theta]$ na equação são miligrau (mdeg) e grau.cm².dmol⁻¹, respectivamente.

3.5.4 Obtenção dos espectros de CD

Espectros de CD foram coletados em um espectropolarímetro Jasco J-720 na região do UV distante (190-260 nm), a $22 \pm 1^\circ\text{C}$.

Para os experimentos com micelas utilizou-se uma cela de caminho óptico de 1 mm, a concentração dos peptídeos foi de 12 μM e foram realizadas quatro acumulações para cada espectro. Nos experimentos com LUV, utilizou-se uma cela de caminho óptico de 5 mm, a concentração dos peptídeos foi de 5 μM e foram realizadas seis acumulações para cada espectro. Os experimentos foram realizados em tampão PBC 0,5 mM.

Foram coletados espectros dos peptídeos em solução e na presença de diferentes concentrações de membranas modelo. Coletaram-se espectros das micelas ou das vesículas em solução nas concentrações estudadas para posterior subtração dos espectros dos peptídeos.

Os espectros obtidos em unidades de miligraus foram processados e convertidos em $[\theta]$ utilizando-se o programa Microcal Origin 8.5.

3.5.5 Análise e desconvolução dos espectros de CD

Os espectros de CD normalizados para $[\theta]$ foram desconvoluídos para cálculo das porcentagens de cada tipo de estrutura secundária nos peptídeos em diferentes condições. Na presença de micelas ou bicamadas, os espectros selecionados para análise e desconvolução apresentavam somente a população ligada do peptídeo. Tal verificação foi realizada aumentando a concentração lipídica na amostra até que o espectro obtido não mudasse indicando a saturação da ligação.

Para o cálculo estrutural, utilizou-se o software Pepfit (Reed & Reed, 1997) e um conjunto de espectros padrão de Greenfield & Fasman, 1969. O software realiza a desconvolução calculando as proporções entre as curvas padrões de cada estrutura secundária correspondentes ao espectro de interesse.

A análise da ligação dos peptídeos às membranas modelo foi feita relacionando a intensidade de $[\theta]$ em 222 nm com a concentração de lipídios em cada espectro de CD. Os valores de elipticidade molar foram então normalizados pelo valor de intensidade em 222 nm obtido em solução ($[\theta]_N = [\theta]_{222} / [\theta]_{222 \text{ Solução}}$) de modo a obter isotermas de ligação dos peptídeos em diferentes condições. Aos dados experimentais ($[\theta]_{\text{Normalizado}}$ e $[\text{Lipídio}]$) foram ajustados os coeficientes da equação de Hill quantificando características da interação como afinidade dos peptídeos pelas membranas modelo (K) e cooperatividade do processo (n).

$$[\theta]_N = 1 + ([\theta]_{N_{\text{Máx}}} - 1) [\text{Lip}]^n / (K^n + [\text{Lip}]^n) \quad \text{Equação 3.5}$$

A constante de ligação (K_b , M^{-1}) é então calculada pelo inverso do valor da constante de Hill obtido pelo ajuste:

$$K_b = 1/K \quad \text{Equação 3.6}$$

3.6 Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR)

A técnica de EPR é altamente específica em suas aplicações, pois depende da presença de centros paramagnéticos (elétron desemparelhados) nos sistemas estudados. Somente moléculas que possuem ao menos um elétron desemparelhado podem ser detectadas por EPR (Knowles *et al.*, 1976).

A técnica de EPR se baseia na aplicação de um campo magnético (H), sob a ação do qual os níveis de energia do momento magnético de spin do elétron ($m_S = \pm \frac{1}{2}$) se tornam divergentes. Aplicando na amostra contendo um elétron desemparelhado e sob a ação de um campo magnético uma energia adequada na forma de radiação eletromagnética (hv), é possível induzir a transição entre os níveis de energia do momento magnético de spin, que nessa condição não são degenerados ($m_S = +\frac{1}{2}$ e $m_S = -\frac{1}{2}$) (Fig. 3.4).

A condição de ressonância para que ocorra a transição entre os níveis de energia do momento magnético de spin do elétron são obedecidas quando:

$$\Delta E = hv = g\beta H \quad \text{Equação 3.7}$$

onde h é a constante de Plank, v é a frequência da radiação eletromagnética, H é o campo magnético, β o magnéton de Bohr e g para um elétron livre vale 2,00232. Essa energia absorvida gera um espectro registrado como a primeira derivada da absorção (Knowles *et al.*, 1976) (Fig. 3.4).

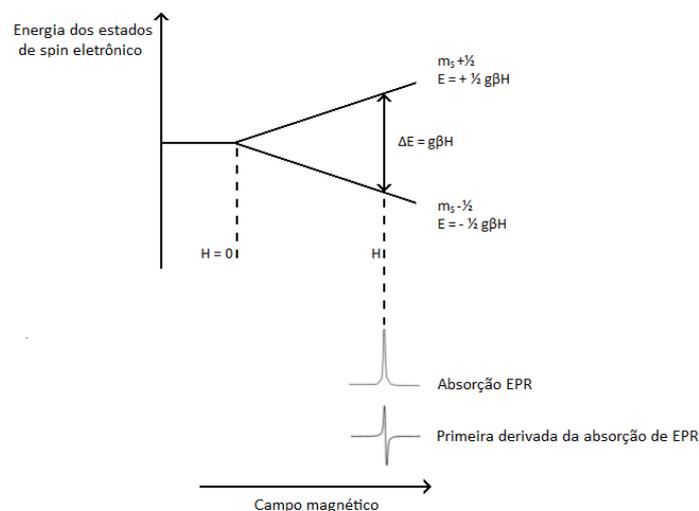


Figura 3.4. Desdobramento dos níveis de energia do spin eletrônico em presença de um campo magnético externo.

Em espectrômetros de banda X o campo aplicado é de cerca de 3 kG, e a frequência de microondas de cerca de 9 GHz. Espectrômetros de banda L operam a 1 GHz, de banda S a 3 GHz, de banda K operam a 24 GHz, de banda Q a 35 GHz (Knowles *et al.*, 1976).

3.6.1 Método do marcador de spin

O método do marcador de spin, desenvolvido por Harden M. McConnell (Onishi & McConnell, 1965), consiste no uso de uma molécula repórter estável que possua um elétron desemparelhado, e que, portanto, possa ser detectada por EPR.

Os radicais livres mais utilizados como marcadores de spin são os radicais nitróxido. O uso dessas espécies deve-se ao fato de serem estáveis em solventes com diferentes propriedades físico-químicas, em uma ampla faixa de pH e de temperatura. A estabilização desses radicais deve-se à presença de grupos metila ligados aos átomos de carbono vizinhos ao átomo de nitrogênio.

Pelo fato de os espectros EPR serem obtidos na região de microondas, correspondente à frequência de movimentos translacionais, rotacionais e/ou segmentais de moléculas, macromoléculas ou agregados moleculares, a análise desses espectros permite obter informações estruturais e dinâmicas a respeito dessas moléculas e agregados (Schreier *et al.*, 1978).

3.6.2 Espectros de EPR de radicais nitróxido

Em radicais nitróxido, a maior parte da densidade eletrônica referente ao elétron desemparelhado está delocalizada sobre o átomo de nitrogênio. Na presença de um campo magnético, o ^{14}N , isótopo mais abundante do nitrogênio e que possui spin nuclear igual a um ($I = 1$), pode apresentar três ($2I + 1$) valores para o momento magnético de spin nuclear ($m_I = -1, 0, +1$).

A interação hiperfina entre o spin eletrônico do elétron desemparelhado com o spin nuclear do átomo de nitrogênio, que na presença de um campo magnético possui três valores de momento angular de spin, causa o desdobramento de cada nível energético de spin eletrônico em três, chamado de desdobramento hiperfino (A ou T).

A energia das transições entre estados de spin são descritas pela Hamiltoniana de spin:

$$H = \beta_e H_0 g_e \hat{S} + \hat{S} \bar{A} \hat{I} + \beta_N H_0 g_N \hat{I} + H_{\text{Troca}} + H_{\text{Dipolar}} \quad \text{Equação 3.8}$$

onde o primeiro termo representa a interação entre o campo magnético e o spin eletrônico (interação eletrônica do tipo Zeeman), o segundo termo representa a interação entre spin eletrônico e spin nuclear (interação hiperfina), o terceiro, a interação entre o spin nuclear e o campo magnético (termo nuclear de Zeeman), a qual é negligenciável nas condições usuais dos experimentos de EPR. E os termos H_{Troca} e H_{Dipolar} representam as energias envolvidas em interações entre elétrons livres, que ocorrem em bi- ou poli-radicais ou em concentrações elevadas de monoradicais e também entre radicais e íons metálicos paramagnéticos. H_{Troca} depende da interpenetração dos orbitais das espécies paramagnéticas e H_{Dipolar} depende da geometria do sistema, uma vez que envolve uma dependência angular. Na equação, \vec{H}_0 é o vetor do campo magnético, β_e e β_N são os magnetons de Bohr eletrônico e nuclear, respectivamente, \bar{g}_N é o fator de desdobramento nuclear Zeeman, \bar{g}_e é o tensor g do elétron, \hat{S} e \hat{I} são, respectivamente, os operadores de momento angular de spin eletrônico e nuclear, e \bar{A} é o tensor de desdobramento hiperfino (Knowles et al., 1976).

Para que as transições ocorram, condições de ressonância devem ser obedecidas: $\Delta m_S = 1$ e $\Delta m_I = 0$. Portanto, na ausência de interações spin eletrônico-spin eletrônico, são observadas no espectro de EPR de radicais nítróxido três transições. A separação entre as linhas espectrais mede o desdobramento hiperfino (Fig. 3.5) (Knowles et al., 1976).

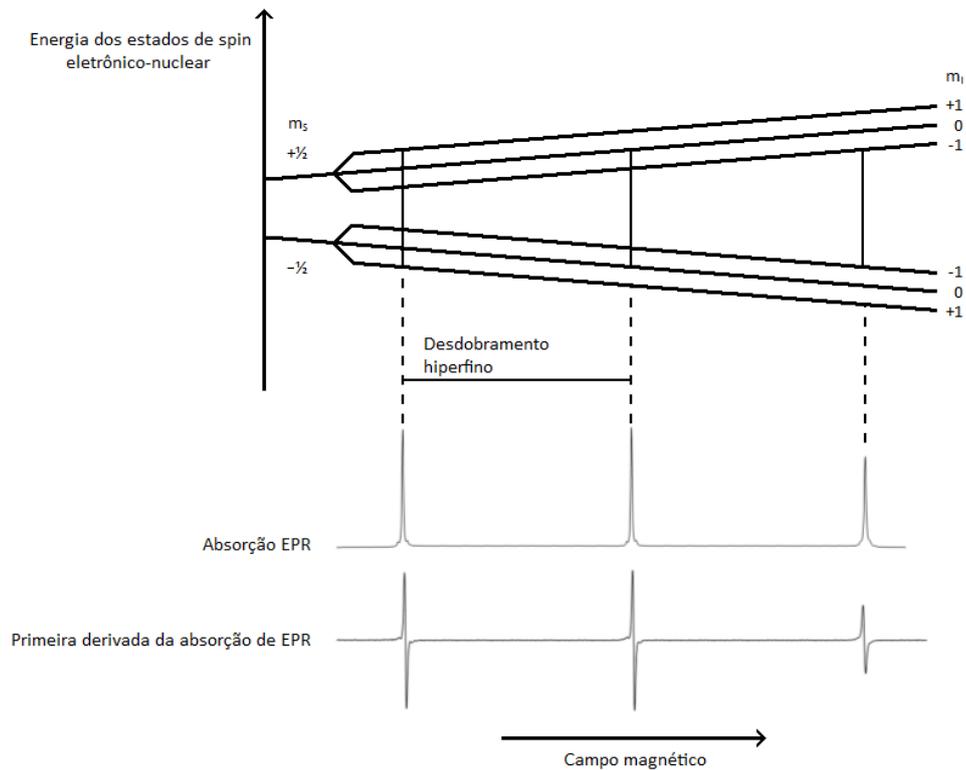


Figura 3.5. Desdobramento dos níveis de energia do spin eletrônico por um átomo com spin nuclear, $I=1$. A separação entre as linhas espectrais mede o desdobramento hiperfino.

3.6.3 Dependência dos espectros de EPR da orientação

Nos espectros de EPR de sistemas que possuem propriedades que dependem da direção (sistemas anisotrópicos), a posição das linhas no campo magnético e o desdobramento hiperfino, especificados pelos valores de natureza tensorial g e A , respectivamente, dependem da direção do campo magnético em relação aos eixos atribuídos ao radical nitróxido (Fig. 3.6A), que por sua vez podem ser correlacionados com os eixos da molécula contendo a função radical (Schreier et al., 1978).

A dependência dos espectros de EPR da orientação pode ser melhor entendida analisando-se os espectros de um radical nitróxido introduzido como uma impureza substitucional em um monocristal de uma substância diamagnética em função do ângulo entre o monocristal e o campo magnético (Fig. 3.6). No sistema de coordenadas atribuído ao radical nitróxido, o eixo x coincide com a direção da ligação N–O, o eixo z é paralelo ao orbital $2p\pi$ do átomo de nitrogênio, e o eixo y é perpendicular a x e z (Fig. 3.6A). Os espectros estão representados para o campo

magnético orientado paralelamente aos principais eixos moleculares do radical nitróxido (Fig. 3.6B). A análise dos espectros mostra claramente a variação dos valores de g e A com a mudança do eixo principal do radical nitróxido que está paralelo ao campo magnético aplicado (Fig. 3.6B) (Schreier et al., 1978).

No caso dos nitróxidos, quando o campo magnético estiver alinhado paralelamente ao orbital que contém a maior densidade de carga do elétron desemparelhado (eixo z), o valor de A será máximo ($A_{zz} \sim 32$ G) e o valor de g será mínimo ($g_{zz} \sim 2,002$). Quando o campo magnético estiver paralelo aos eixos y ou x , os valores de A se tornam menores (A_{xx} e $A_{yy} \sim 6$ G) e os de g maiores ($g_{xx} \sim 2,009$ e $g_{yy} \sim 2,006$) (Wertz & Bolton, 1972; Griffith et al., 1965).

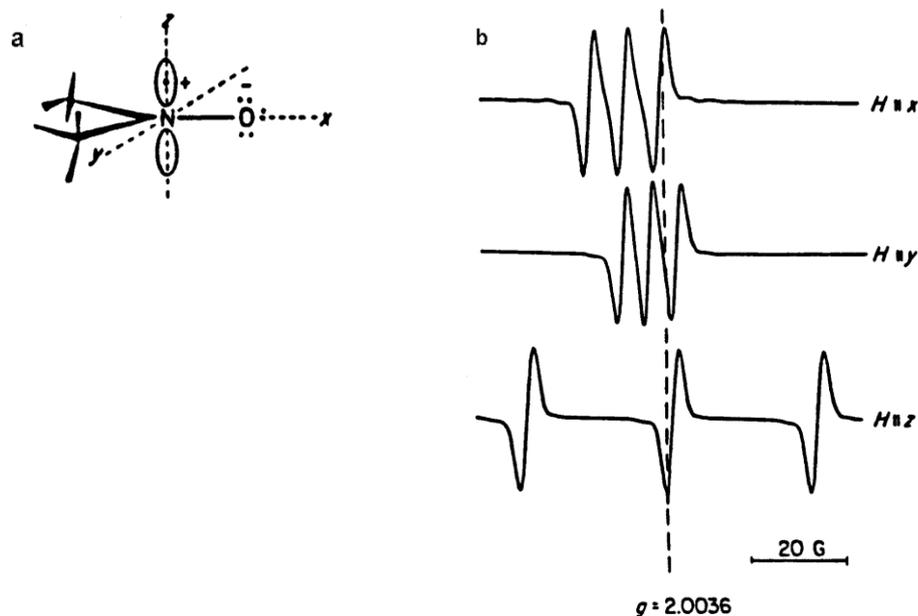


Figura 3.6. (A) Sistema de coordenadas atribuídas ao radical nitróxido. (B) Espectros do radical di-t-butilnitróxido incluído em um monocristal diamagnético de tetrametil-1,3-ciclobutadiona. Os espectros foram obtidos com a direção do campo magnético paralela aos eixos x , y e z do nitróxido (Griffith et al., 1965).

Para orientações em outras direções, os valores dos tensores g e A dependem da orientação do vetor do campo magnético em relação aos eixos atribuídos ao radical nitróxido (Griffith et al., 1965). A dependência angular de g e A é descrita por:

$$g(\theta, \phi) = g_{xx} \sin^2\theta \cos^2\phi + g_{yy} \sin^2\theta \sin^2\phi + g_{zz} \cos^2\theta \quad \text{Equação 3.9}$$

$$A^2(\theta, \phi) = A_{xx}^2 \sin^2\theta \cos^2\phi + A_{yy}^2 \sin^2\theta \sin^2\phi + A_{zz}^2 \cos^2\theta \quad \text{Equação 3.10}$$

onde θ é o ângulo entre o vetor de campo magnético aplicado e o eixo z do radical nitróxido, e ϕ é o ângulo formado entre a projeção do vetor de campo magnético no plano xy e o eixo x (Fig. 3.7).

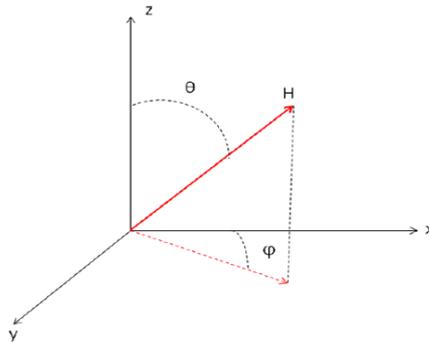


Figura 3.7. Diagrama de coordenadas polares da orientação dos eixos x, y e z do radical nitróxido em relação ao vetor de campo magnético (H).

3.6.4 Dependência dos espectros de EPR da mobilidade

Moléculas esféricas em fluidos isotrópicos geralmente apresentam movimento isotrópico. Movimentos isotrópicos são caracterizados por um tempo de correlação rotacional (τ), que é o tempo que a molécula leva para fazer um movimento de rotação ao redor de um eixo. Se o movimento é rápido na escala de tempo de EPR ($\tau < \sim 10^{-9}$ s), o espectro do marcador de spin apresentará valores de g e de desdobramento hiperfino que são as médias dos principais valores dos respectivos tensores (Schreier et al., 1978).

$$a_N = \frac{1}{3} (A_{xx} + A_{yy} + A_{zz}) \quad \text{Equação 3.11}$$

$$g_N = \frac{1}{3} (g_{xx} + g_{yy} + g_{zz}) \quad \text{Equação 3.12}$$

A velocidade do movimento determina a largura das linhas espectrais. Estas são estreitas para movimentos rápidos e vão se alargando à medida que o movimento se torna mais lento na escala de tempo da EPR (Fig. 3.8). Quando a frequência do movimento se torna comparável à diferença entre os valores principais de A ou g (medidos em unidades de frequência), obtém-se linhas de formas complexas. No caso extremo, quando o movimento molecular é lento na escala de tempo do aparelho ($\tau > \sim 5 \cdot 10^{-9}$ s), cada molécula contribui com um espectro individual, obtendo-se um espectro resultante que representa a soma dos espectros correspondentes a todas as possíveis orientações em relação ao campo magnético. Espectros desse tipo são chamados espectros de pó (Schreier et al., 1978).

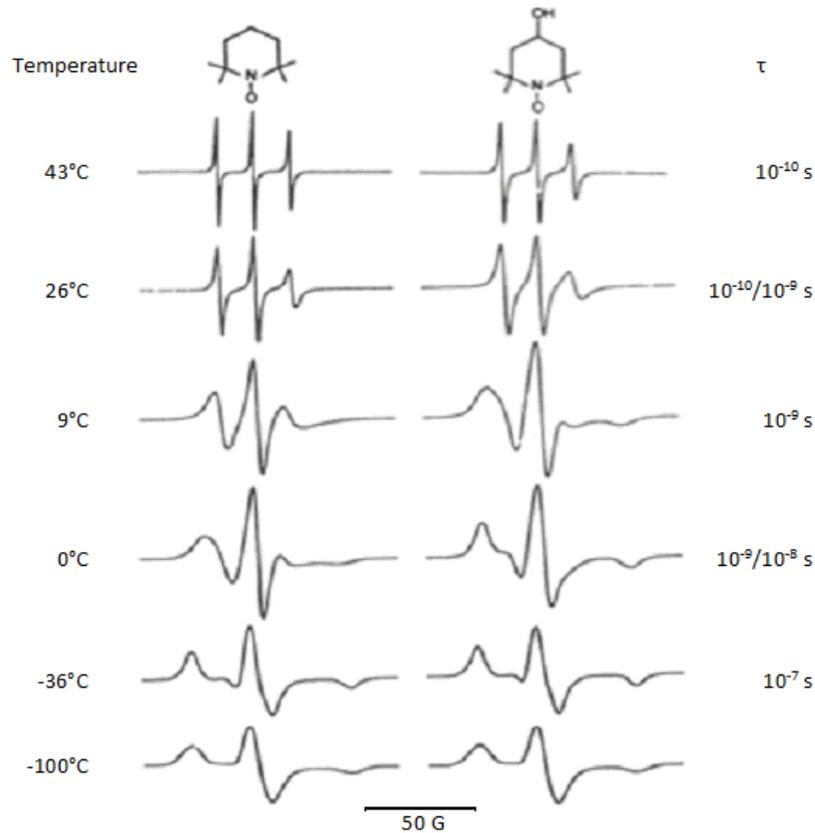


Figura 3.8. Espectros dos marcadores de spin: TEMPO (esquerda) e TEMPOL (direita) em glicerol a diferentes temperaturas. Os espectros a -36°C e -100°C correspondem a espectros de pó (Jost *et al.*, 1971).

É possível calcular o tempo de correlação rotacional a partir das alturas das linhas e da largura da linha de campo central a partir de duas expressões distintas derivadas para um movimento rápido e isotrópico ($5 \cdot 10^{-11} \text{ s} < \tau < 3 \cdot 10^{-9} \text{ s}$) (Kivelson, 1960; Freed & Fraenkel, 1963).

$$\tau_B = -1,27 \times 10^{-9} W_0/2 [(h_0/h_{+1})^{1/2} - (h_0/h_{-1})^{1/2}] \quad \text{Equação 3.13}$$

$$\tau_C = 1,19 \times 10^{-9} W_0/2 [(h_0/h_{+1})^{1/2} + (h_0/h_{-1})^{1/2} - 2] \quad \text{Equação 3.14}$$

onde W_0 é a largura da linha de campo central, h_0 , h_{+1} e h_{-1} são as alturas das linhas de campo baixo, campo central e campo alto respectivamente. As constantes numéricas usadas nos cálculos de tempo de correlação rotacional são derivadas a partir de valores de propriedades fundamentais como a carga, massa e fator g do elétron, o magnéton de Bohr e o campo magnético aplicado na amostra.

Mesmo em meios isotrópicos, verifica-se que frequentemente $\tau_B \neq \tau_C$. Essa diferença nos valores de tempo de correlação rotacional deve-se à existência de um

eixo preferencial de rotação ou a um movimento intramolecular que torna o movimento anisotrópico.

3.6.5 Dependência dos espectros de EPR da polaridade do meio

Os valores de g_N e a_N são sensíveis à polaridade do meio, g_N diminui e a_N aumenta com o aumento da polaridade (Brière *et al.*, 1965). Marcadores de spin que sofrem partição entre meios com polaridades distintas, pelas diferenças dos valores de g_N e a_N nos diferentes meios, podem gerar espectros em que as três linhas espectrais se encontram resolvidas para cada meio. Normalmente, observa-se alguma superposição dos espectros correspondentes aos dois meios, com melhor resolução da linha de campo alto (Nakaie *et al.*, 1981).

3.6.6 Marcadores de spin em membranas

Marcadores de spin empregados para estudo de membranas são de natureza lipídica, sendo comumente intercalados fisicamente, e tornando-se, assim, um constituinte da porção lipídica. Os marcadores de spin mais utilizados em estudos estruturais e dinâmicos de membranas são derivados de ácidos graxos, seus ésteres metílicos, fosfolipídios, ou esteróides. Devido à sua natureza estrutural, esses marcadores lipídicos tendem a se orientar com o eixo longo molecular paralelo à normal à bicamada (Fig. 3.9) (Schreier, 1979). Em marcadores de spin derivados de ácidos graxos ou fosfolipídios contendo o grupo 2,2-dimetil-N-oxil-oxazolidina na cadeia acila, o eixo z do radical nitróxido está direcionado ao longo do eixo longo molecular. Os outros dois eixos, x e y, encontram-se no plano perpendicular ao eixo longo molecular (Fig. 3.9A).

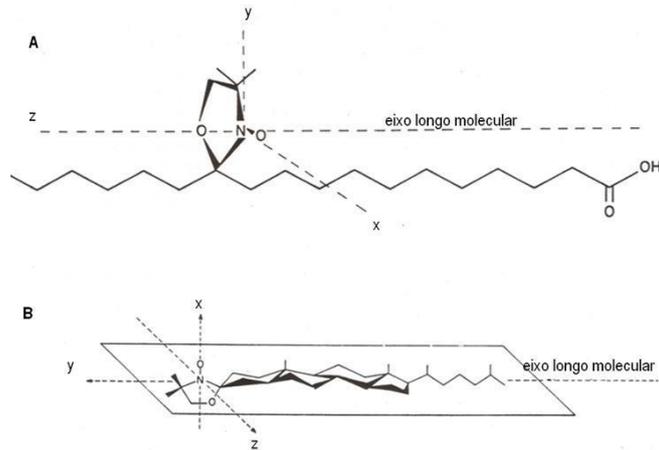


Figura 3.9. (A) Eixos principais para o grupo N-O em marcadores de spin derivados de ácidos graxos e (B) de esteróides. Em (A) o eixo z coincide aproximadamente com o eixo longo molecular do marcador de spin, enquanto que em (B) o eixo correspondente ao eixo longo molecular é aproximadamente paralelo a y (Schreier *et al.*, 1978).

A dependência angular do tensor de desdobramento hiperfino é a base para o cálculo do parâmetro de ordem, S , em sistemas de bicamadas planas ou em amostras macroscopicamente isotrópicas (lipossomos) tombando lentamente. O parâmetro de ordem (S) foi inicialmente descrito como uma medida da orientação do eixo longo molecular em relação a um eixo de referência, em geral tomado como a normal à superfície da bicamada (Fig. 3.10).

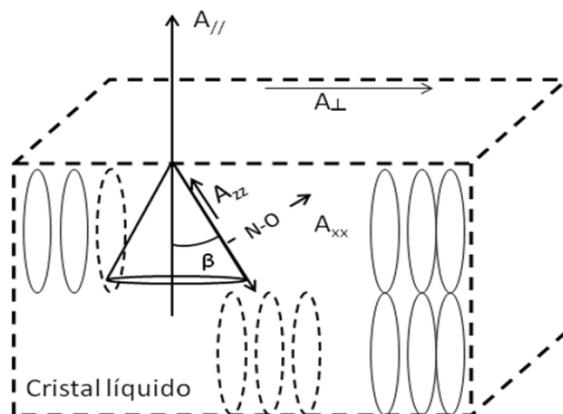


Figura 3.10. Orientação do eixo longo molecular em relação a um eixo de referência, em geral tomado como a normal à superfície da bicamada

Em vesículas compostas por bicamadas lipídicas, os espectros dos marcadores de spin representam a soma de todas as orientações possíveis do eixo longo da molécula em relação ao campo magnético. Embora haja uma distribuição isotrópica dos lipídios (a amostra é macroscopicamente isotrópica), os espectros que se somam refletem a orientação de cada molécula (Schreier, 1979). Sendo a bicamada lipídica um sistema anisotrópico, as moléculas na bicamada possuem movimento anisotrópico. Espectros de alguns marcadores de spin nesses sistemas apresentam pontos a partir dos quais é possível extrair $A_{||}$ e A_{\perp} denominados, respectivamente, extremos internos e externos do espectro, e calcular o parâmetro de ordem (Fig. 3.11) (Hubbell & McConnell, 1971).

Para um marcador orientado com seu eixo longo molecular aproximadamente paralelo à normal à bicamada e coincidindo com a direção da componente principal do tensor hiperfino (A_{zz}), o parâmetro de ordem é dado por (Seelig, 1970; Hubbell e McConnell, 1971):

$$S = \frac{A_{||} - A_{\perp}}{[A_{zz} - (A_{xx} + A_{yy})/2]} \quad \text{Equação 3.15}$$

onde $A_{||}$ e A_{\perp} são, respectivamente, os extremos externos e internos medidos no espectro de EPR (Fig. 3.11) e A_{zz} , A_{xx} e A_{yy} são os valores principais dos tensores nas direções z, x e y, e são iguais a 32,0, 6,0 e 6,0 G, respectivamente. A dependência do tensor de desdobramento hiperfino da polaridade do meio (Seção 3.6.5) faz com que em determinados casos seja necessário o uso de um fator de correção para calcular S (Hubbell e McConnell, 1971).

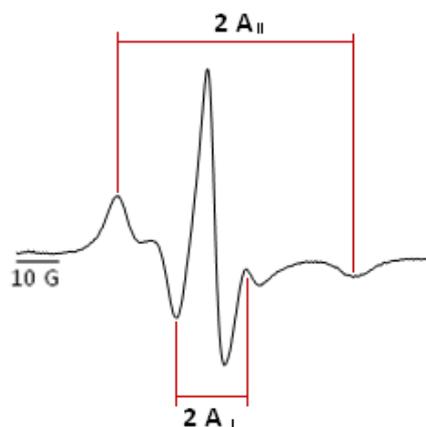


Figura 3.11. Medida dos extremos externos ($2A_{||}$) e internos ($2A_{\perp}$) no espectro de EPR do marcador de spin 1-palmitoil-2-estearoil-(5-doxil)-fosfatidilcolina (5-PCSL)

intercalado em vesículas contendo bicamadas fosfolipídicas de POPC:SM (50:50) (Paulino, 2010).

Em bicamadas planas, para se obter o parâmetro de ordem por meio da medida de desdobramento hiperfino é necessário obter os espectros com o campo magnético orientado perpendicular e paralelamente à superfície da (Seelig, 1970). Assim, obtêm-se os valores de desdobramento hiperfino A_{\parallel} e A_{\perp} para o campo magnético orientado paralelamente e perpendicularmente à normal à bicamada.

Vários modelos tem sido propostos para interpretar o parâmetro de ordem. O mais aceito descreve S como sendo relacionado a um cone dado por um ângulo γ em relação à normal à bicamada dentro do qual o eixo longo molecular do marcador de spin executa um caminho ao acaso (Jost *et al.*, 1971). Assim, o parâmetro de ordem está relacionado à amplitude do movimento do eixo longo molecular do marcador (Fig. 3.12). Quando o marcador está localizado na cadeia acila de um ácido graxo ou fosfolipídio, o parâmetro de ordem inclui a contribuição dos movimentos segmentais da cadeia.

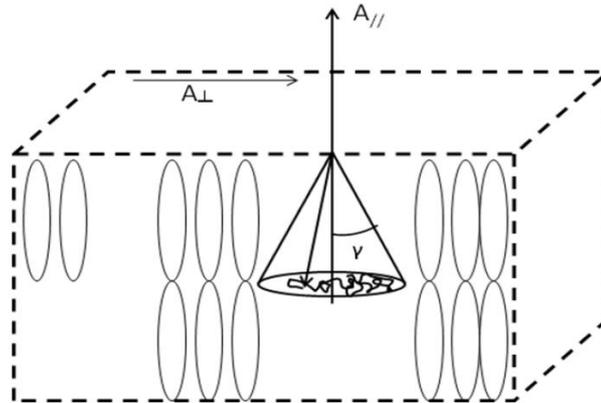


Figura 3.12. Descrição do parâmetro de ordem S relacionado aos movimentos dentro de um cone que forma um ângulo γ com a normal à bicamada (Jost *et al.*, 1971).

3.6.7 Obtenção dos espectros

Os espectros de EPR foram coletados em um aparelho Bruker modelo EMX-200, varrendo um campo de 100 G para o peptídeo com TOAC, com frequências da ordem de 9,9 GHz, potência de 5,0 mW e amplitude de modulação de 0,5 G, a $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

As amostras foram colocadas em celas chatas de quartzo para soluções aquosas (Wilmad-LabGlass, NJ, EUA). A concentração do peptídeo N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ nas amostras foi de aproximadamente 40 μM em tampão PBC 5,0 mM.

O número de varreduras foi variado de modo a se obter para cada amostra uma relação sinal/ruído adequada para a análise dos espectros. As integrais dos espectros, as alturas e as larguras de linhas foram obtidas utilizando-se o programa WINEPR, da Bruker.

3.6.8 Medida de parâmetros espectrais

O desdobramento hiperfino (a_N) foi medido integrando-se os espectros obtidos e medindo-se a distância entre os picos de absorção em Gauss (G) (Fig. 3.13).

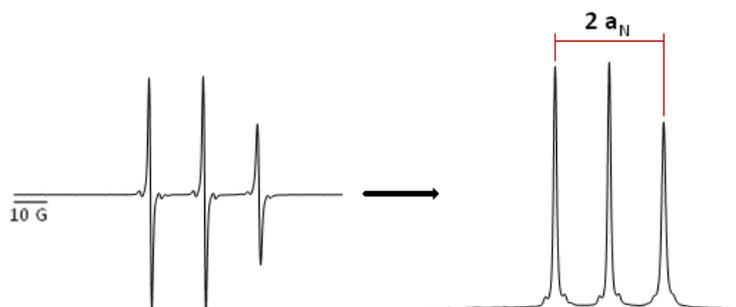


Figura 3.13. Ilustração da medida do desdobramento hiperfino.

Nos espectros do peptídeo contendo TOAC ligado a micelas ou bicamadas, e, portanto, tombando lentamente na escala de tempo do EPR, o desdobramento hiperfino foi obtido medindo-se $A_{||}$ e A_{\perp} (Fig. 3.12) e calculado por:

$$a_N = (A_{||} + 2A_{\perp})/3 \quad \text{Equação 3.16}$$

As larguras e as alturas das linhas dos espectros de EPR foram medidas identificando os pontos de máximo e mínimo das linhas de campo baixo (+1), campo central (0) e campo alto (-1). A altura das linhas foi obtida medindo-se o valor absoluto da intensidade pico-a-pico da linha (Fig. 3.14A). A largura das linhas foi obtida medindo-se o valor em Gauss da separação entre os pontos de máximo e mínimo da linha (Fig. 3.14B).

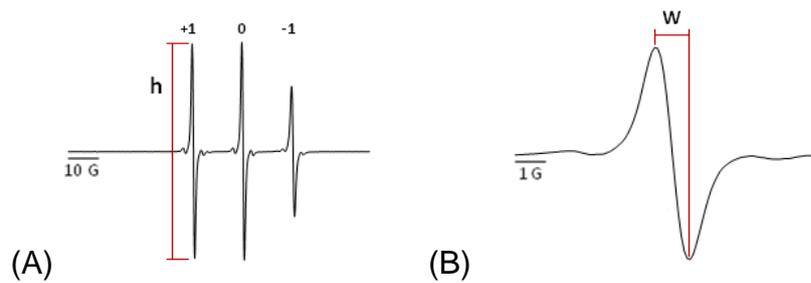


Figura 3.14. Ilustração da medida (A) das alturas e (B) larguras de linhas nos espectros de EPR.

3.6.9 Cálculo do coeficiente de partição e constante de ligação

Espectros com duas populações de marcadores de spin (no caso, uma população em água e outra ligada à membrana) permitem o cálculo do coeficiente de partição, definido por (Bianconi & Schreier, 1991):

$$P = \frac{[\text{marcador}]_M}{[\text{marcador}]_{H_2O}} = \frac{(\text{moles de marcador})_M / V_M}{(\text{moles de marcador})_{H_2O} / V_{H_2O}} \quad \text{Equação 3.17}$$

onde V_M e V_{H_2O} correspondem ao volume de membrana e o volume de água na amostra.

Considerando que o número de moles é proporcional à altura do pico nos espectros de EPR, a proporção entre as populações numa determinada concentração de lipídio é obtida por:

h_T - altura da linha de campo alto do espectro correspondente ao marcador de spin na ausência de membranas ou micelas; corresponde ao total moléculas da amostra em água.

h_{H_2O} - altura da linha de campo alto do espectro correspondente à população do marcador de spin em água quando a molécula se encontra na presença de membranas ou micelas.

$h_M = h_T - h_{H_2O}$ - corresponde à quantidade de moléculas ligadas a membranas ou micelas.

Vale notar que a concentração é proporcional à área do espectro, que é dada pela altura multiplicada pela largura ao quadrado da linha. Sendo assim, o emprego da medida das alturas para comparar concentrações somente pode ser feito entre

linhas que possuem a mesma forma, ou seja, a mesma largura. Por esse motivo, a estimativa da concentração do marcador na membrana, expressa por h_m , deve ser efetuada por meio da expressão $h_M = h_T - h_{H_2O}$, onde ambas as alturas são medidas para o marcador em meio aquoso (Bianconi & Schreier, 1991).

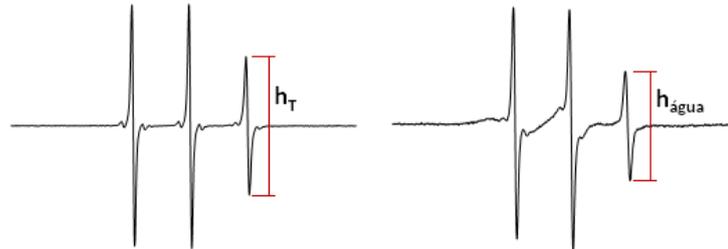


Figura 3.15. Medida das alturas h_T (tomada em um espectro do peptídeo na ausência de lipídios) e $h_{\text{água}}$ (tomada de um espectro na presença de lipídios apresentando duas populações, uma livre em água (linhas estreitas) e a outra ligada à membrana (linhas alargadas)). A varredura total nos espectros é de 100 G.

O volume de membrana, levando em conta que a densidade do lipídio é de praticamente 1 g/mL (Mason & Huang, 1978), é tomado como sendo numericamente igual à massa (m). No cálculo, m é a massa de lipídios em mg empregada para preparar 1 ml (1000 mg) de solução.

$$P = \frac{h_M / m}{h_{H_2O} / 1000} \quad \text{Equação 3.18}$$

A constante de ligação (K_b , M^{-1}) é então obtida multiplicando P pelo volume molar de lipídio em litros por mol (V'):

$$K_b = P \times V' \quad \text{Equação 3.19}$$

3.7 Espectroscopia de Fluorescência

Luminescência é a emissão de fótons na região do UV, visível ou infravermelho de qualquer substância e ocorre a partir de estados eletrônicos excitados. A fluorescência e a fosforescência são casos particulares de luminescência em que a excitação do elétron para um nível eletrônico de maior energia acontece por meio da absorção da energia de um fóton (Lakowicz, 2006). Substâncias que apresentam fluorescência significativa geralmente possuem elétrons deslocalizados em ligações duplas conjugadas.

Os fenômenos de fluorescência e fosforescência diferem na natureza do estado excitado. Na fosforescência temos a emissão de luz a partir de um elétron que decai de um estado eletrônico triplete T_1 excitado para um estado eletrônico fundamental singlete S_0 de mesma orientação de spin. Essa transição é proibida e as taxas de emissão são lentas (10^3 até 1 s^{-1}) de modo que o tempo de meia-vida das moléculas no estado excitado é da ordem de milissegundos a segundos (Lakowicz, 2006).

Na fluorescência a emissão de luz ocorre a partir de um elétron que decai de um estado eletrônico excitado singlete S_1 para um estado eletrônico fundamental singlete S_0 . O elétron no estado excitado singlete possui spin oposto (spins pareados) ao elétron que ocupa o orbital do estado eletrônico fundamental. Isso permite que o decaimento do elétron para o estado eletrônico fundamental ocorra rapidamente pela emissão de um fóton. As taxas de emissão são rápidas (10^8 s^{-1}) e o tempo de meia vida das moléculas fluorescentes no estado excitado é da ordem de nanossegundos (Lakowicz, 2006).

Uma vez excitada pela absorção de um fóton, a molécula pode retornar para seu estado fundamental por outras vias que não a fluorescência. As possibilidades são: conversão interna (retorno ao estado fundamental sem emissão de fóton); cruzamento intersistema (passagem do elétron de um estado excitado singlete para um estado excitado triplete); e processos fotofísicos intermoleculares (transferência intramolecular de carga e mudança conformacional na molécula). Interações intermoleculares também se apresentam como vias de desexcitação (Valeur, 2001).

As características da emissão de fluorescência de uma molécula: espectro de emissão (gráfico da intensidade de fluorescência pelo comprimento de onda ou número de onda), comprimento de onda de máxima emissão, tempo de vida do estado excitado, e rendimento quântico (razão entre o número de fótons emitidos e absorvidos) dependem da estrutura química da molécula, além de serem afetadas pelo microambiente no qual a molécula se encontra (Valeur, 2001). A emissão de fluorescência de uma molécula pode ser afetada por fatores extrínsecos como, entre outros, pH, polaridade, temperatura, presença de íons e presença de supressores de fluorescência (Valeur, 2001).

3.7.1 Diagrama de Jablonski

Os fenômenos de absorção e emissão fótons, e de conversão de energia que descrevem a fluorescência e a fosforescência são geralmente ilustrados pelo Diagrama de Jablonski (Fig. 3.16).

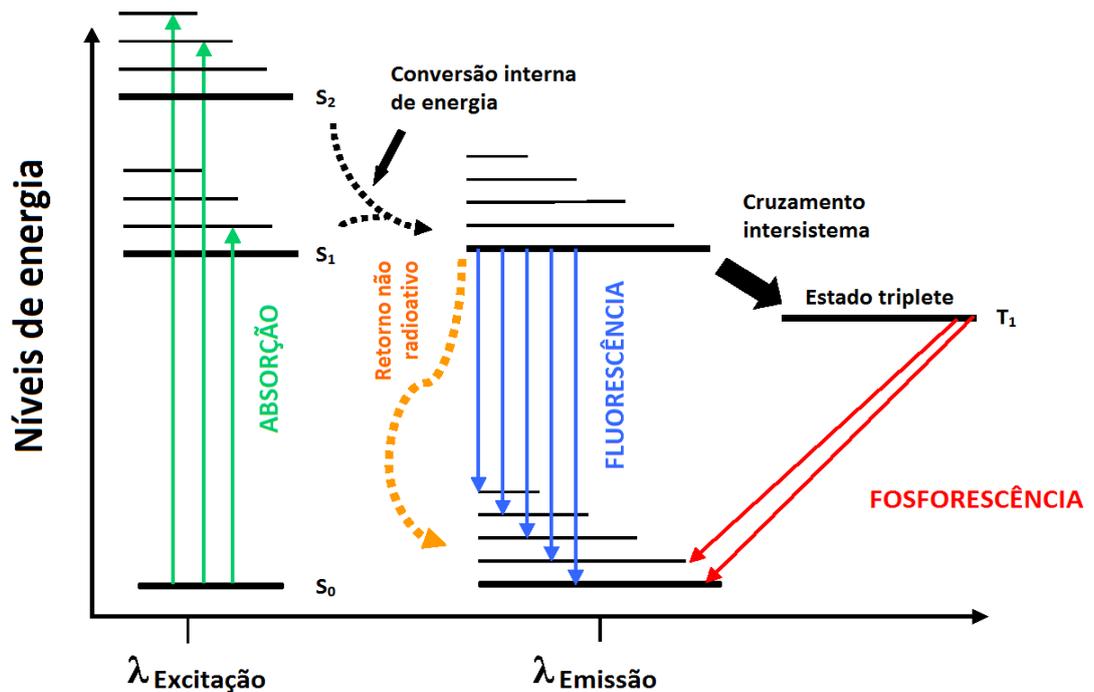


Figura 3.16. Diagrama de Jablonski.

Examinando o diagrama de Jablonski vemos que a energia dos fótons emitidos é sempre menor que a energia dos fótons absorvidos. Essa observação foi feita primeiramente por Sir George Gabriel Stokes, em 1852 (Lakowicz, 2006). A perda de energia entre a excitação e a emissão é observada para todas as moléculas em solução. A causa básica desse fenômeno é o rápido decaimento do elétron no estado eletrônico excitado para o nível vibracional mais baixo de S_1 . Além disso, os fluoróforos geralmente decaem para os níveis vibracionais de energia mais altos do estado eletrônico fundamental S_0 , também resultando em perda de energia por parte do fóton emitido (Lakowicz, 2006).

3.7.2 Supressão de fluorescência

A supressão da fluorescência refere-se a qualquer processo que resulte na diminuição da intensidade de fluorescência de uma dada substância. Essa

diminuição na intensidade da fluorescência pode ocorrer de diversas formas como reações do estado excitado, rearranjos moleculares, transferência de energia, interação com espécies paramagnéticas, formação de complexos do estado fundamental e supressão colisional (Lakowicz, 2006).

A supressão colisional ocorre quando o fluoróforo no estado excitado retorna ao estado fundamental ao entrar em contato com outra molécula em solução (molécula supressora). Nesse caso a supressão não passa de um fenômeno físico. As espécies, fluoróforo e supressor não são alterados quimicamente (Lakowicz, 2006).

A exposição de um fluoróforo ao seu supressor pode de analisada pela equação de Stern-Volmer (ref!)

$$F_0/F = 1 + k_{\text{SUP}} \tau_0 [\text{Sup}] = 1 + K_{\text{SV}} [\text{Sup}] \quad \text{Equação 3.20}$$

onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença do supressor, respectivamente, k_{SUP} é a constante de supressão por unidade de concentração, τ_0 é o tempo de vida do estado excitado do fluoróforo na ausência do supressor, $[\text{Sup}]$ é a concentração do supressor e K_{SV} é a constante de SternVolmer (Lakowicz, 2006). A curva obtida relacionando F_0/F com $[\text{Sup}]$, conhecida como curva de Stern-Volmer, tem como coeficiente angular da reta K_{SV} . O valor de K_{SV} informa quão acessível a molécula fluorescente é ao supressor; quanto menor o valor de K_{SV} menor a acessibilidade.

3.7.3 Red Edge Excitation Shift (REES)

O fenômeno de REES consiste no deslocamento do comprimento de onda de máxima emissão de um fluoróforo para o vermelho, em determinadas condições, ocasionado pelo aumento no comprimento de onda de excitação (Demchenko, 2002; Haldar *et al.*, 2011; Raghuraman *et al.*, 2007).

Essa abordagem possibilita monitorar o ambiente e a dinâmica ao redor de um fluoróforo pois o REES ocorre em decorrência das baixas velocidades de relaxação (reorientação) do solvente ao redor do estado excitado (Haldar *et al.*, 2011; Raghuraman *et al.*, 2007). O tempo de relaxação do solvente, por sua vez,

depende da mobilidade e da constante dielétrica das moléculas do solvente ao redor do fluoróforo.

Foi mostrado que em membranas, devido às diferenças de mobilidade das moléculas e da constante dielétrica ao longo do eixo normal à superfície da bicamada, a intensidade medida do fenômeno de REES varia em função da profundidade do fluoróforo na bicamada. A interface da bicamada, que possui características de mobilidade e constante dielétrica distintas da fase aquosa e do interior hidrocarbônico da bicamada, apresenta maior REES (Haldar *et al.*, 2011; Raghuraman *et al.*, 2007).

3.7.4 Estudos de supressão de fluorescência de lipídios contendo o fluoróforo NBD por N-TOAC-StII₁₁₋₃₀

Lipídios marcados com a sonda fluorescente NBD (Lip-NBD) são utilizados para monitorar diversos processos em membranas biológicas e modelo. Os estudos deste trabalho baseiam-se na capacidade de supressão da fluorescência de lipídios marcados com NBD em diferentes posições pelo grupamento nitroxido (Abrams & London, 1993) do resíduo de TOAC do peptídeo N-TOAC-StII₁₁₋₃₀. A marcação dos lipídios em diferentes posições permite a investigação da profundidade de penetração da extremidade N-terminal do peptídeo em bicamadas.

LUV contendo 1% de DPPE-NBD, PC-6-NBD ou PC-12-NBD foram preparadas como descrito acima em tampão PBC 0,5 mM para uma concentração final de 2,0 mM de lipídio total. Foram estudadas LUV de POPC:Lip-NBD (99:1), POPC:POPA:Lip-NBD (89:10:1) e DPPC:DMPA:Lip-NBD (89:10:1).

As LUV foram diluídas a 50 μ M e foram adicionadas alíquotas do peptídeo de modo a variar a concentração de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ de 0 até 60 μ M.

Foram obtidos espectros de emissão de fluorescência dos lipídios marcados com NBD entre 475 e 675 nm, excitando-se a amostra em 469 nm. A intensidade de fluorescência no comprimento de onda de máxima emissão corrigida para a diluição das amostras foi medida para as vesículas na ausência (F_0) e na presença de diferentes concentrações do peptídeo (F).

Para estudo da supressão de fluorescência em função da concentração de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀, analisou-se a razão F_0/F nas diferentes concentrações do peptídeo.

3.7.5 Estudos da posição real da sonda fluorescente NBD na bicamada

É relatado na literatura (Raghuraman *et al.*, 2007) que, devido ao caráter polar do grupo NBD e ao alto grau de liberdade experimentado por esse grupo em PC-6-NBD e PC-12-NBD, é possível que ocorra a dobra da cadeia carbônica de modo que o fluoróforo passe a localizar-se no ambiente das cabeças polares. Assim, as sondas em PC-6-NBD e PC-12-NBD passariam a não refletir o ambiente das cadeias carbônicas como esperado para tais posições.

Ainda, foi visto que o dobramento da cadeia carbônica e a exposição da sonda ao ambiente das cabeças polares dependem da organização dos lipídios na bicamada. Em bicamadas em fase fluida a passagem do NBD para o ambiente polar da interface ocorre com maior frequência em comparação a bicamadas em fase gel (Raghuraman *et al.*, 2007).

Para análise da profundidade real do fluoróforo NBD nos sistemas estudados contendo ácido fosfatídico foram realizados experimentos de REES.

Foram estudadas LUV de POPC:POPA:Lip-NBD (89:10:1), que se apresenta em fase fluida à temperatura ambiente. Também se estudaram LUV compostas por DPPC:Lip-NBD (99:1) e DPPC:DMPA:Lip-NBD (89:10:1), que se apresentam em fase gel à temperatura ambiente (Garidel *et al.*, 1997).

Foram obtidos espectros de emissão fluorescência, entre 500 e 600 nm, dos lipídios marcados com NBD, excitando-se a amostra em 465, 475, 485, 495 e 505 nm. O comprimento de onda de máxima emissão foi medido nos espectros obtidos, e estudado em função do comprimento de onda de excitação.

3.7.6 Estudos do movimento transmembranar de lipídios pelo poro toroidal

Para a realização desses estudos foi utilizado o lipídio DOPE-Pyr. Esse lipídio marcado com o grupo pireno, quando incorporado em alta concentração no ambiente da bicamada exibe um espectro de emissão de fluorescência com uma banda de menor intensidade ao redor de 465 nm. Tal emissão é decorrente da interação de uma molécula do lipídio marcado no estado excitado com uma no

estado fundamental e da transferência de energia entre elas (excímero) que ocorre com maior frequência nessa condição. Quando em baixa concentração na bicamada, o lipídio marcado apresenta um espectro de emissão de fluorescência com duas bandas estreitas nos comprimentos de onda em 375 e 395 nm. Essa emissão é característica da molécula isolada (monômero, não interagindo com outras moléculas do lipídio marcado) (Müller *et al.*, 2000).

O experimento consiste em marcar vesículas de forma assimétrica com DOPE-Pyr, totalizando 5% do total de lipídios na amostra, de modo que se observa majoritariamente no espectro de fluorescência dessas vesículas a emissão referente ao excímero (Fig. 3.17). A adição do peptídeo pode, por meio da formação de um poro toroidal, permitir que, por difusão lateral na região em que os lipídios encontram-se em curvatura positiva, o lipídio marcado e incorporado assimetricamente passe para o folheto interno da bicamada. Com a passagem das moléculas de DOPE-Pyr de um folheto a outro da bicamada ocorre a diluição do fluoróforo no volume total da bicamada e observa-se no espectro de emissão de fluorescência um aumento das bandas referentes ao monômero (Fig. 3.17) (Müller *et al.*, 2000).



Figura 3.17. Esquema de bicamadas contendo o lipídio com a sonda fluorescente incorporado de forma assimétrica (excímero predominante, linha cheia) e após a redistribuição nos dois folhetos em decorrência da ação de um agente externo (monômero predominante, linha pontilhada) (Müller *et al.*, 2000).

O fenômeno pode ser monitorado medindo a razão das intensidades de emissão do monômero e do excímero em função do tempo.

Foram preparadas LUV de POPC:POPA:SM (80:10:10) de concentração 2 mM em água. Uma alíquota de solução estoque do fosfolipídio marcado com pireno em etanol é adicionada à suspensão de LUV 200 μ M obtida anteriormente. O volume da alíquota é calculado de modo que a proporção de DOPE-Pyr na membrana seja de 5 mol % do lipídio total.

O fosfolipídio marcado é adicionado após a preparação completa das LUV para que seja incorporado assimetricamente apenas no folheto externo da bicamada. A incorporação é feita a 37°C e acompanhada em um espectrofluorímetro Hitachi F4500 (Hitachi, Japão). A incorporação é considerada completa quando as intensidades dos picos do monômero e do excímero do DOPE-Pyr permanecem constantes com o tempo.

Diluições seriadas dos peptídeos entre 40 e 2 μ M em água foram realizadas em uma placa de poliestireno “half-area” de 96 poços (Corning, NY, USA) para aquisição de medida em baixos comprimentos de onda.

O ensaio foi iniciado com a adição das LUV marcadas aos peptídeos em diferentes concentrações na placa. As medidas nos ensaios com os peptídeos foram realizadas em um leitor de placas (Molecular Devices, CA, EUA) excitando o fluoróforo em 344 nm e registrando a emissão em 490 nm em função do tempo por 25 minutos. Como controle negativo utilizaram-se apenas as LUV assimetricamente marcadas em água pH 7,0. O controle positivo consistiu de LUV preparadas paralelamente contendo 5% de DOPE-Pyr distribuído igualmente entre os dois folhetos da bicamada, referente a 100% de redistribuição.

A porcentagem de redistribuição foi calculada a partir da intensidade de emissão de fluorescência em 490 nm pela seguinte expressão:

$$\text{Red. (\%)} = 100 \times (F_{\text{NEG}} - F_{\text{PEP25}}) / (F_{\text{NEG}} - F_{\text{POS}}) \quad \text{Equação 3.21}$$

onde F_{PEP25} é a intensidade de emissão em 490 nm das amostras com os peptídeos 25 minutos após a adição das LUV, F_{NEG} e F_{POS} a intensidade de emissão dos controles negativo e positivo.

3.7.4 Estudos de atividade dos peptídeos em sistemas de membranas modelo por fluorescência

Os estudos de atividade permeabilizante dos peptídeos em sistemas de membranas modelo foram realizados como descrito em Alvarez *et al.*, 2003. Esse ensaio baseia-se na propriedade de autossupressão de fluorescência da carboxifluoresceína (CF) quando em altas concentrações e no alto rendimento quântico quando diluída.

Inicialmente os filmes lipídicos são ressuspensos em uma solução de CF 50 mM. Nessa concentração, grande parte das moléculas de CF, por meio de um mecanismo de transferência de energia da molécula no estado excitado para dímeros não fluorescentes da própria molécula (Chen & Knutson, 1988), passam do estado excitado para o estado fundamental sem emitir fótons.

A suspensão lipídica é extrusada para obtenção das LUV. Nessa etapa, a suspensão possui 50 mM de CF no compartimento interno das LUV e no meio externo. A CF não encapsulada é separada das LUV por um processo de cromatografia de exclusão em uma coluna de Sephadex G50 (Sigma-Aldrich Chemical Corporation, MO, EUA), equilibrada em tampão Tris-HCl 20 mM e 300 mM de NaCl, pH 8,2. A fluorescência da CF encapsulada é auto suprimida. Ao perturbar a bicamada, o peptídeo causa a liberação da CF para o meio externo. O fluoróforo, ao ser diluído no volume total da amostra, passa a emitir fluorescência.

A porcentagem de permeabilização foi obtida excitando-se em 490 nm e lendo a emissão de fluorescência a 520 nm em um leitor de placas (Molecular Devices, CA, EUA). Experimentos de vazamento foram realizados para diferentes concentrações de peptídeo em uma suspensão de LUV de composição lipídica variada de concentração 20 μ M. O máximo de vazamento (F_{MAX}) foi obtido lisando-se as LUV com 0,1% de Triton X-100.

A porcentagem de CF liberada (R%) foi obtida através da equação:

$$R\% = [(F_P - F_0) / (F_{MAX} - F_0)] \times 100 \quad \text{Equação 3.22}$$

onde F_0 e F_P são os valores de fluorescência inicial (antes da adição do peptídeo) e final (1 hora após a adição do peptídeo), e F_{MAX} é o valor de fluorescência máximo, obtido com a adição de 0,1% de Triton X-100.

3.8 SAXS

As medidas de SAXS foram realizadas na linha SAXS1 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas) pelo Professor Leandro Barbosa (IF-USP).

As medidas foram feitas utilizando-se um feixe de raios-X monocromático ($\lambda = 1,488 \text{ \AA}$) e com a distância entre a amostra e o detector ajustada para aproximadamente 975 mm. A radiação espalhada em baixo ângulo foi detectada usando um detector Pilatus bidimensional. As curvas de SAXS foram corrigidas levando-se em conta o espalhamento do tampão. As medidas foram realizadas em temperatura controlada por um banho térmico ajustado para 22°C.

As amostras foram preparadas dissolvendo LPC em pó previamente pesada em uma solução 2,0 mM de peptídeo de modo a se obter concentrações de lipídio de 20, 40 e 60 mM.

3.9 Atividade antimicrobiana

3.9.1 Concentração inibitória mínima (MIC)

Os ensaios para a determinação da concentração mínima de peptídeo necessária para inibir o crescimento bacteriano foram realizados de acordo com Wiegand et al., 2008. Quatro diferentes espécies de bactéria foram utilizadas para os ensaios, que foram realizados em triplicata.

Tabela 3.2 – Bactérias utilizadas nos ensaios de MIC:

<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25292
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Canada WT / HJ001
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212

Inicialmente, 10 mL de meio MHB foram inoculados com uma pequena quantidade de bactérias provenientes de uma única colônia depositada em uma placa de ágar sólido. As bactérias foram incubadas durante a noite em banho a 37°C e sob agitação.

A suspensão de células foi então diluída 50 vezes em meio MHB e incubada novamente a 37°C. Durante o crescimento, a densidade óptica do meio em 600 nm foi medida para monitoramento do crescimento bacteriano.

Ao atingir densidade óptica de aproximadamente 0,4, a suspensão de células foi novamente diluída 500 vezes em meio MHB. Nessa etapa, espera-se ter aproximadamente $5 \cdot 10^5$ CFU/mL, o valor ideal para realização do experimento. É aceitável, entretanto, que tal valor esteja entre 2 e $8 \cdot 10^5$ CFU/mL.

Paralelamente, diluições seriadas dos peptídeos em meio MHB foram preparadas com 10 vezes a concentração final desejada entre 128 e 1 μ M e um volume de 10 μ L. Ao final, 90 μ L da suspensão de células com concentração aproximada de $5 \cdot 10^5$ CFU/mL foram adicionados ao peptídeo e as placas foram incubadas por 18 horas a 37°C. Como controle negativo, meio MHB estéril foi utilizado e como controle positivo, foram utilizadas diluições das bactérias na concentração do ensaio sem os peptídeos.

Após esse período, o crescimento bacteriano foi verificado visualmente para determinação da concentração inibitória mínima.

Para verificação da concentração de células utilizadas no ensaio, uma diluição de 1:500 do meio contendo as células é feita em MgSO_4 10 mM e 100 μ L da suspensão são plaqueados em meio sólido ágar-LB. As placas são incubadas durante a noite e o número de colônias é contado para cálculo da concentração de células pela seguinte expressão:

$$\text{Concentração (CFU/mL)} = N_{\text{Colônias}} \times 500 / 0,1 \text{ mL} \quad \text{Equação 3.23}$$

Antibióticos de concentração inibitória mínima conhecida foram ensaiados conjuntamente para validação dos experimentos.

3.9.2 Cinética de crescimento bacteriano

A taxa de crescimento bacteriano na presença dos peptídeos foi investigada para estudo da influencia destes sobre a proliferação das bactérias gram-positiva *S. aureus* (ATCC 25923) e gram-negativa *E. coli* (ATCC 25292).

Inicialmente, 10 mL de meio MHB foram inoculados com uma pequena quantidade de bactérias proveniente de uma única colônia depositada em uma placa de ágar sólido. As bactéria foram incubadas durante a noite em banho a 37°C e sob agitação.

A suspensão de células foi então diluída 50 vezes em meio MHB e incubada novamente a 37°C. Durante o crescimento, a densidade óptica do meio em 600 nm foi medida para monitoramento do crescimento bacteriano até atingir densidade óptica de aproximadamente 0,1.

Em uma placa de 96 poços de poliestireno de fundo chato (Greiner Bio-One, Alemanha), diluições seriadas dos peptídeos em meio MHB foram preparadas com 10 vezes a concentração final desejada entre 128 e 1 μM e um volume de 10 μL . Em seguida, 90 μL da suspensão celular de densidade óptica 0,1 foram adicionados em cada poço e as placas foram incubadas a 37°C. Como controle negativo, meio MHB estéril foi utilizado e como controle positivo, foram utilizadas preparações das bactérias na mesma concentração do ensaio sem os peptídeos.

Utilizando um leitor de placas (Molecular Devices, CA, EUA), a densidade óptica em 600 nm da suspensão foi medida em intervalos de 40 minutos até 2 horas de experimento, e posteriormente em intervalos de 1 hora até um total de 6 horas de experimento.

3.10 Ensaio de toxicidade dos peptídeos

3.10.1 Atividade hemolítica

Ensaio de atividade hemolítica dos peptídeos foram realizados a fim de estudar a toxicidade dos mesmos e comparar o grau de atividade dos diversos fragmentos.

Cinco mililitros de sangue obtido de voluntários saudáveis foram misturados com 40 mL de solução salina estéril (0,9% NaCl em água), centrifugados por 10 minutos a 1500 rotações por minuto (rpm), equivalente a 500 g. O sobrenadante foi então removido. Esse processo da lavagem das células foi realizado três vezes até que o sobrenadante estivesse limpo após a centrifugação.

Em seguida, 2 mL do pellet de hemácias foram misturados com 8 mL de solução salina, resultando numa suspensão de 20% em volume de células.

Uma placa de polipropileno de 96 poços (Corning, NY, EUA) foi previamente preparada com diluições seriadas do peptídeo em solução salina com concentrações entre 128 e 2 μ M e um volume final de 50 μ L. Para o ensaio, 50 μ L da suspensão de hemácias a 20% foram adicionados em cada poço na placa contendo as diluições dos peptídeos para um volume final de hemácias de 10%. Como controle negativo usou-se solução salina estéril, e como controle positivo, Triton X-100 a 0,1%.

As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C e ao final centrifugadas a 1200 rpm (400 g) por 10 minutos. O sobrenadante contendo a hemoglobina liberada pela ação dos peptídeos foi diluído 5 vezes em uma placa poliestireno de 96 poços de fundo chato (Greiner Bio-One, Áustria). A absorbância em 414 e 546 nm foi então medida em um leitor de placas Synergy HT (Bio-Tek, VT, EUA).

A porcentagem de hemólise foi calculada baseada na absorbância medida pela seguinte expressão:

$$\text{Ativ. Hem. (\%)} = 100 \times (A_{\text{PEP}} - A_{\text{NEG}}) / (A_{\text{POS}} - A_{\text{NEG}}) \quad \text{Equação 3.24}$$

onde A_{PEP} , A_{NEG} e A_{POS} referem-se às absorbâncias da amostra com o peptídeo, e dos controles positivo e negativo respectivamente.

3.10.2 Atividade contra células eucarióticas HeLa

A citotoxicidade dos peptídeos contra células HeLa WT foi estimada por meio do ensaio de viabilidade celular. A atividade metabólica das células foi medida utilizando-se um kit CellTiter 96[®] AQ One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, WI, EUA). O teste baseia-se na capacidade de enzimas oxidoredutases de células viáveis converterem o sal MTS em um produto, formazan, solúvel no meio de

cultura, cuja absorvância medida em 490 nm é diretamente proporcional à viabilidade celular (Fig. 3.18).

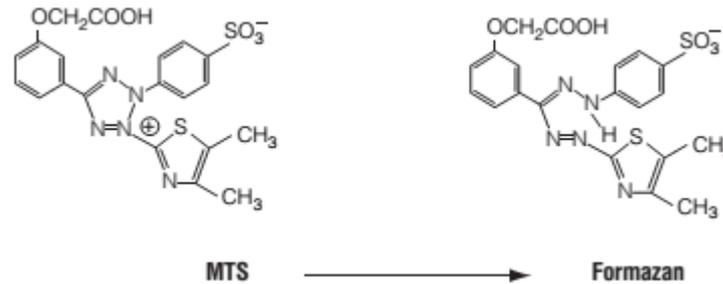


Figura 3.18. Reação de conversão do MTS em formazan.

O dano na membrana plasmática de células HeLa WT pela ação dos peptídeos foi estimado por meio de um ensaio de permeabilidade da enzima lactato desidrogenase utilizando o kit CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, WI, EUA). O teste colorimétrico baseia-se na reação na redução de NAD^+ (dinucleótido de nicotinamida e adenina) a NADH, catalisada pela enzima LDH e na oxidação de NADH por um sal de tetrazólio (INT) que é então convertido em um produto formazan (Fig 3.19). A absorvância do formazan em 490 nm é diretamente proporcional ao número de células lisadas.

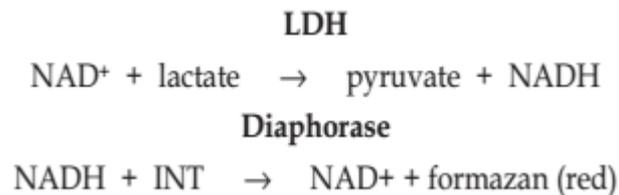


Figura 3.19. Reações envolvendo a lactato desidrogenase e a formação do produto colorimétrico formazan.

3.10.2.1 Cultura de células HeLa WT

As células HeLa WT foram cultivadas em meio DMEM (Invitrogen, MA, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino e 1% dos antibióticos penicilina/estreptomicina.

Inicialmente, alíquotas de aproximadamente 1 mL e 10^6 células estocadas em nitrogênio líquido foram descongeladas e, junto com 3 mL de meio DMEM, passadas para uma garrafa para cultura de células. As células, que crescem aderidas à superfície da garrafa foram então incubadas a 37°C em uma atmosfera umidificada e com 5% de CO_2 . Durante o crescimento, o meio das células foi trocado diariamente.

Ao alcançar entre 90 e 100% de confluência, o meio foi retirado e as células aderidas foram lavadas com entre 3 e 5 mL de PBS (Invitrogen, MA, EUA) por três vezes. Em seguida, 2 mL de tripsina foram adicionados e as garrafas foram incubadas por 10 minutos a 37°C para que as células fossem ressuspensas e coletadas. O total de células foi então dividido e adicionado em duas ou mais garrafas junto com meio DMEM para aderirem novamente à superfície do plástico mantendo a cultura de células.

A confluência, a integridade das células bem como a adesão e ressuspensão das mesmas foram checadas em um microscópio óptico com aumentos de 10 e 100 vezes.

3.10.2.2 Contagem das células e preparação das placas para os ensaios

Para realização dos ensaios de toxicidade e permeabilidade da membrana, células HeLa WT com ao menos três passagens foram coletadas, diluídas em meio DMEM e tiveram a concentração determinada em um leitor Z2 Coulter Counter (Beckman, CA, USA). Em seguida, as células foram diluídas para uma concentração de $2,5 \cdot 10^5$ células/mL e 200 μ L da suspensão foram adicionados em cada poço de uma placa de poliestireno de 96 poços (Greiner Bio-one, Áustria), totalizando $5 \cdot 10^4$ células/poço. As placas foram então incubadas por 24 horas para adesão das células nas mesmas condições das garrafas de cultura.

3.10.2.3 Exposição das células aos peptídeos

Depois de checadas a integridade e adesão das células, o meio DMEM foi retirado e as células lavadas duas vezes com 100 μ L por poço de PBS. Em seguida foram adicionados 100 μ L por poço de diluições seriadas entre 128 e 2 μ M dos peptídeos em meio DMEM. Triton X-100 0,1% foi usado como controle positivo (0% de viabilidade para MTS e 100% de permeabilidade de LDH) e meio DMEM como controle negativo.

As células expostas a diferentes concentrações dos peptídeos foram incubadas a 37°C em uma atmosfera umidificada e com 5% de CO₂ durante 4 horas.

3.10.2.4 Ensaio de viabilidade celular

Para verificação da viabilidade celular, 20 μ L do reagente MTS foi adicionado em cada poço contendo as células previamente expostas aos peptídeos. As placas foram incubadas por mais uma hora e a absorbância de cada poço medida em 490 nm.

A porcentagem de viabilidade celular foi calculada com base nos controles positivo (0%, A_{POS}) e negativo (100%, A_{NEG}).

$$\text{Viab. Cel. (\%)} = 100 \times (A_{POS} - A_{PEP}) / (A_{POS} - A_{NEG}) \quad \text{Equação 3.25}$$

3.10.2.5 Ensaio de integridade da membrana celular

As placas para o ensaio de permeabilidade celular foram, após o período de incubação de 4 horas, centrifugadas por 4 minutos a 250 g e 50 μ L do sobrenadante de cada poço transferidos para a placa de reação.

A cada poço foram adicionados 50 μ L do substrato reconstituído em tampão fornecido no kit utilizado. A placa foi incubada à temperatura ambiente por 10 minutos para processamento da reação até a adição de 50 μ L da solução de ácido acético 1 M para parada da reação.

A porcentagem de permeabilização da membrana celular foi calculada com base nos controles positivo (100%, A_{POS}) e negativo (0%, A_{NEG}).

$$\text{Permeab. (\%)} = 100 \times (A_{PEP} - A_{NEG}) / (A_{POS} - A_{NEG}) \quad \text{Equação 3.26}$$

3.11 Modelagem estrutural dos peptídeos *in silico*

3.11.1 Geração dos modelos estruturais

Modelos tridimensionais dos peptídeos foram obtidos por meio da plataforma on-line PEP-FOLD (<http://mobyli.e.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py#forms::PEP-FOLD>) (Maupetit et al., 2009, 2010; Shen et al., 2014).

Fornecendo-se a sequência a ser estudada, a plataforma inicialmente realiza uma predição local da conformação baseada em um alfabeto estrutural descrevendo a probabilidade de cada conjunto de 4 resíduos consecutivos na sequência adotarem uma determinada conformação. O perfil das predições para cada fragmento

de quatro resíduos é então processado para seleção de um número limitado de conformações possíveis. O software então combina os fragmentos calculados para produzir um modelo completo da estrutura. Cinquenta simulações do tipo “coarse-grained” são realizadas substituindo as cadeias laterais por esferas de propriedades correspondentes. Os modelos são pós-tratados substituindo as esferas por cadeias laterais contendo todos os átomos e um procedimento de minimização energética realizado com GROMACS com os modelos contendo todos os átomos. Um grupo com as cinco estruturas de menor energia é então apresentado em arquivos no formato .pdb.

3.11.2 Comparação estrutural entre os modelos obtidos e estruturas obtidas experimentalmente

As cinco estruturas obtidas do PEP-FOLD foram superpostas à estrutura de StI obtida por NMR (Castrillo et al., 2010) ou de StII obtida por cristalografia de raios-X (Mancheño et al., 2003) utilizando o software UCSF Chimera (Pettersen et al., 2009 - <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>). Os modelos dos peptídeos exibindo menores desvios em relação à estrutura experimental (RMSD) foram selecionados para posterior análise. A parte gráfica dos resultados foi feita com os softwares PyMol Educational Version 1.3 (<https://www.pymol.org/>) e Visual Molecular Dynamics 1.9.2 (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/vmd-1.9.2/>).

4. Resultados

4.1 Peptídeos

A pureza e identidade dos peptídeos sintetizados foram checadas por HPLC-UV/Vis-MS. Os cromatogramas com a absorção em 234 nm, do máximo de absorção entre 200 e 800 nm, e com a contagem de íons mostram que o peptídeo StII₁₋₁₀ apresenta um tempo de retenção de 2,56 minutos e alto grau de pureza (Fig. 4.1). O espectro de massa das espécies eluídas entre 2,52 e 2,79 minutos apresenta um pico maior intensidade com razão m/z de 856,33, confirmando a identidade do peptídeo de massa 856,0 Da (Fig. 4.1).

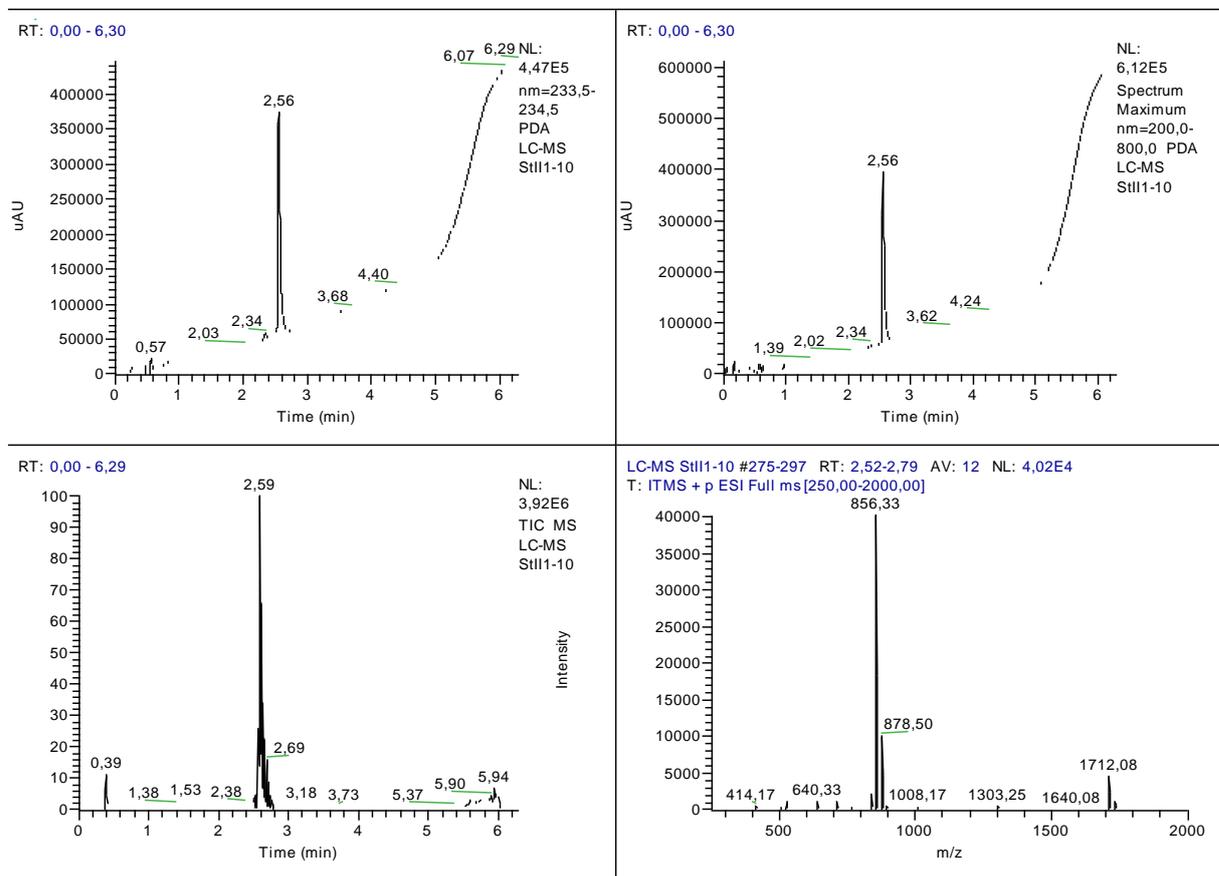


Figura 4.1. Cromatogramas do peptídeo StII₁₋₁₀ reportando intensidade em 234 nm (superior esquerdo), intensidade máxima entre 200 e 800 nm (superior direito) e contagem de íons (inferior esquerdo) e espectro de massa do pico de maior intensidade (inferior direito).

A identificação dos diferentes íons moleculares (M+1, M+2 e M+3) dos peptídeos foi feita a partir da análise das distâncias entre os picos dos diferentes isótopos apresentando uma unidade de massa de diferença. A carga da espécie

ionizada pode ser determinada pela distância entre os picos dos isótopos como sendo numericamente igual ao inverso da distância entre os picos:

$$Z = 1 / \text{Distância entre os picos} \quad \text{Equação 4.1}$$

A análise das distâncias entre os picos dos isótopos no espectro de massa confirma o pico como sendo a forma M+1. A presença de uma espécie de razão m/z de 878,5 Da, refere-se a uma forma contendo um átomo de sódio neutralizando uma carga negativa.

O peptídeo StI₂₀₋₃₁ apresentou alto grau de pureza e tempo de retenção de 2,17 minutos, como mostram os cromatogramas de absorção e de contagem de íons (Fig. 4.2). A identidade do peptídeo de massa 1312,6 Da foi confirmada pelos picos de razão m/z de 1312,83, confirmado como M+1 pela distância entre os picos dos isótopos, e de 657,00, referente à forma M+2 (Fig 4.2).

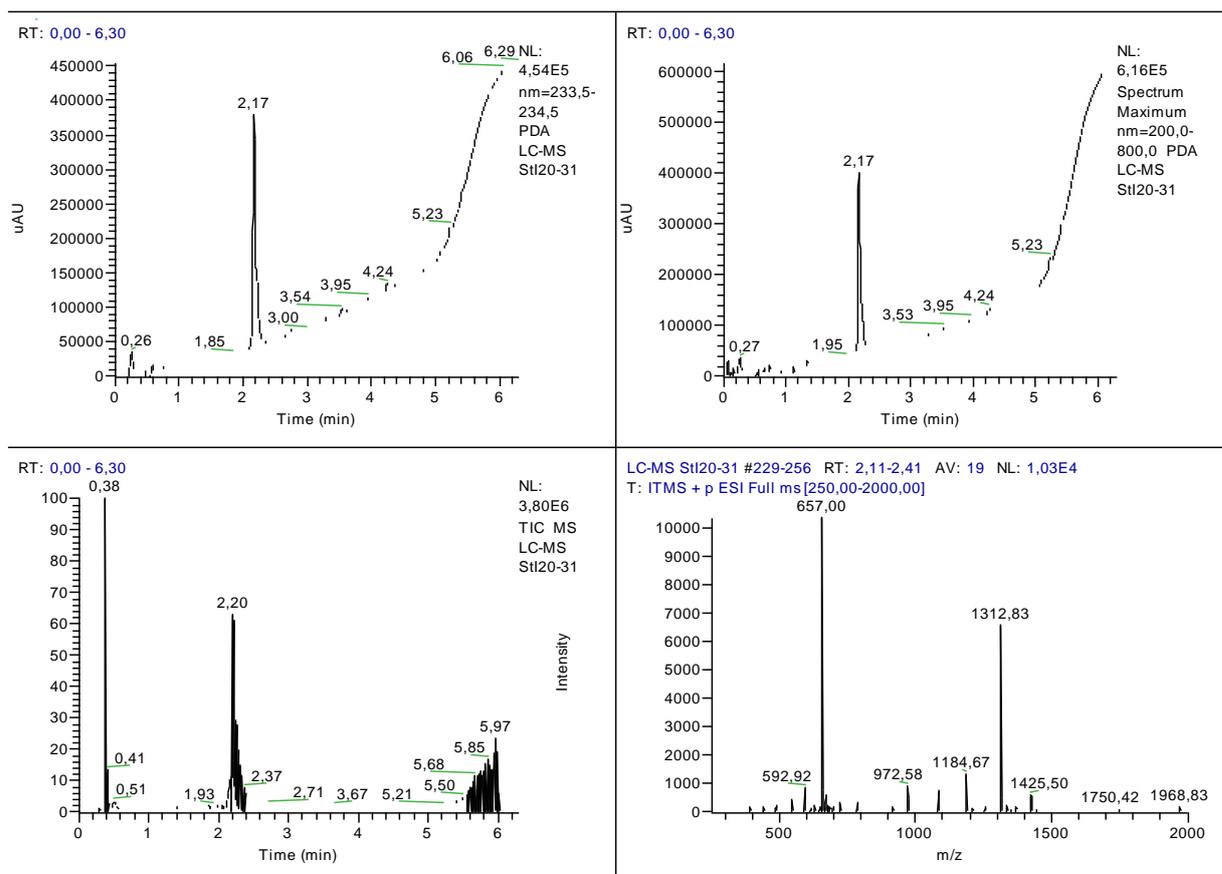


Figura 4.2. Cromatogramas do peptídeo StI₂₀₋₃₁ reportando intensidade em 234 nm (superior esquerdo), intensidade máxima entre 200 e 800 nm (superior direito) e contagem de íons (inferior esquerdo) e espectro de massa do pico de maior intensidade (inferior direito).

O peptídeo Stl₂₀₋₃₁E24A, de massa 1254,6 Da, apresentou tempo de retenção de 2,17 minutos e grau de pureza satisfatório (Fig 4.3). Picos de razão m/z 1254,75 e 628,00 no espectro de massa do material eluído entre 2,09 e 2,38 minutos foram confirmados como correspondentes às formas M+1 e M+2 do peptídeo sintetizado (Fig. 4.3).

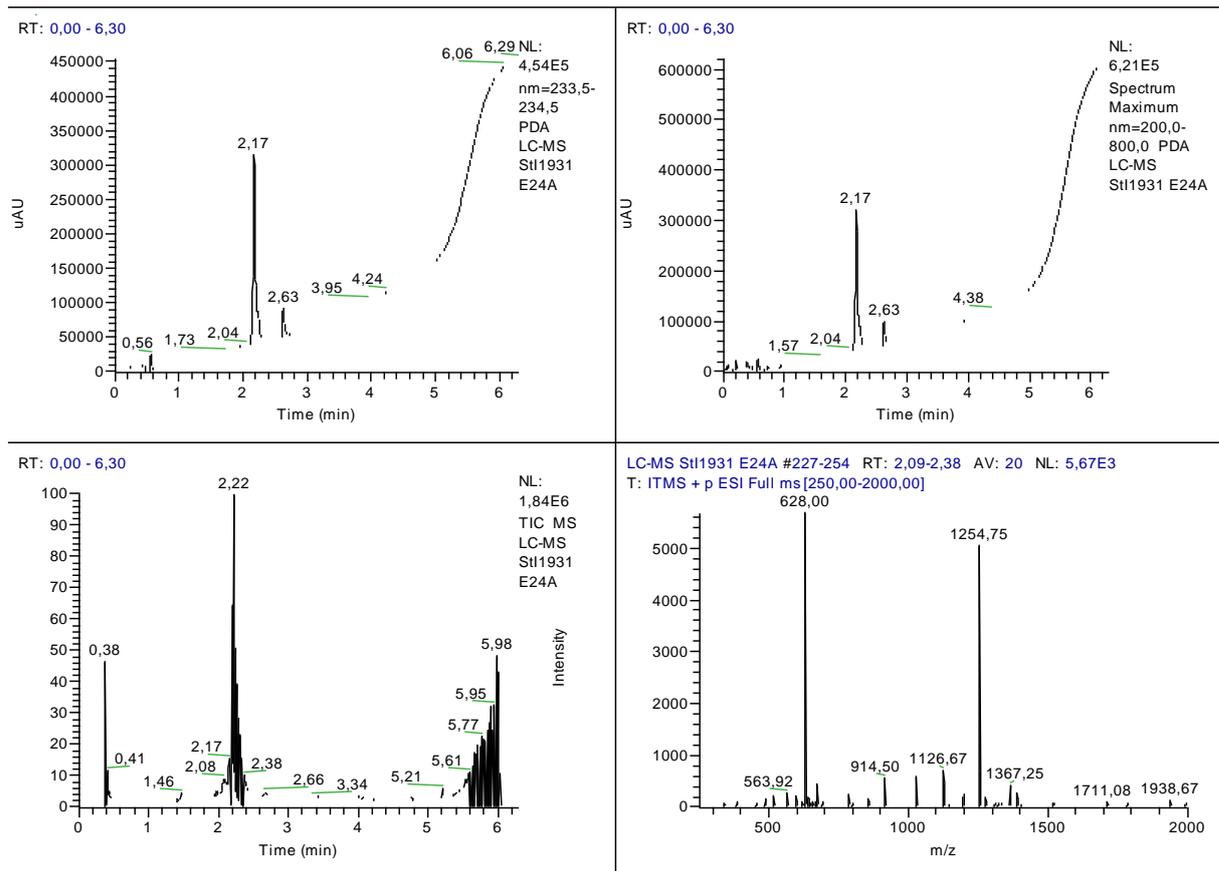


Figura 4.3. Cromatogramas do peptídeo Stl₂₀₋₃₁ E24A reportando intensidade em 234 nm (superior esquerdo), intensidade máxima entre 200 e 800 nm (superior direito) e contagem de íons (inferior esquerdo) e espectro de massa do pico de maior intensidade (inferior direito).

O análogo Stl₂₀₋₃₁E24K sintetizado com uma lisina substituindo o ácido glutâmico na posição 24, apresentou grau de pureza satisfatório como é possível observar nos cromatogramas que apresentam um único pico com tempo de retenção 2,00 minutos (Fig 4.4). O espectro de massa do material eluído entre 1,95 e 2,22 minutos apresenta picos de razão m/z 1311,75 e 656,00 (Fig 4.4), confirmados pela análise da distância entre os isótopos como as forma M+1 e M+2 de Stl₂₀₋₃₁E24K, que possui uma massa calculada de 1311,7 Da.

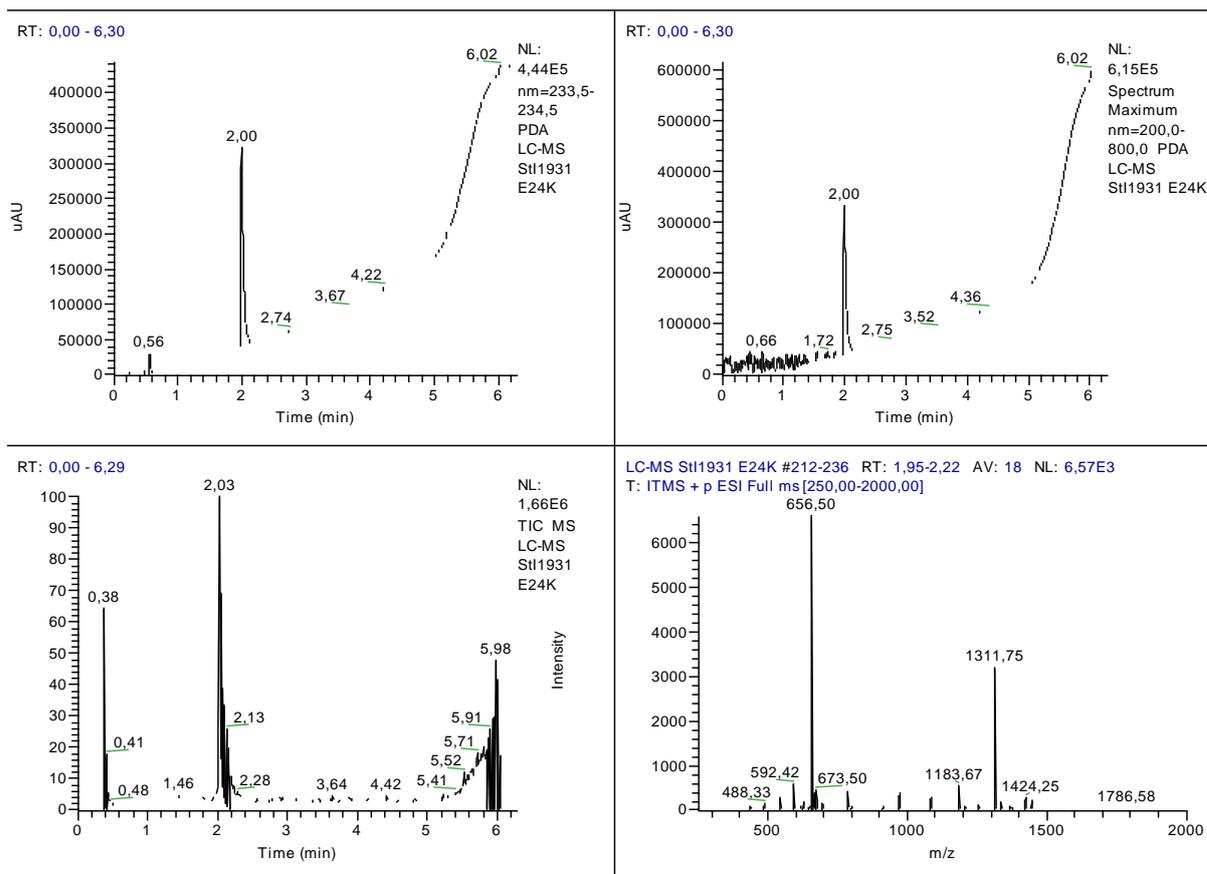


Figura 4.4. Cromatogramas do peptídeo Stl₂₀₋₃₁ E24K reportando intensidade em 234 nm (superior esquerdo), intensidade máxima entre 200 e 800 nm (superior direito) e contagem de íons (inferior esquerdo) e espectro de massa do pico de maior intensidade (inferior direito).

O peptídeo Stl₂₀₋₃₁E24Q foi analisado e apresentou alto grau de pureza como mostrado nos cromatogramas, contendo apenas um pico com tempo de retenção de 2,08 minutos (Fig. 4.5). Os picos de razão m/z 1311,75 e 656,50 no espectro de massa das espécies eluídas entre 2,00 e 2,36 minutos foram confirmados como correspondendo às formas M+1 e M+2 pela análise dos isótopos e referem-se ao peptídeo sintetizado, que possui massa calculada de 1311,6 Da (Fig 4.4).

Os peptídeos obtidos na UNESP-Araraquara também tiveram identidade e pureza analisadas e confirmadas pelo mesmo protocolo usado na análise dos peptídeos por nós sintetizados. Os valores de tempo de retenção e das razões m/z dos picos nos espectros de massa estão listados na Tabela 4.1.

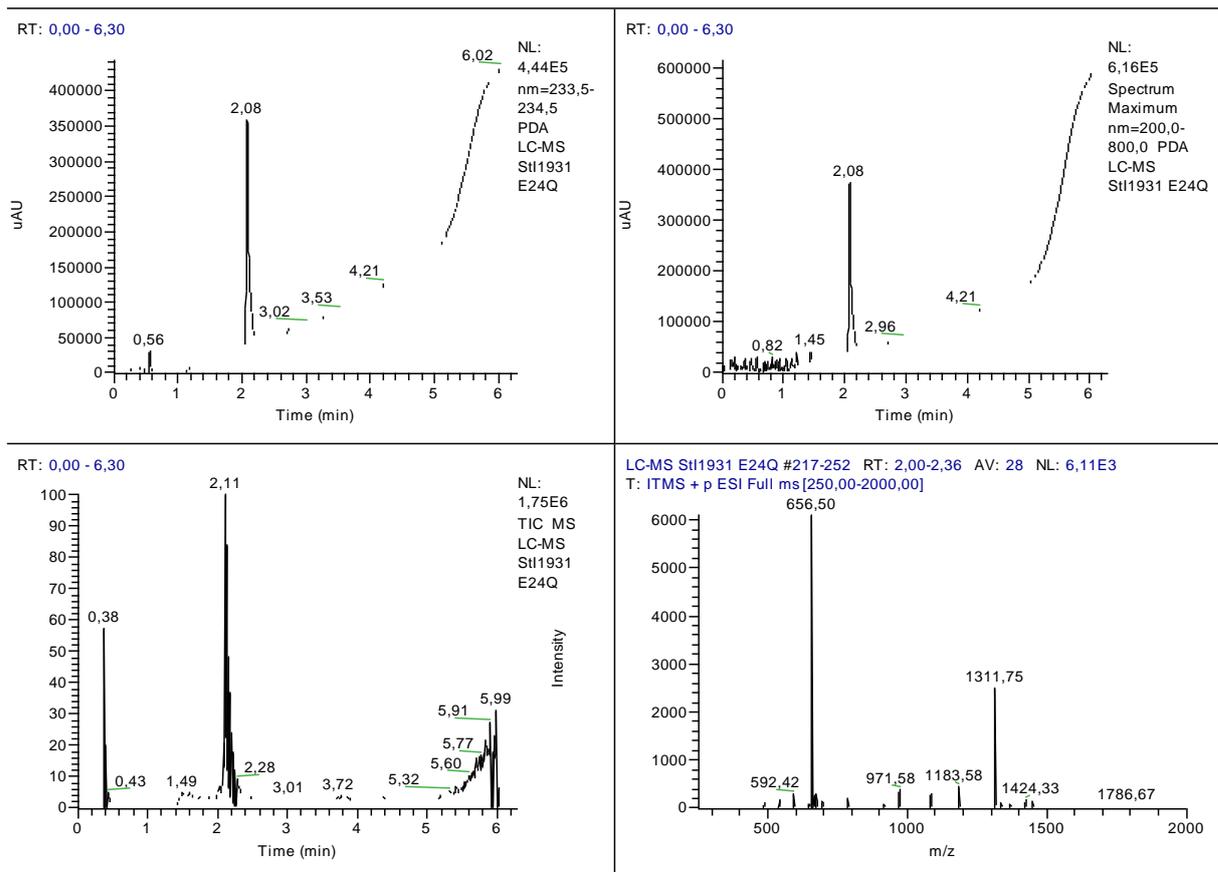


Figura 4.5. Cromatogramas do peptídeo Stl₂₀₋₃₁ E24Q reportando intensidade em 234 nm (superior esquerdo), intensidade máxima entre 200 e 800 nm (superior direito) e contagem de íons (inferior esquerdo) e espectro de massa do pico de maior intensidade (inferior direito).

Tabela 4.1 – Massa molecular calculada (MM), razão m/z dos íons nos espectros de massa e tempo de retenção dos peptídeos estudados.

Peptídeo	MM (Da)	Razão m/z			Tempo de retenção (minutos)
		M+1	M+2	M+3	
Stl ₁₋₃₁	3245,7	--	1623,25	1082,75	4,67
Stl ₁₂₋₃₁	2217,6	--	1109,58	740,17	3,82
Stll ₁₋₃₀	3127,7	--	1564,25	1043,33	4,91
Stll ₁₁₋₃₀	2288,7	--	1145,00	763,83	3,89
Stll ₁₋₁₀	856,0	856,33	--	--	2,56
Stl ₂₀₋₃₁	1312,6	1312,83	657,00	--	2,17
Stl ₂₀₋₃₁ E24A	1254,6	1254,75	628,00	--	2,17
Stl ₂₀₋₃₁ E24K	1311,7	1311,75	656,50	--	2,00
Stl ₂₀₋₃₁ E24Q	1311,6	1311,75	656,50	--	2,08
N-TOAC-Stll ₁₁₋₃₀	2485,7	--	1243,58	829,50	4,03

Os peptídeos Stl₁₋₃₁ e Stll₁₋₃₀ apresentam maiores tempo de retenção pois são capazes de estabelecer maior número de interações com a fase estacionária hidrofóbica C18 quando comparados com os análogos mais curtos. Apesar de possuir carga líquida neutra em pH 7 e um resíduo a mais, Stl₁₋₃₁ apresenta menor tempo de retenção do que Stll₁₋₃₀. Essa diferença deve-se à presença de um resíduo polar de serina na posição 1 e à presença de resíduos de ácido glutâmico e ácido aspártico nas posições 2 e 9 de Stl₁₋₃₁. Essas substituições conferem ao segmento 1-10 de Stl um caráter mais polar em comparação com Stll, além uma maior distribuição ao de cargas ao longo da molécula e, portanto, uma menor interação com a fase estacionária.

A diferença de hidrofobicidade entre as sequências de Stl e Stll não reside somente na região 1-10 das toxinas. A comparação entre os tempos de retenção de Stl₁₂₋₃₁ e Stll₁₁₋₃₀ também indica que essa região em Stll é mais hidrofóbica (Tabela 4.1).

A comparação entre Stll₁₁₋₃₀ e de N-TOAC-Stll₁₁₋₃₀ indica uma maior hidrofobicidade do análogo contendo TOAC embora a diferença nos tempos de retenção seja pequena (Tabela 4.1). O fato de possuir um resíduo a mais e apresentar o grupamento amino terminal desprotonado, proporcionando ao peptídeo carga líquida +1, determinam a maior hidrofobicidade do peptídeo marcado em relação ao nativo.

Em Stl₂₀₋₃₁ e seus análogos, a alta densidade de cargas positivas no segmento e o número de resíduos determinaram os baixos tempos de retenção observados (Tabela 4.1). Entre os peptídeos Stl₂₀₋₃₁ e Stl₂₀₋₃₁E24A, a substituição de um resíduo de ácido glutâmico por alanina não afetou o tempo de retenção em relação à sequência nativa (Tabela 4.1). A introdução de um resíduo de caráter hidrofóbico compensa o aumento na carga líquida da molécula de forma que ambos, Stll₂₀₋₃₁ e o análogo E24A, apresentam os mesmos tempos de retenção. As substituições nos peptídeos E24Q e E24K diminuíram o tempo de retenção destes na coluna quando comparados com Stl₂₀₋₃₁. Como esperado, o mutante E24K, com carga líquida +6, apresentou menor tempo de retenção em relação ao mutante E24Q que em pH 7 possui carga líquida +5 (Tabela 4.1).

4.2 Estudos conformacionais *in silico*

4.2.1 Predição de estrutura secundária

As predições de estrutura dos peptídeos obtidas pelos programas Psipred e PEPFOLD mostraram-se de acordo com o esperado para tais segmentos, que nas toxinas apresentam predominantemente estrutura secundária em α -hélice.

Stl₁₋₃₁, segundo Psipred, apresenta um alta propensão de aquisição de estrutura helicoidal entre os resíduos 12 e 26 e uma região não estruturada no segmento 1-11, predita, entretanto, com um menor nível de confiabilidade (Fig. 4.6A). O mesmo perfil estrutural foi predito pelo programa PEPFOLD onde o segmento 13-24 apresentou alta propensão de aquisição de conformação em α -hélice, e o segmento 1-12 apresentou estrutura predominantemente randômica (Fig. 4.6A). Tal predição indica também alguma tendência da região 1-8 de adquirir estrutura helicoidal. Esse motivo estrutural de duas hélices ligadas por um segmento flexível foi observado experimentalmente por NMR (Castrillo et al., 2010) (Fig. 4.6A).

De acordo com o observado para o peptídeo de Stl contendo 31 resíduos, ambos, Psipred e PEPFOLD, indicam uma alta propensão de aquisição de estrutura helicoidal para o peptídeo Stl₁₂₋₃₁ (Fig. 4.6B). Por se tratarem de algoritmos que calculam a possível estrutura de um determinado resíduo baseado somente nos resíduos próximos, era de se esperar que a estrutura predita de Stl₁₂₋₃₁ concordasse com o obtido para o segmento na sequência de Stl₁₋₃₁ (Figs. 4.6A e 4.6B). Entretanto, é possível que em Stl₁₋₃₁ o segmento 1-10 exerça alguma influencia sobre a estrutura do resto do peptídeo, não observável nos estudos de predição.

Para os peptídeos de StII, StII₁₋₃₀ e StII₁₁₋₃₀, foram preditas estruturas semelhantes às dos peptídeos de StI. Em ambos a região entre os resíduos 14 e 25 apresenta uma alta propensão de aquisição de conformação helicoidal, como predito por Psipred e PEPFOLD (Figs. 4.6C e 4.6D).

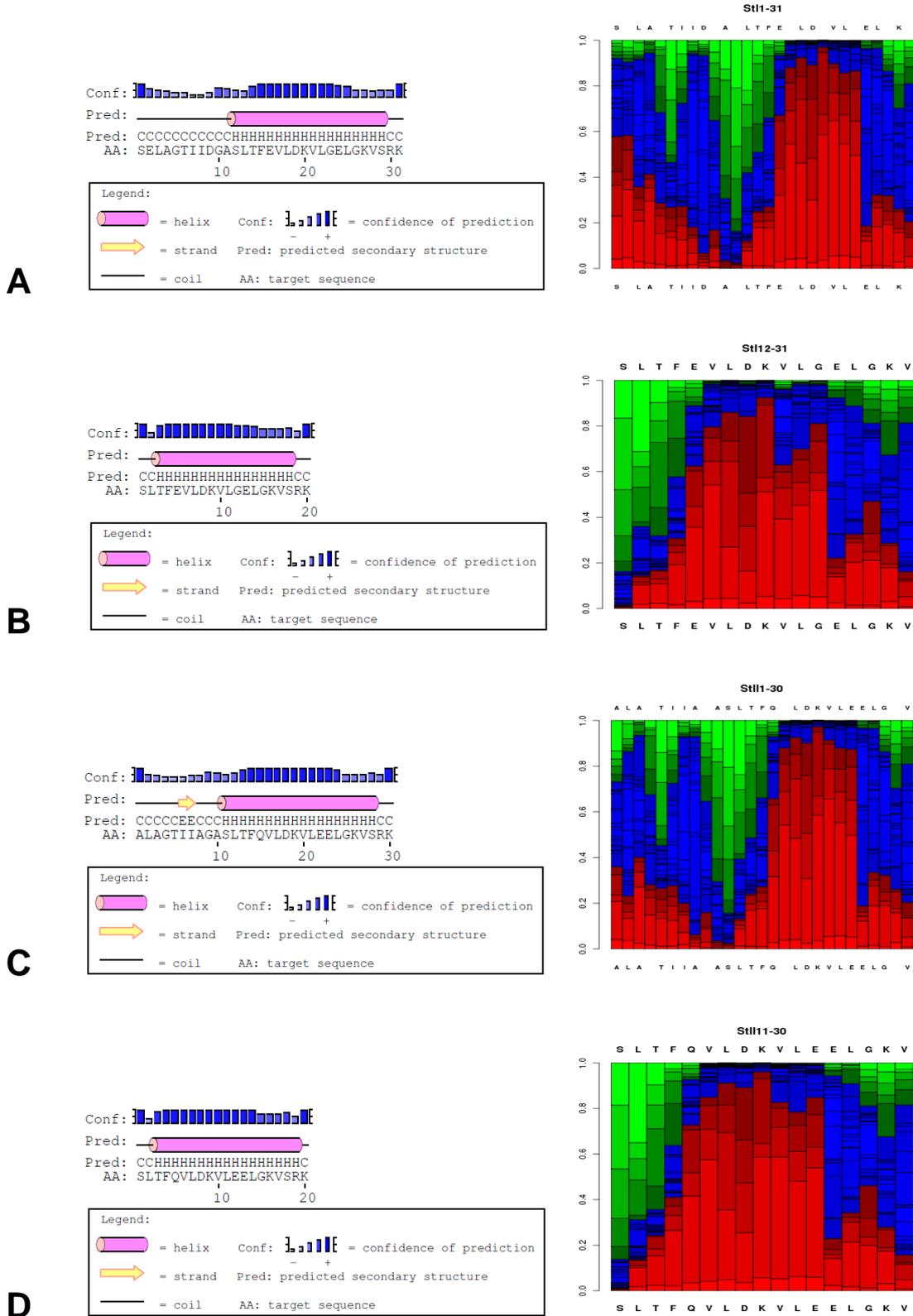


Figura 4.6. Predição de conformação dos peptídeos obtida pelos programas Psipred (esquerda) e PEPFOLD (direita), onde  α-hélice,  não estruturado e  estendido. (A) Stl₁₋₃₁, (B) Stl₁₂₋₃₁, (C) Stl₁₁₋₃₀, (D) Stl₁₁₋₃₀.

Para StII₁₋₃₀, Psipred predisse a região 1-10 do peptídeo como predominantemente desestruturada, com a presença de dois resíduos apenas em fita-β (Fig. 4.6C). Embora predita com baixa confiabilidade, a presença de estrutura em fita-β concorda com estudos da toxina StII nos quais foi observada a presença dos resíduos 6-8 em tal conformação (Mancheño et al., 2003). Ainda, foi observada a tendência de formação de estruturas do tipo fita-β em estudos de StII₁₋₃₀ em função da concentração de peptídeo e do pH por CD (Casallanovo et al., 2006).

StII₁₋₃₀, segundo PEPFOLD, apresenta certa tendência de estruturação em hélice na região do segmento 1-8 indicando que este poderia adotar o mesmo motivo observado experimentalmente em StI₁₋₃₁ (Fig 4.6A e 4.6C).

Por meio do software Psipred também foi possível prever características da interação e topologia dos segmentos de 31 e 30 resíduos de StI e StII na membrana. O algoritmo MEMSAT-SVM, apesar de levar em conta outros fatores não referentes à interação em questão, foi capaz de prever ambos os peptídeos como hélices transmembranares em região de poro (Fig 4.7).

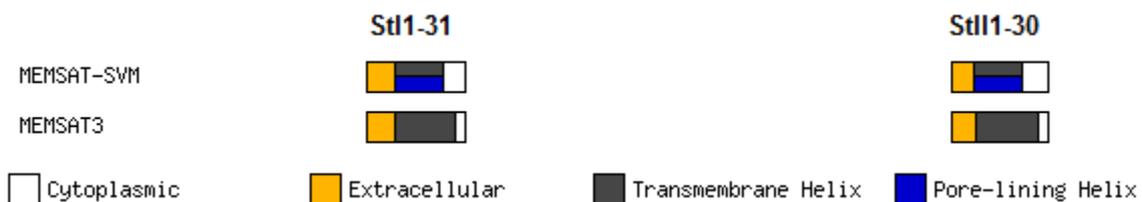


Figura 4.7. Diagrama de predição de topologia dos peptídeos StI₁₋₃₁ e StII₁₋₃₀ na membrana obtido pelos programas MEMSAT-SVM e MEMSAT 3.

A mesma região em StI₁₋₃₁ e StII₁₋₃₀ foi predita como sendo o segmento que forma a hélice e interage com a membrana (Fig. 4.7, Tabela 4.2). MEMSAT-SVM ainda foi capaz de prever a estequiometria dos poros formados pelos peptídeos (Tabela 4.2). O número apresentado pelo software está de acordo com estudos anteriores que indicam a estequiometria do poro como sendo variável entre 2 e 7 monômeros das toxinas, e as formas triméricas e tetraméricas como sendo as mais estáveis (Antonini et al., 2014). O caráter anfipático do segmento e a propensão de aquisição de estrutura em α-hélice parecem ser determinantes nas características do poro preditas pelo software.

Tabela 4.2 – Parâmetros estruturais e de topologia da interação dos peptídeos com membranas obtidos pelo programa MEMSAT-SVM.

	Stl ₁₋₃₁	StII ₁₋₃₀
Região de interação com a membrana	9-24	7-22
Região helicoidal formadora do poro	9-24	7-22
Número de hélices	1	1
Estequiometria do poro	3	3

4.2.2 Modelagem estrutural

Após o trabalho de predição de estrutura, o software PEPFOLD gerou modelos estruturais dos peptídeos em alta resolução. As cinco estruturas de cada peptídeo foram inicialmente comparadas com a estrutura do segmento N-terminal de ambas as toxinas. Para a comparação, utilizou-se a estrutura de StI obtida por NMR (Castrillo et al., 2010) e de StII obtida por cristalografia de raios-X (Mancheño et al., 2003). Os modelos gerados, bem como as estruturas obtidas experimentalmente, referem-se às formas em solução.

A sobreposição do modelo de StI₁₋₃₁, em preto, com a região N-terminal de StI, em azul, mostra a consistência da estrutura calculada com a obtida por NMR (Fig. 4.8A). Em ambas as moléculas a região 15-24 encontra-se em α -hélice. No modelo, a hélice estende-se até o resíduo 28 enquanto que na toxina essa região é parte de um loop ligando o segmento helicoidal à primeira fita- β . Essa diferença deve-se provavelmente ao efeito que o resto da estrutura da toxina exerce sobre a região 25-28, ausente no peptídeo e não considerada no cálculo computacional que gerou os modelos. A região 1-15 apresenta estrutura ao acaso em ambas as moléculas, com a região 10-15 em “loop” e o segmento 1-10 interagindo com a hélice, e, no caso da toxina, também com o sanduíche de folhas- β .

O modelo do peptídeo StI₁₂₋₃₁, que compreende essencialmente a região em hélice do segmento N-terminal, também se mostrou de acordo com a estrutura experimental da região em StI. No peptídeo e na toxina as regiões entre os resíduos 15-25 encontram-se em hélice e as extremidades da região 12-31 em estrutura randômica (Fig 4.8B).

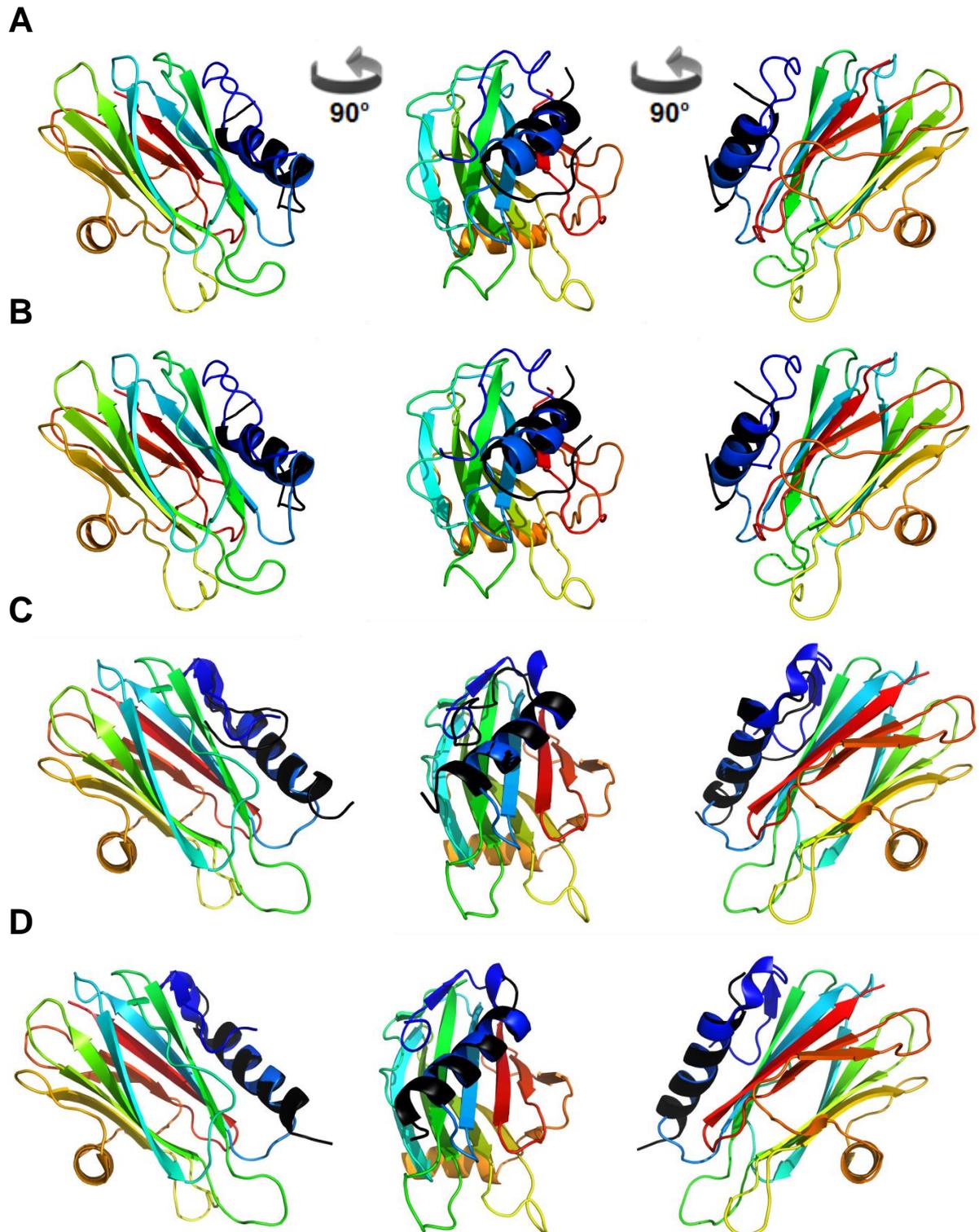


Figura 4.8. Sobreposição da estrutura da toxina StI obtida por NMR (Castrillo et al., 2010) e da toxina StII obtida por cristalografia de raios-X (Mancheño et al., 2003) (em cores) com as estruturas dos peptídeos modeladas pelo programa PEPFOLD (preto). (A) StI₁₋₃₁, (B) StI₁₂₋₃₁, (C) StII₁₋₃₀ e (D) StII₁₁₋₃₀.

As estruturas dos peptídeos de StII compreendendo as regiões 1-30 e 11-30 calculadas por PEPFOLD também se mostraram consistentes com a estrutura obtida

experimentalmente (Figs. 4.8C e 4.8D). A região em hélice dos dois peptídeos e da toxina inicia-se no resíduo de fenilalanina na posição 14. Os modelos dos peptídeos apresentaram uma volta de hélice a mais na direção da extremidade C-terminal da cadeia assim como observado para StI₁₋₃₁. Também nesse caso a diferença de conformação deve-se à influência que o resto da toxina exerce sobre a conformação do N-terminal, especialmente na região 26-30 em StII. A região 1-10 do modelo de StII₁₋₃₀ apresenta-se completamente desestruturada enquanto que na toxina os resíduos 6-8 estão em fita- β (Fig. 4.8C). Assim como observado para StI e o modelo de StI₁₋₃₁, um “loop” flexível no segmento 8-13 permite a interação da região 1-7 com a hélice N-terminal. No caso da toxina, o segmento 1-7 de StII também interage com o sanduíche de folhas- β .

Após a comparação com a estrutura obtida experimentalmente do N-terminal das toxinas, os modelos foram analisados montando-se diagramas de estrutura secundária para a análise da incidência de cada tipo de estrutura em cada posição da molécula. O modelo com menores valores de desvio em relação à estrutura da toxina foi selecionado ser analisado em nível atômico.

Os modelos gerados para os peptídeos de StI indicam uma alta concentração de estrutura helicoidal no segmento 15-29 (Figs. 4.9A e 4.9B). Os diagramas das estruturas mostram que em todos os casos calculou-se tal conformação para essa região. As estruturas em alta resolução evidenciam o caráter anfipático da hélice formada no segmento, com os resíduos apolares em preto concentrados em uma das faces da hélice enquanto resíduos hidrofílicos estão localizados na face oposta da hélice. A face hidrofílica da hélice possui os resíduos carregados positivamente e carregados negativamente intercalados em voltas sucessivas. Assim como exposto pelos estudos de predição de estrutura secundária, as conformações de StI₁₂₋₃₁ e da região 12-31 do peptídeo StI₁₋₃₁ são semelhantes, indicando que o segmento 1-11 exerce pouca influência sobre o restante da molécula. Apesar de ausente no modelo em alta resolução apresentado, em dois dos modelos obtidos a região 1-11 de StI₁₋₃₁ apresenta um segmento helicoidal, de acordo com a estrutura obtida por NMR, que apresenta dois segmentos helicoidais ligados por uma região flexível (Castrillo et al., 2010).

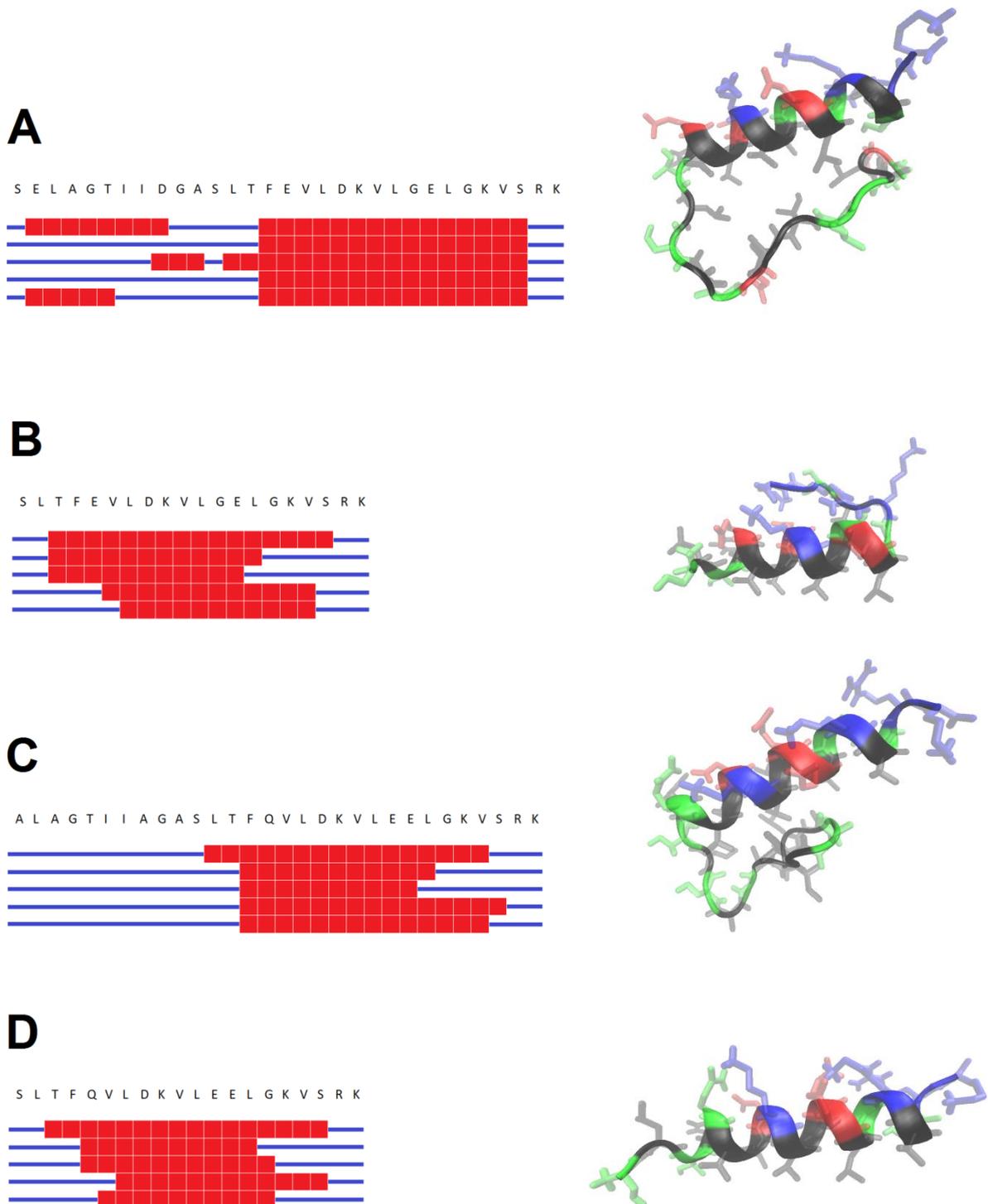


Figura 4.9. Peptídeos modelados por PEPFOLD. Diagrama de estrutura secundária dos modelos (■ α -hélice / — randômico) (esquerda). Estrutura de um dos modelos (direita). Resíduos: ■ apolares / ■ polares sem carga / ■ carregados positivamente / ■ carregados negativamente. (A) StI₁₋₃₁, (B) StI₁₂₋₃₁, (C) StII₁₋₃₀ e (D) StII₁₁₋₃₀.

Os peptídeos de StII possuem estrutura em α -hélice na região entre os resíduos 14 e 24, a mesma região em conformação helicoidal dos modelos de StI (Fig. 4.9). A hélice formada em StII possui caráter anfipático, com os resíduos

apolares em uma das faces e os resíduos polares sem carga, carregados negativamente e carregados positivamente na face oposta. A região 1-10 de StII₁₋₃₀ apresenta estrutura randômica em todos os modelos obtidos e aparentemente não exerce influencia sobre a conformação do restante do peptídeo (Figs. 4.9C e 4.9D).

Nos quatro peptídeos analisados, a proximidade espacial entre os resíduos positivos e negativos em voltas sucessivas da hélice possibilitaria a formação de pares iônicos ligando as diferentes voltas do segmento helicoidal e estabilizando essa estrutura. Ainda, na quando ligados à membrana, que possui baixa constante dielétrica, a formação de pares iônicos seria energeticamente favorecida.

4.3 Estudos em solução

4.3.1 Estudos conformacionais dos peptídeos em solução por CD

A estrutura dos peptídeos em solução foi estudada por CD em pHs 3,0, 7,0 e 11,0 (Fig. 4.10).

Os espectros de CD de StI₁₋₃₁, nos 3 pHs estudados, apresentam um pico negativo ao redor de 200 nm e um pico de menor intensidade em 222 nm, indicando que nessas condições, StI₁₋₃₁ possui uma estrutura predominantemente ao acaso com um baixo conteúdo de estrutura em α -hélice (Fig. 4.10A).

O cálculo do conteúdo de estrutura secundária por meio dos espectros de CD de StI₁₋₃₁ indica a presença de 21 a 22 resíduos em estrutura randômica e de 4 a 6 resíduos em hélice além de um baixo conteúdo de estrutura em fita- β (Tabela 4.3). Os estudos de predição e modelagem sugerem que o conteúdo helicoidal observado localizar-se-ia essencialmente na região 15-25 e que os 15 primeiros e 5 últimos resíduos do peptídeo apresentariam estrutura ao acaso.

Apesar da presença de grupos ionizáveis ao longo da molécula, a alteração na distribuição de cargas no peptídeo pela mudança no pH não alterou o conteúdo estrutural do peptídeo, indicando a não ocorrência de mudanças conformacionais significativas.

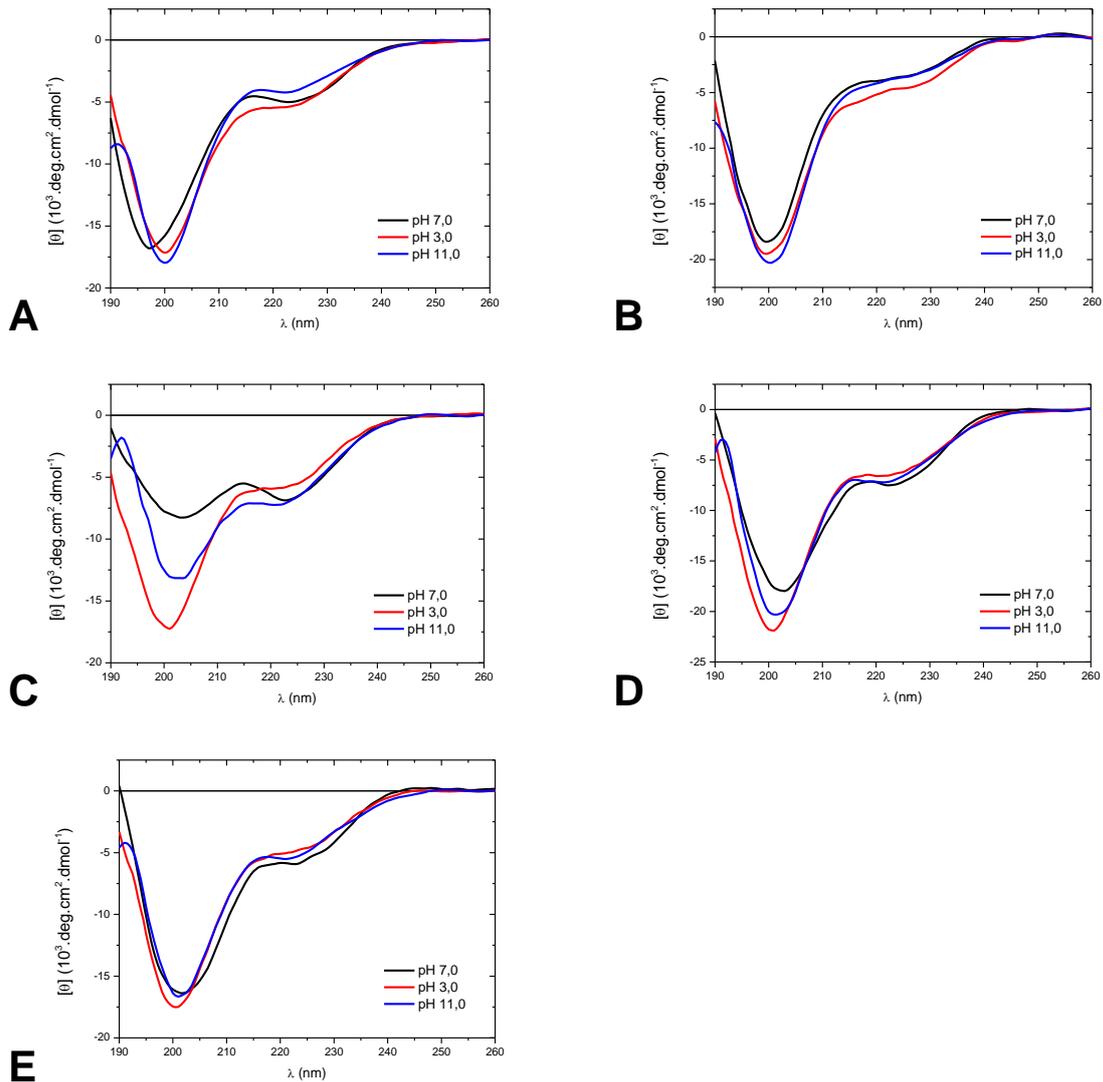


Figura 4.10. Espectros de CD dos peptídeos do N-terminal de StI e StII em solução aquosa, nos pHs 3,0, 7,0 e 11,0. (A) StI₁₋₃₁, (B) StI₁₂₋₃₁, (C) StII₁₋₃₀ e (D) StII₁₁₋₃₀, (E) N-TOAC-StII₁₁₋₃₀. [Peptídeo] = 12 μM.

Assim como o fragmento peptídico mais longo de StI, StI₁₂₋₃₁ apresentou espectros de CD característicos de conformação essencialmente randômica nos 3 valores de pH estudados (Fig 4.10B). Novamente, alterações no estado de ionização das cadeias laterais não alteraram o conteúdo estrutural do peptídeo. A desconvolução dos espectros indicou a presença de 16 resíduos em conformação randômica e 4 resíduos em α-hélice (Tabela 4.3). Provavelmente, os 4 resíduos em hélice em StI₁₂₋₃₁ referem-se aos mesmos resíduos em hélice calculados para StI₁₋₃₁, localizados na região entre os resíduos 15 e 25 (Tabela 4.3).

StII₁₋₃₀ apresentou mudanças estruturais significativas em função do estado de ionização das cadeias laterais e da extremidade N-terminal do peptídeo como indicado pelos diferentes espectros de CD em pH 3,0 7,0 e 11,0. (Fig 4.10C).

Em pH 3,0, o peptídeo com carga líquida +4,7 (Tabela 3.1) apresenta um espectro de CD característico de conformação ao acaso. A alta densidade de cargas positivas cria repulsão inter e intramolecular e o peptídeo nessa condição estaria essencialmente na forma monomérica, apresentando 22 resíduos ao acaso (Fig. 4.10C, Tabela 4.3). A presença de três resíduos em fita- β estaria de acordo com a estrutura cristalográfica da proteína, que apresenta tal conformação na região 6-8, e o conteúdo helicoidal calculado estaria localizado entre os resíduos 14-23 como visto nos modelos (Tabela 4.3).

Estudos de CD indicaram que o peptídeo StII₁₋₃₀, devido à presença de aminoácidos hidrofóbicos concentrados no segmento 1-10, sofre agregação em pH 7 com o aumento do conteúdo de estrutura do tipo β (Casallanovo et al., 2006). A menor intensidade do pico em 200 nm evidencia a diminuição na contribuição de estrutura randômica nos espectros de CD (Fig. 4.10C) que, com a passagem de pH 3,0 para pH 7,0 passaria para fita- β . O número de resíduos em fita- β aumenta de 3 para 9 com a ionização dos resíduos de ácido aspártico e ácido glutâmico. Apesar de os resíduos ionizados localizarem-se na região 11-30 em StII, acredita-se que a alteração na carga líquida e posição das cargas ao longo da molécula afetaria o estado de agregação do peptídeo e a região 1-10 concentraria então o aumento no conteúdo de fita- β observado por CD (Tabela 4.3).

A passagem de pH 7,0 para pH 11,0 aumentou a intensidade do pico em 200 nm no espectro de StII₁₋₃₀, indicando um aumento no conteúdo de estrutura ao acaso (Fig. 4.10C). A desprotonação dos resíduos de lisina altera a carga líquida e as posição das cargas no peptídeo, diminuindo o estado de agregação de modo que o aumento no conteúdo de estrutura ao acaso estaria relacionado a tal mudança de estado.

O conteúdo helicoidal de StII₁₋₃₀ permaneceu essencialmente inalterado nos pHs 3,0, 7,0 e 11,0 (Tabela 4.3), localizado, segundo os estudos conformacionais *in silico*, na região 14-23. A alta propensão de aquisição de estrutura em α -hélice faz

com que o segmento seja estável conformacionalmente e mantenha sua estrutura independente do pH e do estado de agregação do peptídeo.

O peptídeo StII₁₁₋₃₀ e seu análogo contendo TOAC no N-terminal apresentaram espectros de CD característicos de conformação majoritariamente randômica e um baixo conteúdo de α -hélice nos três pH estudados (Figs. 4.10D e 4.10E). Ambos os peptídeos apresentaram 15 resíduos estruturados ao acaso e entre 4 e 5 resíduos com conformação helicoidal (Tabela 4.3). Novamente, o segmento em hélice observado estaria localizado entre os resíduos 14 e 23, enquanto o resto da estrutura em direção às extremidades apresentaria estrutura randômica (Tabela 4.3). As semelhanças estruturais entre StII₁₁₋₃₀ e N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ indicam que a sonda paramagnética no N-terminal do peptídeo não altera de forma significativa a estrutura do análogo em solução. Em decorrência da diferença de pKa entre os grupos amino terminal de TOAC no peptídeo marcado e da serina em StII₁₁₋₃₀, os peptídeos possuem diferentes valores de carga líquida em pH 7,0 (Tabela 3.1), mas ainda assim apresentam essencialmente a mesma estrutura.

Tabela 4.3 – Conteúdo estrutural dos peptídeos em solução calculado a partir dos espectros de CD. Porcentagem (%) e número de resíduos (N).

	pH	Carga do peptídeo	% α -hélice (N)	% Folha- β (N)	% Randômica (N)	R ²
StI ₁₋₃₁	3,0	+ 4,6	17 (6)	11 (3)	72 (22)	0,973
	7,0	0	13 (4)	20 (6)	67 (21)	0,949
	11,0	-,3,2	15 (5)	12 (4)	73 (22)	0,970
StI ₁₂₋₃₁	3,0	+ 4,7	19 (4)	4 (1)	77 (15)	0,966
	7,0	+ 2	18 (4)	7 (1)	75 (15)	0,921
	11,0	-1,2	21 (4)	0	79 (16)	0,967
StII ₁₋₃₀	3,0	+ 4,7	18 (5)	10 (3)	72 (22)	0,967
	7,0	+ 2	12 (4)	30 (9)	58 (17)	0,912
	11,0	-1,2	17 (5)	19 (6)	64 (19)	0,968
StII ₁₁₋₃₀	3,0	+4,7	23(5)	0	77 (15)	0,949
	7,0	+ 2	23 (5)	0	77 (15)	0,960
	11,0	-1,2	25 (5)	0	75 (15)	0,961
N-TOAC-StII ₁₁₋₃₀	3,0	+ 4,7	19 (4)	8 (2)	73 (15)	0,956
	7,0	+ 1	24 (5)	4 (1)	72 (15)	0,961
	11,0	-1,3	19 (4)	10 (2)	71 (15)	0,953

Em todas as condições estudadas o conteúdo helicoidal dos peptídeos de 20 e 30 resíduos de StII permaneceu inalterado (Tabela 4.3). Tal observação reforça a idéia de que o segmento em hélice estaria dentro da região 14-23, comum aos dois peptídeos, e que as alterações conformacionais de StII₁₋₃₀ em função do pH ocorreriam majoritariamente no segmento 1-10.

4.3.2 Estudos do peptídeo N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ em solução por EPR

O peptídeo contendo TOAC foi estudado por EPR em solução aquosa em diferentes pHs (Fig 4.11). Os espectros apresentam linhas estreitas, características de movimento pseudo-isotrópico rápido na escala de tempo do aparelho. As linhas estreitas indicam que o peptídeo tomba rapidamente em solução e que o resíduo de TOAC na posição N-terminal experimenta um alto grau de mobilidade.

Foram obtidos espectros em solução aquosa em função do pH para o estudo do efeito do estado de ionização dos grupos ionizáveis do peptídeo sobre os espectros. As linhas nos espectros de EPR não apresentaram alterações significativas, indicando que a mobilidade do TOAC não é significativamente alterada com a mudança de pH. A observação corrobora estudos de CD que indicam que o peptídeo apresenta a mesma estrutura nos pHs 3,0, 7,0 e 11,0 (Fig. 4.11, Tabela 4.3).

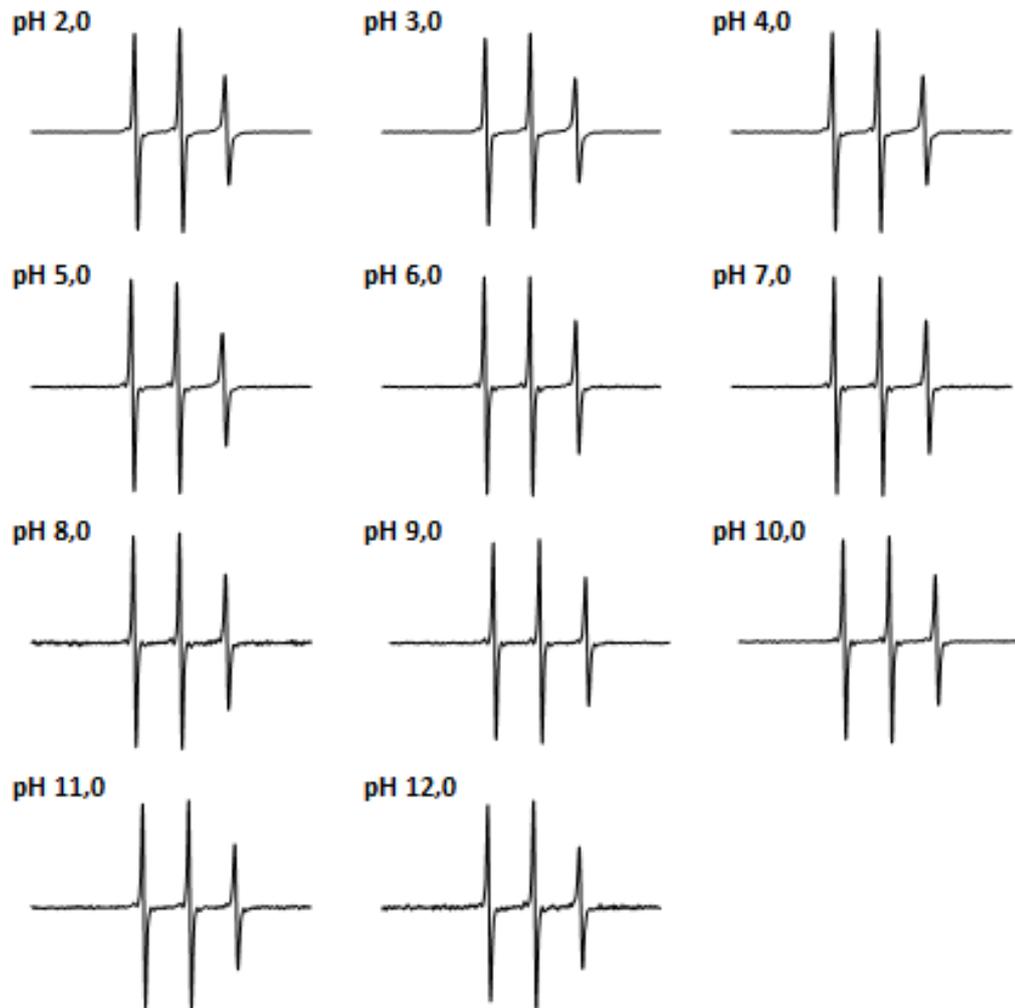


Figura 4.11. Espectros de EPR de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ em solução aquosa em função do pH. [Peptídeo] = 50 μ M. Tampão PBC 15 mM. A varredura total nos espectros é de 100 G.

Foi mostrado que o desdobramento hiperfino isotrópico (a_N) e a relação das alturas das linhas de campo central e de campo alto (h_0/h_{-1}) são sensíveis a alterações no estado de ionização da molécula (Nakaie et al., 1981; Nakaie et al., 1983; Pertinhez et al., 1997; Schreier et al., 2004). Os valores de a_N e h_0/h_{-1} foram medidos e plotados em função do pH (Figs. 4.12 e 4.13).

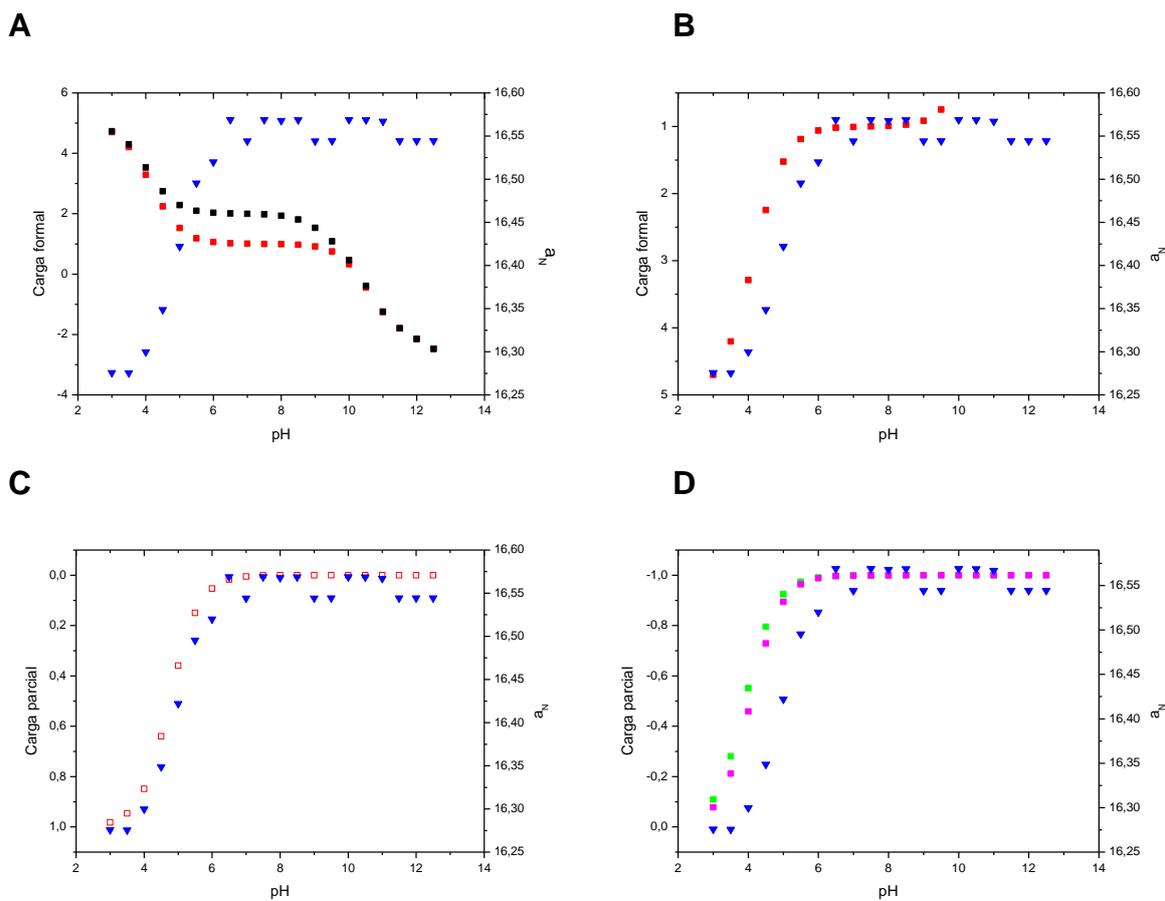


Figura 4.12. Valores de desdobramento hiperfino (a_N , \blacktriangledown) em função do pH relacionados com: (A) Valores de carga teórica de StII₁₁₋₃₀ (\blacksquare) e N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ (\blacksquare) (B) Valores de carga teórica de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ (\blacksquare) (C) Valores de carga parcial do grupamento amino-terminal de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ (\square) (D) Valores de carga parcial dos grupamentos -COOH das cadeias laterais de Asp (\blacksquare) e Glu (\blacksquare). Os valores de carga teórica foram calculados empregando valores de pK de TOAC 4,75 (Nakaie et al., 1981; Nakaie et al., 1983), Asp 3,90, Glu 4,07, Lys 10,54 e Arg 12,48.

Nakaie e colaboradores (Nakaie et al., 1981) mostraram que o equilíbrio de ionização do grupo amino é lento na escala de tempo do EPR. Desse modo, o espectro de EPR obtido próximo ao pKa do grupo é composto pelos espectros individuais das duas populações, correspondentes às formas protonada e desprotonada do grupo ionizável, de acordo com a equação de Henderson-Hasselbalch. Quando o amino grupo do resíduo de TOAC está protonado, o elétron desemparelhado do nitróxido está mais deslocalizado sobre o átomo de oxigênio e, portanto, essa forma apresenta menor valor de desdobramento hiperfino em relação à forma desprotonada, onde o elétron desemparelhado está mais deslocalizado sobre o átomo de nitrogênio. As formas protonada e desprotonada do amino grupo

do resíduo de TOAC também apresentam diferentes valores de g (Nakaie et al., 1981).

Na presença de quantidades consideráveis das espécies protonada e desprotonada (no pK e em valores de pH próximos ao pK) não é possível observar com clareza no espectro a presença das duas formas pois, devido às pequenas diferenças entre os valores de a_N e g_N , os espectros referentes a elas se sobrepõem. A linha de campo alto é a mais afetada (deslocada). Na presença de quantidades consideráveis das duas formas, a sobreposição dos espectros de cada uma das espécies, ligeiramente deslocados um em relação ao outro, origina um espectro com as linhas ligeiramente alargadas. A linha de campo alto apresenta maior diferença entre as posições das linhas referentes aos espectros duas populações e, portanto, apresenta maior alargamento. Por esse motivo, gráficos da relação h_0/h_{-1} mostram um valor máximo quando $pH = pK$ (Nakaie et al., 1981).

A inflexão em torno de pH 5,0 observada no gráfico de $a_N \times pH$ (Fig. 4.12A e 4.12B) corresponde à titulação do grupamento amino do aminoácido TOAC, que, segundo a literatura, quando localizado na posição N-terminal apresenta valores de pK entre 4,5 e 5,0 (Nakaie et al., 1983). O desdobramento hiperfino reporta essencialmente variações decorrentes da titulação do grupo amino-terminal do peptídeo, uma vez que seus valores dependem da distribuição do elétron desemparelhado sobre a ligação N-O e a protonação ou desprotonação da extremidade N-terminal afetam através do espaço (throughspace effect) a distribuição eletrônica do radical (Fig 4.12C).

Os resíduos de ácido aspártico e glutâmico, que possuem pKs de 3,90 e 4,07 respectivamente, presentes no peptídeo, apesar de não estarem próximos na sequência de resíduos, poderiam estar espacialmente próximos ao TOAC N-terminal devido à estrutura flexível que o peptídeo adota em solução. Dessa forma, a titulação das cadeias laterais desses resíduos poderia afetar a distribuição eletrônica do radical interferindo por sua vez no desdobramento hiperfino. Aparentemente, a titulação de ácido aspártico e glutâmico não altera a distribuição do elétron desemparelhado sobre a ligação N-O, não interferindo no valor do desdobramento hiperfino (Fig. 4.12D). Esses resíduos provavelmente não estão espacialmente próximos da extremidade N-terminal do peptídeo de modo que é provável que

mudanças no estado de ionização de suas cadeias laterais não influenciem o valor de desdobramento hiperfino que no caso, reporta essencialmente a titulação do grupamento amino-terminal do TOAC no peptídeo (Fig. 4.12C).

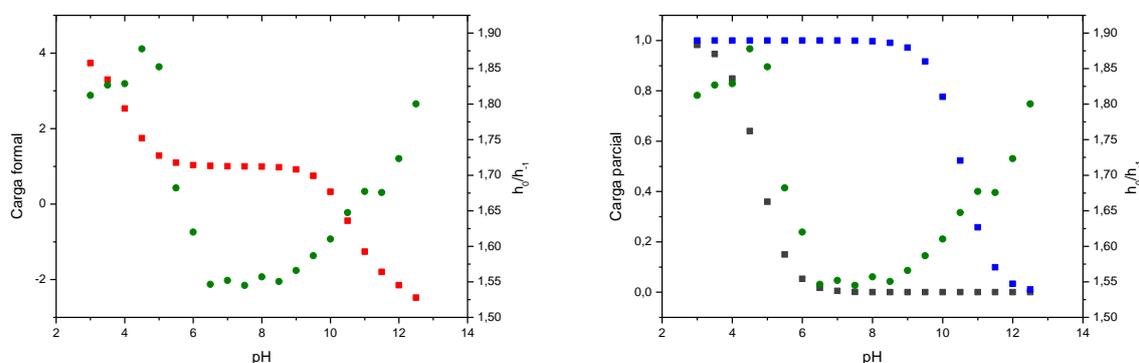


Figura 4.13. Valores de carga teórica de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ (■) e da relação das alturas das linhas de campo central e de campo alto (h_0/h_{-1} , ●) medida nos espectros de EPR em solução aquosa em função do pH (esquerda). Curva teórica de titulação do grupamento N-terminal do TOAC (■) e da cadeia lateral de um resíduo de lisina (■) e valores de h_0/h_{-1} (●) medidos nos espectros de EPR em solução aquosa em função do pH (direita).

O valor de pK do grupamento amino terminal observado nos gráficos de a_N em função do pH aparece na região de máximo observada entre pH 4,5 e 5,0 no gráfico de h_0/h_{-1} (Fig. 4.13). Nota-se que o valor de pK nessa figura não aparece no ponto de inflexão da curva. Isto ocorre porque, ao ser titulado, o peptídeo sofre alterações conformacionais que se refletem no valor da relação de alturas h_0/h_{-1} ; isso pode ser visto com clareza quando se passa de valores baixos de pH (< 4) para valores de pH entre 6,0 e 8,0 (Fig. 4.13). Nesse caso, a titulação do resíduo de ácido aspártico e dos dois resíduos de ácido glutâmico, além da titulação da extremidade N-terminal, alteram a carga líquida e as posições das cargas na molécula e são capazes de alterar a conformação do peptídeo. A mudança conformacional altera o tombamento da molécula em solução, assim como a mobilidade de TOAC, e é refletida por alterações na relação h_0/h_{-1} . A relação h_0/h_{-1} é sensível a mudanças no tombamento da molécula, pois as linhas espectrais se alargam diferencialmente conforme a velocidade de tombamento da molécula diminui.

Eventos semelhantes foram observados e analisados em Nakaie et al. 1983. No presente caso, essa análise é corroborada pela variação do parâmetro h_0/h_{-1} na

região de pH entre 8,0 e 12,5. Nessa região observa-se uma inflexão em torno de pH 10,5. Essa inflexão corresponde à titulação dos três resíduos básicos de lisina e indica a ocorrência de novas alterações conformacionais sofridas pelo peptídeo em consequência da desprotonação desses resíduos.

Os valores de tempo de correlação τ_B e τ_C calculados para os espectros pH 8,0 são de $1,55 \times 10^{-10}$ s/rad e $1,59 \times 10^{-10}$ s/rad, respectivamente. As expressões para τ_B e τ_C foram deduzidas considerando-se uma partícula esférica movimentando-se rapidamente em um meio isotrópico, e nessas condições os valores de τ_B e τ_C devem coincidir. Foi sugerido que diferenças entre valores de τ_B e τ_C poderiam indicar o desvio da condição de movimento isotrópico (Ernandes et al., 1976). A diferença de apenas 2,5 % entre os valores calculados de τ_B e τ_C sugere que o TOAC não sente o movimento anisotrópico do peptídeo provavelmente devido à alta liberdade de movimento da porção N-terminal. Em pH 2,0 os valores de τ_B e τ_C são $2,57 \times 10^{-10}$ s/rad e $2,69 \times 10^{-10}$ s/rad, e a diferença entre os valores de 4,5%. A passagem de pH 8,0 para 2,0 aumenta a restrição do resíduo de TOAC que passa a tornar mais lentamente provavelmente em decorrência da protonação das cadeias laterais ácidas e do N-terminal em pH 2,0. O aumento da diferença entre τ_B e τ_C também indica que o resíduo de TOAC encontra-se mais imobilizado e sente com mais intensidade o movimento anisotrópico do peptídeo. O valor de τ_C para o TOAC livre em solução é de $3,2 \cdot 10^{-11}$ s/rad (Nakaie et al., 1981), aproximadamente uma ordem de grandeza menor do que observado para o TOAC ligado no N-terminal do peptídeo. O maior valor para o TOAC ligado ao peptídeo é esperado devido à diferença no tamanho das moléculas.

4.4 Interação dos peptídeos com membranas modelo

4.4.1 Estudos na presença de micelas

4.4.1.1 Estudos conformacionais dos peptídeos na presença de micelas por CD

A interação dos peptídeos com micelas de diferentes composições lipídicas foi estudada por CD. Na presença de micelas de LPC, StI₁₋₃₁ apresenta um espectro com um pico positivo ao redor de 195 nm, e dois picos negativos, um em 208 e outro em 222 nm (Fig. 4.14A). Esse espectro é característico de aquisição de estrutura secundária em α -hélice. Ainda, a mudança na conformação do peptídeo observada

na presença de micelas é um indicativo da interação do peptídeo com o agregado lipídico.

A presença de um ponto isodicroico próximo ao comprimento de onda de 203 nm nos espectros de CD de um polipeptídeo que, por ação de algum fator como a alteração na temperatura ou adição de uma substância desnaturante ou renaturante, sofre uma transição de estrutura ao acaso para α -hélice ou vice-versa, indica a presença de duas populações da molécula, uma essencialmente desestruturada e outra essencialmente estruturada (Holtzer et al., 1992). No caso dos peptídeos derivados da região N-terminal das esticolisinas, a adição de micelas ou vesículas compostas por determinados lipídios induziu a transição de estrutura randômica para α -hélice. A presença do ponto isodicroico nos espectros indica a existência de dois estados, o primeiro correspondente ao peptídeo livre em solução e com estrutura randômica e o segundo correspondente ao peptídeo estruturado em α -hélice em consequência da ligação ao agregado lipídico.

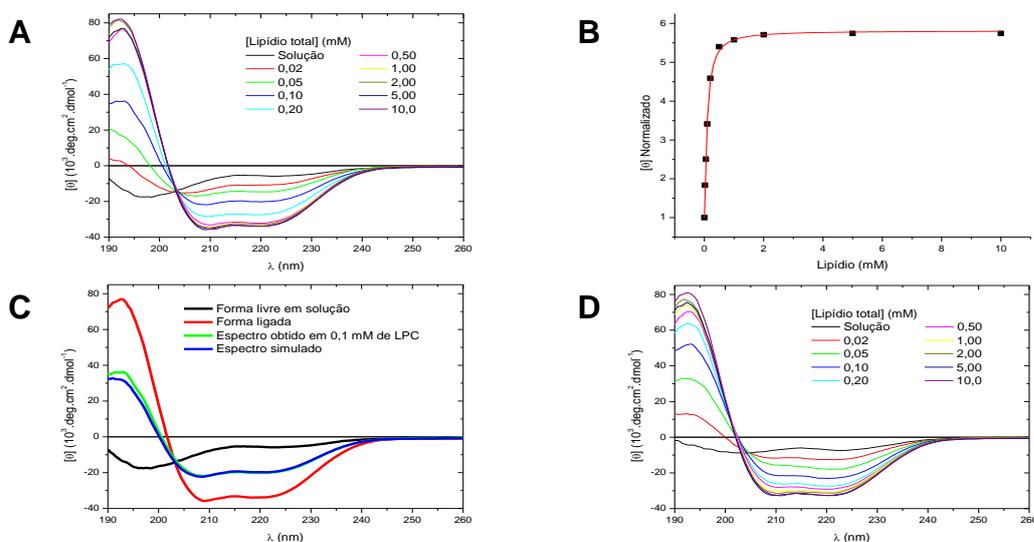


Figura 4.14. (A) Espectros de CD de StI₁₋₃₁ em solução e na presença de diferentes concentrações de micelas de LPC em pH 7,0, (B) $[\theta]$ em 222 nm normalizado e curva de ligação ajustada aos valores experimentais em função da concentração lipídica, (C) simulação espectral para os espectros com duas populações, e (D) espectros de CD de StII₁₋₃₀ em solução e na presença de diferentes concentrações de micelas de LPC em pH 7,0.

Levando em conta a presença de duas populações do peptídeo, a intensidade de $[\theta]$ em 222 nm foi plotada em função da concentração lipídica para estudo da ligação do peptídeo aos diferentes agregados lipídicos. A partir das curvas de ligação é possível quantificar a afinidade de cada um dos fragmentos pelos lipídios

ajustando a equação de Hill aos dados experimentais normalizados e obter a constante de afinidade peptídeo-micela (Tabela 4.4). A normalização dos dados e a equação usada nos ajuste aos dados experimentais estão descritas na seção 3.5.5 em Materiais e Métodos.

Os espectros de CD de duas populações e a ligação dos peptídeos às micelas também foram analisados por meio de simulações espectrais. A partir dos valores de constante, calculou-se a proporção entre as populações livre e ligada e utilizando-se os espectros dos peptídeos em solução e na condição de saturação, foram simulados espectros em concentrações intermediárias de lipídios (Fig. 4.14C). A simulação espectral de Stl₁₋₃₁ na presença de 0,1 mM de LPC apresenta boa concordância com o espectro experimental, reforçando o conceito da presença de duas populações na composição do espectro.

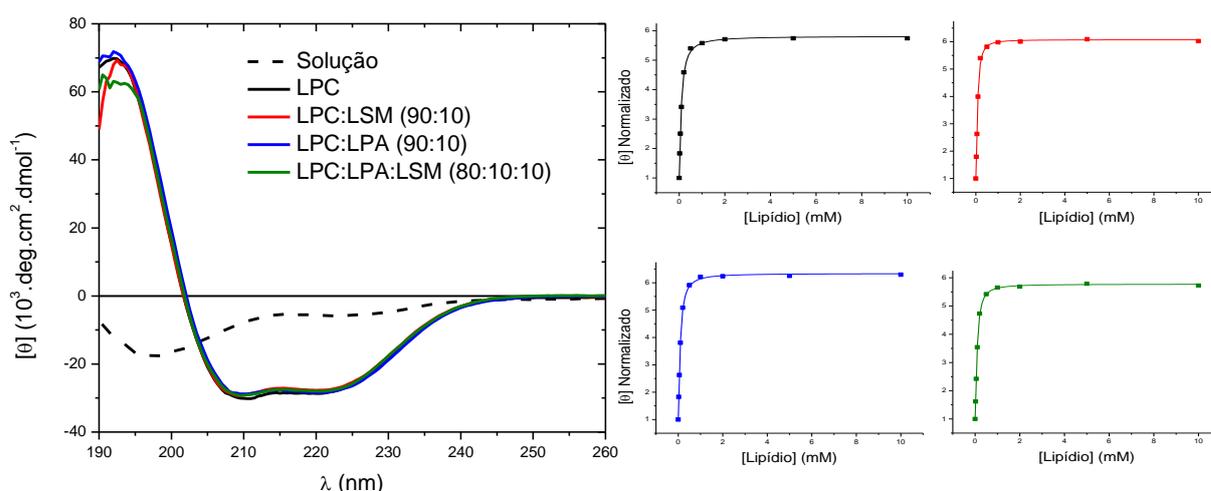


Figura 4.15. Espectros de CD de Stl₁₋₃₁ em solução e na presença de 5 mM de micelas de composição lipídica variada (esquerda); Intensidades de $[\theta]$ em 222 nm normalizado e curvas de ligação ajustada aos valores experimentais em função da concentração lipídica (direita). LPC (—), LPC:LSM (90:10) (—), LPC:LPA (90:10) (—) e LPC:LPA:LSM (80:10:10) (—).

Stl₁₋₃₁ também foi capaz de ligar-se em micelas de LPC contendo 10 mol% de LPA e/ou LSM adquirindo conformação em α -hélice como indicado pelos espectros (Fig. 4.15). Stl₁₂₋₃₁ também interagiu com as micelas estudadas, passando de uma estrutura randômica para α -hélice (Fig 4.16). A presença de um ponto isodiróico nos espectros evidencia a presença de duas populações com estruturas diferentes, permitindo a análise da afinidade peptídeo-micela por meio das curvas de ligação

(Fig 4.16). As curvas de ligação dos peptídeos de StI indicam que estes ligam-se às micelas com praticamente a mesma afinidade, embora StI₁₋₃₁ e StI₁₂₋₃₁ possuam carga líquida 0 e +2 em pH 7,0, respectivamente.

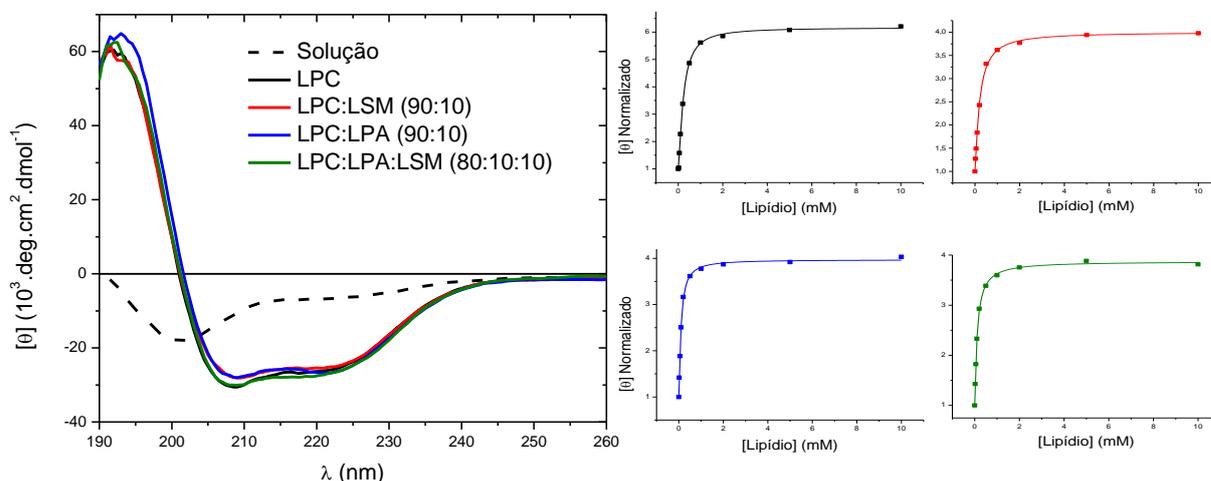


Figura 4.16. Espectros de CD de StI₁₂₋₃₁ em solução e na presença de 5 mM de micelas de composição lipídica variada (esquerda); Intensidades de $[\theta]$ em 222 nm normalizado e curvas de ligação ajustada aos valores experimentais em função da concentração lipídica (direita). LPC (—), LPC:LSM (90:10) (—), LPC:LPA (90:10) (—) e LPC:LPA:LSM (80:10:10) (—).

Embora StII₁₋₃₀ em solução no pH 7,0 apresente uma conformação diferente dos demais peptídeos, ao interagir com as diferentes composições de micelas estudadas também adquiriu estrutura helicoidal (Fig 4.17), como observado para os peptídeos de StI. A transição entre as populações de StII₁₋₃₀ ocorre de forma diferente da observada para os outros peptídeos que em solução possuem estrutura randômica (Fig 4.14A e 4.14D). Em pH 7,0, StII₁₋₃₀ apresenta certo grau de agregação de modo que a transição entre as populações contemplaria também a etapa de desagregação do peptídeo. A relação $[\theta]_{222}/[\theta]_{208}$ nos espectros de StII₁₋₃₀ é maior em baixas concentrações de lipídio e diminui com a adição de lisofosfolípidios, indicando que o peptídeo sofre desagregação. Ainda assim foi possível analisar a ligação do peptídeo pela intensidade de $[\theta]$ em 222 nm (Fig. 4.17).

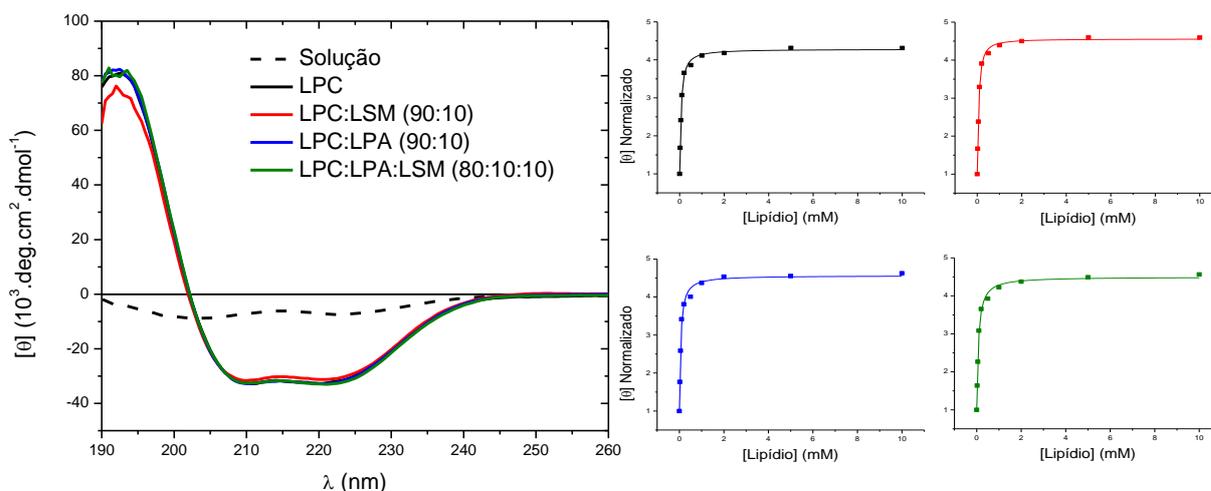


Figura 4.17. Espectros de CD de StII_{1-30} em solução e na presença de 5 mM de micelas de composição lipídica variada (esquerda); Intensidades de $[\theta]$ em 222 nm normalizado e curvas de ligação ajustada aos valores experimentais em função da concentração lipídica (direita). LPC (—), LPC:LSM (90:10) (—), LPC:LPA (90:10) (—) e LPC:LPA:LSM (80:10:10) (—).

StII_{11-30} e o análogo contendo TOAC, também apresentam transição de estrutura randômica para hélice na passagem da solução para micelas (Figs. 4.18 e 4.19). Os peptídeos apresentam um comportamento conformacional e de ligação semelhantes nos diversos sistemas estudados.

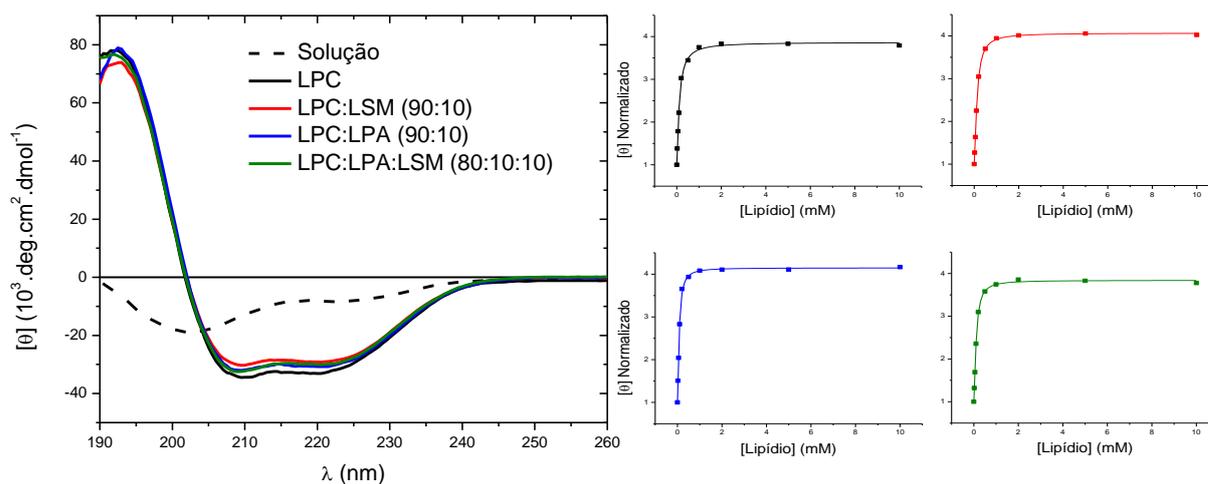


Figura 4.18. Espectros de CD de StII_{11-30} em solução e na presença de 5 mM de micelas de composição lipídica variada (esquerda); Intensidades de $[\theta]$ em 222 nm normalizado e curvas de ligação ajustada aos valores experimentais em função da concentração lipídica (direita). LPC (—), LPC:LSM (90:10) (—), LPC:LPA (90:10) (—) e LPC:LPA:LSM (80:10:10) (—).

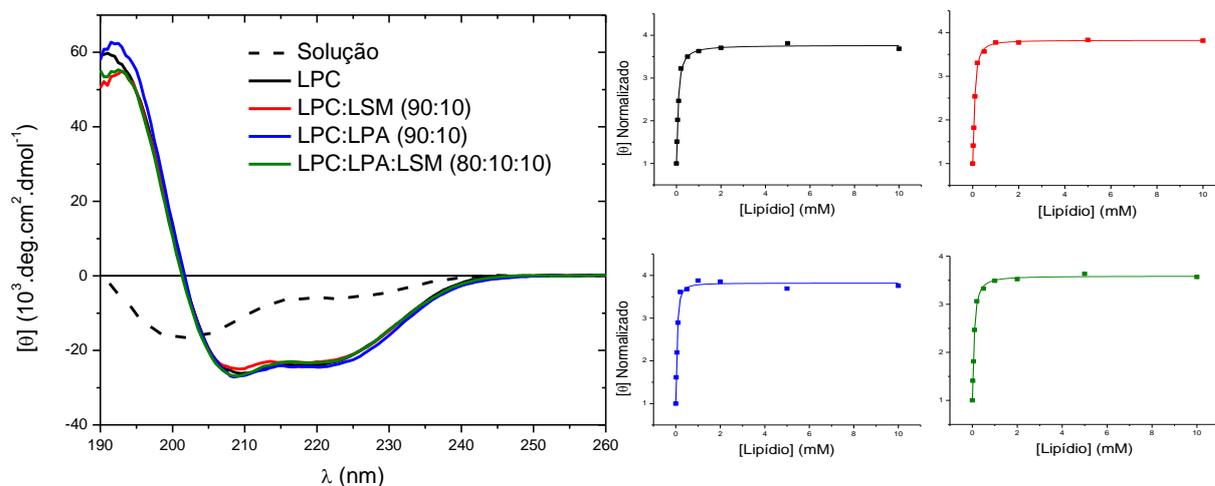


Figura 4.19. Espectros de CD de N-TOAC-Stil₁₁₋₃₀ em solução e na presença de 5 mM de micelas de composição lipídica variada (esquerda); Intensidades de $[\theta]$ em 222 nm normalizado e curvas de ligação ajustada aos valores experimentais em função da concentração lipídica (direita). LPC (—), LPC:LSM (90:10) (—), LPC:LPA (90:10) (—) e LPC:LPA:LSM (80:10:10) (—).

Em micelas de LPC:LPA (90:10) todos os peptídeos apresentaram comportamento semelhante ao observado na presença de micelas de LPC. Os espectros de CD indicam que a carga negativa de LPA não alterou a estrutura dos peptídeos ligados às micelas de forma significativa.

Na presença de micelas de LPC:LSM (90:10) observou-se novamente que a ligação dos peptídeos levou à aquisição de estrutura secundária em α -hélice. Conhecida como o receptor putativo da toxina em membranas lipídicas, a SM é neste modelo de membrana representada por LSM. A estrutura da cadeia de esfingosina em LSM e as prováveis alterações que a presença desse lipídio causa nas características da micela não foram capazes de alterar significativamente a estrutura dos peptídeos em comparação com LPC.

A presença de ambos os fatores, carga de LPA e cadeia de esfingosina de LSM, em micelas compostas majoritariamente por LPC na proporção LPC:LPA:LSM (80:10:10) também não se mostrou capaz de alterar as estruturas das formas ligadas dos peptídeos estudados.

As curvas de ligação e o ajuste da equação de Hill aos dados experimentais permitiu quantificar a afinidade de cada peptídeo pelos diferentes agregados micelares estudados (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 – Constantes de ligação, K_b (M^{-1} , $\times 10^3$) e coeficiente de cooperatividade (n) calculados a partir dos espectros de CD dos peptídeos em presença de micelas de composição variada em pH 7,0.

	LPC (100)		LPC:LSM (90:10)		LPC:LPA (90:10)		LPC:LPA:LSM (80:10:10)	
	K_b	n	K_b	n	K_b	n	K_b	n
Stl ₁₋₃₁	11,0	1,2	13,3	1,6	11,4	1,3	11,4	1,4
Stl ₁₂₋₃₁	4,4	1,4	4,9	1,2	10,4	1,2	9,0	1,1
Stll ₁₋₃₀	15,9	1,2	15,1	1,3	16,7	1,1	12,9	1,1
Stll ₁₁₋₃₀	9,0	1,3	8,0	1,4	13,2	1,5	9,7	1,5
N-TOAC-Stll ₁₁₋₃₀	12,8	1,2	11,8	1,5	17,6	1,5	12,3	1,3

Todos os peptídeos ligaram-se com afinidade semelhante em micelas de LPC e LPC:LSM (90:10), indicando que o esfingolípido não exerce efeito significativo sobre a estrutura e/ou a afinidade dos peptídeos pelas micelas.

Na presença de LPC e LPC:LSM (90:10), Stll₁₋₃₀ apresentou maior constante de afinidade comparado a Stl₁₋₃₁ (Tabela 4.4). Essa diferença deve-se provavelmente ao maior caráter hidrofóbico do peptídeo de Stll que favoreceria a interação com micelas compostas somente por lisofosfolípídios zwitteriônicos, provavelmente por meio de interações com as cadeias acila da micela. Os peptídeos longos de 31 e 30 resíduos de Stl e Stll, respectivamente, apresentaram maior afinidade pelas micelas em comparação com os respectivos fragmentos de 20 resíduos (Tabela 4.4). A presença de interações hidrofóbicas entre as regiões 1-10 dos peptídeos longos e as cadeias acila dos lisofosfolípídios zwitteriônicos seria responsável pela diferença de afinidade calculada. A importância de interações apolares é evidenciada pela diferença observada entre Stll₁₁₋₃₀, com carga +2 e N-TOAC-Stll₁₁₋₃₀, que possui o N-terminal desprotonado em pH 7,0 e portando carga líquida +1. A simples ausência de uma carga na extremidade N-terminal confere ao peptídeo com TOAC maior índice de hidrofobicidade (Tabela 4.1) e uma maior interação com micelas com carga superficial neutra (Tabela 4.4).

A introdução de 10% de LPA nas micelas de LPC e LPC:LSM ocasionou um aumento significativo na afinidade dos peptídeos Stl₁₂₋₃₁, Stll₁₁₋₃₀ e N-TOAC-Stll₁₁₋₃₀,

pelos agregados lipídicos (Tabela 4.4). Esses peptídeos tiveram a interação favorecida por forças eletrostáticas atrativas, aumentando a afinidade pelas micelas contendo LPA. Os peptídeos mais longos apresentaram pouca ou nenhuma alteração na afinidade pelas micelas contendo LPA, e na presença de LPC:LPA:LSM (80:10:10) todos os peptídeos, exceto Stl₁₋₃₁, apresentaram menor afinidade quando comparados a LPC:LPA (90:10) (Tabela 4.4).

Os efeitos de interações eletrostáticas na interação dos peptídeos com micelas passaram a ser estudados do ponto de vista da carga líquida e posição das cargas nos peptídeos. A conformação e ligação dos peptídeos em micelas de LPC foi estudada por CD em pH 3,0 e 11,0.

Os peptídeos de Stl, assim como observado em pH 7,0, ao se ligarem em micelas de LPC nos pH 3,0 e 11,0, adquirem conformação em α -hélice como indicado pelos espectros de CD (Figs. 4.20 e 4.21).

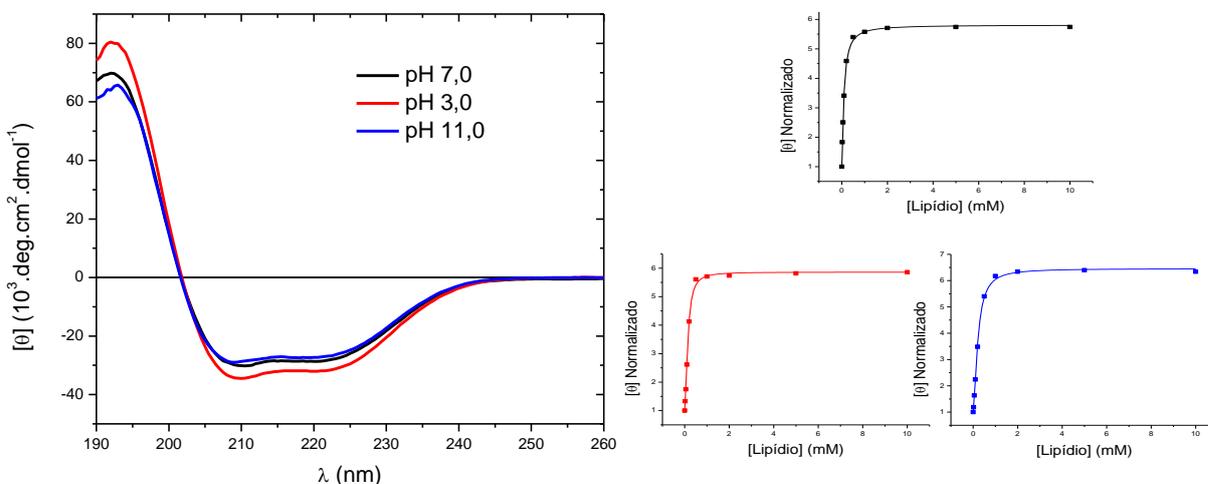


Figura 4.20. Espectros de CD de Stl₁₋₃₁ na presença de 10 mM de micelas de LPC em pH 7,0, 3,0 e 11,0 (esquerda); Intensidades de $[\theta]$ em 222 nm normalizado e curvas de ligação ajustada aos valores experimentais em função da concentração lipídica (direita). pH 7,0 (—), pH 3,0 (—) e pH 11,0 (—).

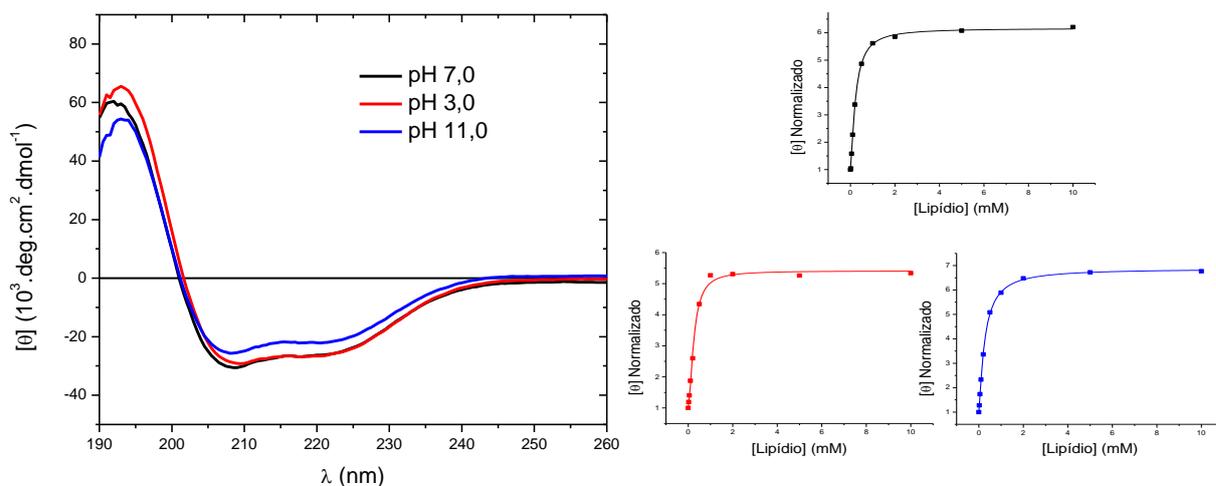


Figura 4.21. Espectros de CD de StI₁₂₋₃₁ na presença de 10 mM de micelas de LPC em pH 7,0, 3,0 e 11,0 (esquerda); Intensidades de $[\theta]$ em 222 nm normalizado e curvas de ligação ajustada aos valores experimentais em função da concentração lipídica (direita). pH 7,0 (—), pH 3,0 (—) e pH 11,0 (—).

Da mesma forma que observado para os peptídeos de StI, em pH 3,0 e 11,0 os peptídeos com a sequência N-terminal de StII, ao interagir com micelas de LPC, adquirem conformação helicoidal (Figs 4.22, 4.32 e 4.24). Nessas condições, o segmento mais longo de 30 resíduos aparentemente apresenta maior afinidade pelas micelas.

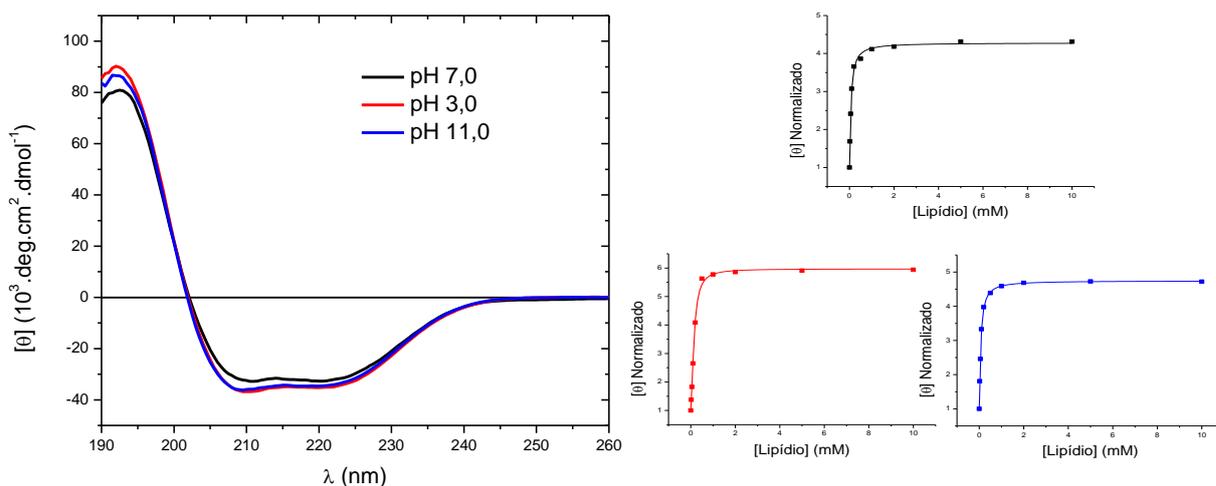


Figura 4.22. Espectros de CD de StII₁₋₃₀ na presença de 10 mM de micelas de LPC em pH 7,0, 3,0 e 11,0 (esquerda); Intensidades de $[\theta]$ em 222 nm normalizado e curvas de ligação ajustada aos valores experimentais em função da concentração lipídica (direita). pH 7,0 (—), pH 3,0 (—) e pH 11,0 (—).

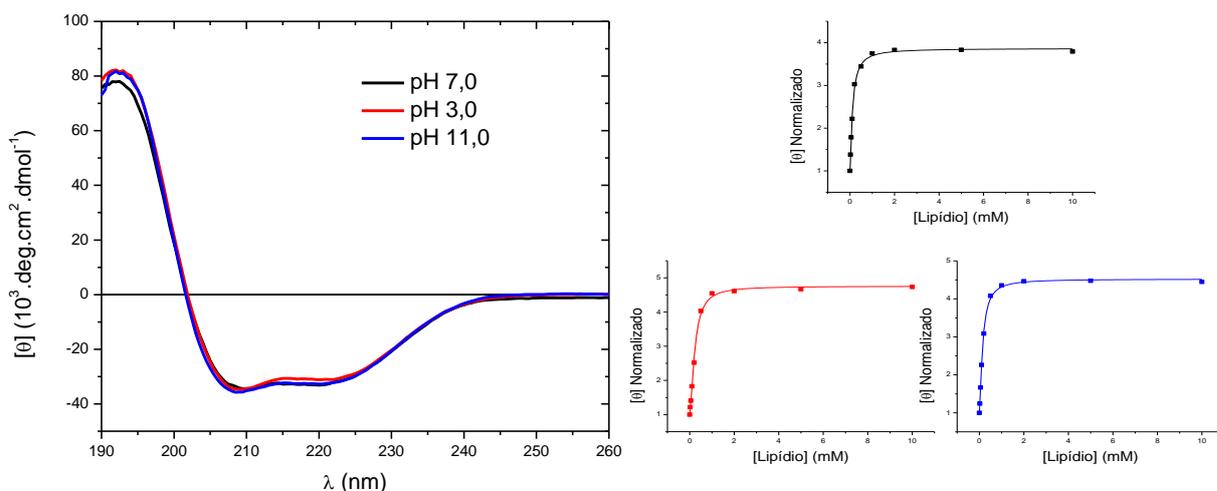


Figura 4.23. Espectros de CD de StII₁₁₋₃₀ na presença de 10 mM de micelas de LPC em pH 7,0, 3,0 e 11,0 (esquerda); Intensidades de $[\theta]$ em 222 nm normalizado e curvas de ligação ajustada aos valores experimentais em função da concentração lipídica (direita). pH 7,0 (—), pH 3,0 (—) e pH 11,0 (—).

O peptídeo com TOAC em pH 3,0, agora com o N-terminal protonado e carga equivalente à de StII₁₁₋₃₀ apresenta comportamento conformacional e de afinidade pelas micelas semelhante ao do peptídeo não marcado (Figs. 4.23 e 4.24).

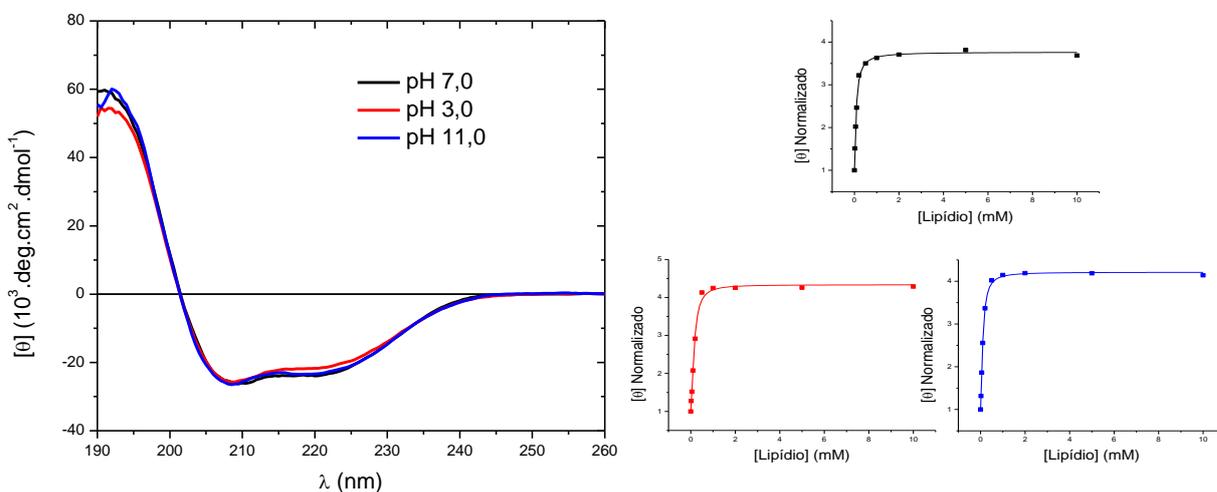


Figura 4.24. Espectros de CD de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ na presença de 10 mM de micelas de LPC em pH 7,0, 3,0 e 11,0 (esquerda); Intensidades de $[\theta]$ em 222 nm normalizado e curvas de ligação ajustada aos valores experimentais em função da concentração lipídica (direita). pH 7,0 (—), pH 3,0 (—) e pH 11,0 (—).

Todos os peptídeos estudados, que em solução aquosa em pH 3,0 apresentam estrutura essencialmente randômica, foram capazes de interagir com as micelas de LPC adquirindo conformação em α -hélice. As curvas de ligação indicam

que os peptídeos apresentam menor afinidade pelas micelas de LPC em pH 3,0 do que em pH 7,0.

Em pH 11,0, os peptídeos novamente apresentam a transição de conformação randômica para helicoidal ao se ligarem a micelas de LPC. E os segmentos mais longos de StI e StII apresentam mais uma vez maior afinidade aparente pelas micelas em comparação com os peptídeos de 20 resíduos.

A partir das curvas de ligação obtidas relacionando a intensidade de $[\theta]$ em 222 nm com a concentração lipídica, e o ajuste da equação de Hill aos dados experimentais, as constantes de ligação dos peptídeos às micelas de LPC em pHs 3,0, 7,0 e 11,0 foram calculadas (Tabela 4.5).

Tabela 4.5 – Constantes de ligação (M^{-1} , $\times 10^3$) e coeficiente de cooperatividade (n) calculadas a partir dos espectros de CD dos peptídeos na presença de micelas de LPC em pHs 3,0, 7,0 e 11,0.

	pH 3,0		pH 7,0		pH 11,0	
	K_b	n	K_b	n	K_b	n
StI ₁₋₃₁	7,1	1,8	11,0	1,2	4,7	1,6
StI ₁₂₋₃₁	3,9	1,7	4,5	1,4	3,8	1,2
StII ₁₋₃₀	6,9	1,7	15,9	1,2	14,9	1,2
StII ₁₁₋₃₀	4,4	1,6	9,0	1,3	6,8	1,4
N-TOAC-StII ₁₁₋₃₀	6,6	1,7	12,8	1,2	10,0	1,5

As diferenças observadas na ligação entre os peptídeos longos de StI e StII não se devem somente às substituições não conservativas nas posições 2 e 9. Com a mesma carga líquida nos diferentes pH estudados, StI₁₂₋₃₁ e StII₁₁₋₃₀ ligam-se às micelas com afinidades diferentes. Como no caso dos peptídeos longos, o segmento 11-30 de StII apresenta maiores constantes de ligação quando comparado à sequência 12-31 de StI. Nessa região, um resíduo de ácido glutâmico encontra-se em posições diferentes nas toxinas, 16 em StI e 22 em StII, conferindo distinta distribuição e possível neutralização de cargas ao longo das moléculas e fazendo com que o peptídeo de StII ligue-se com maior afinidade aos agregados lipídicos.

A adição de um resíduo e a mudança de uma carga, no amino grupo da extremidade N-terminal, também foram capazes de alterar a constante de ligação do peptídeo N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ em comparação com StII₁₁₋₃₀ (Tabelas 4.4 e 4.5)

Por meio dos espectros de CD obtidos na presença de 5 mM de LPC, condição em que todo o peptídeo na amostra encontra-se na forma ligada, calculou-se o conteúdo de estrutura secundária de cada um dos segmentos (Tabela 4.6). Todos os peptídeos, segundo qualitativamente indicado pelos espectros de CD, adquirem conformação helicoidal. Os cálculos indicam que, nos três pHs estudados, os peptídeos apresentam entre 66% e 91% de α -hélice (80% em média), praticamente nenhum resíduo em conformação do tipo fita- β e o restante desestruturado (Tabela 4.6). A estrutura dos peptídeos ligados em micelas, de forma geral, é a mesma, independentemente do estado de ionização da molécula e diferentemente dos valores das constantes de ligação, que variam com o pH.

Tabela 4.6 – Conteúdo de estrutura secundária dos peptídeos ligados em micelas de LPC calculado a partir dos espectros de CD. Porcentagem (%) e número de resíduos (N).

	pH	% α -hélice (N)	% Folha- β (N)	% Randômica (N)	R ²
Stl ₁₋₃₁	3,0	87 (27)	0	13 (4)	0,995
	7,0	74 (23)	0	26 (8)	0,997
	11,0	77 (24)	0	23 (7)	0,996
Stl ₁₂₋₃₁	3,0	79 (16)	0	21 (4)	0,991
	7,0	74 (15)	0	26 (5)	0,986
	11,0	66 (13)	7 (2)	27 (5)	0,987
StII ₁₋₃₀	3,0	80 (24)	3 (1)	17 (5)	0,985
	7,0	83 (25)	3 (1)	14 (4)	0,997
	11,0	91 (27)	0	9 (3)	0,996
StII ₁₁₋₃₀	3,0	88 (18)	0	12 (2)	0,995
	7,0	85 (17)	0	15 (3)	0,996
	11,0	89 (18)	0	11 (2)	0,995
N-TOAC-StII ₁₁₋₃₀	3,0	88 (18)	0	12 (4)	0,995
	7,0	72 (15)	0	28 (6)	0,992
	11,0	71 (15)	0	29 (6)	0,992

Estudos de NMR indicam que Stl₁₋₃₁ apresenta dois segmentos de hélice quando ligado em micelas de DPC (Castrillo et al., 2010). Ainda, as predições obtidas por PEPFOLD indicam a provável presença de dois segmentos de hélice nos peptídeos de 31 e 30 resíduos das isoformas Stl e StII. O número de resíduos em

conformações helicoidal e randômica encontrados nos estudos de CD é compatível com a presença de dois segmentos em α -hélice nas estruturas das moléculas.

Os peptídeos de 20 resíduos de StI e StII representariam apenas um dos segmentos helicoidais presentes no N-terminal das toxinas na forma ligada à membrana. O alto conteúdo de α -hélice calculado para os espectros de CD das formas ligadas indica que praticamente toda a molécula encontra-se em tal conformação e apenas poucos resíduos nas extremidades N e C-terminal estariam em conformação randômica.

Considerando a presença de dois segmentos helicoidais em StI₁₋₃₁ e StII₁₋₃₀ e que a região flexível entre os segmentos estaria ao redor da posição 10, a subtração do número de resíduos em hélice no peptídeo curto do número de resíduos em hélice do respectivo peptídeo longo resultaria no número de resíduos em hélice no segmento 1-10. Nas duas toxinas, calculou-se que aproximadamente 7 resíduos em α -hélice estariam presentes no segmento 1-10 do N-terminal.

4.4.1.2 Estudos do peptídeo N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ em micelas por EPR

Empregando a espectroscopia de EPR, foi estudada a interação do peptídeo N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ com micelas de diferentes composições lipídicas em diferentes pHs. A interação do peptídeo com as micelas é evidenciada pelo aparecimento de linhas espectrais características da presença de duas populações, uma população com maior mobilidade (peptídeo em solução, linhas estreitas) e uma população com menor mobilidade (peptídeo ligado às micelas, linhas alargadas).

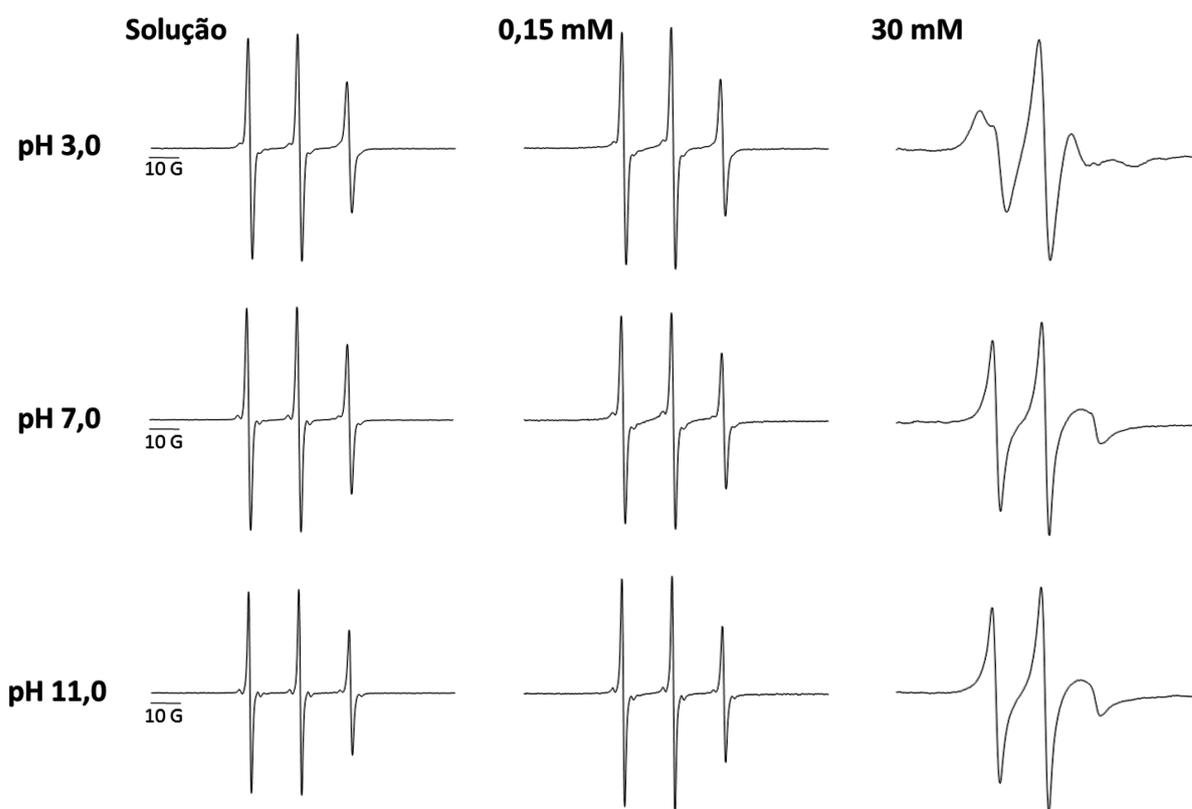


Figura 4.25. Espectros de EPR de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ em solução e na presença de micelas de LPC em pHs 3,0, 7,0 e 11,0. [Peptídeo] = 40 μ M.

Em baixas concentrações de LPC, em pH 3,0, é possível observar a presença de duas populações do peptídeo, em solução e ligada nas micelas. É possível observar no espectro de EPR do peptídeo contendo TOAC que este, na presença de 30 mM de LPC, encontra-se ligado às micelas em grande extensão. A sonda no peptídeo ligado em micelas de LPC encontra-se fortemente imobilizada como é possível observar pela presença de extremos internos e externos no espectro de EPR (Fig. 4.25).

Em pH 7,0 a ligação de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ em micelas de LPC se deu em maior extensão em relação ao observado em pH 3,0, conforme indicado pelo valor calculado do coeficiente de partição, posteriormente convertido em constante de ligação conforme descrito na seção 3.6.9 (Tabela 4.7). O espectro de linhas alargadas referente à população ligada nas micelas aumenta de intensidade conforme a concentração de LPC aumenta, e, na presença de 30 mM de LPC, uma grande fração do peptídeo encontra-se ligada aos agregados lipídicos (Fig. 4.25).

Diferentemente do observado em pH 3,0, a sonda do peptídeo ligado aos agregados lipídicos em pH 7,0 apresenta maior mobilidade (Fig. 4.25). Embora ocorra um alargamento considerável das linhas, indicando que a mobilidade da sonda foi diminuída em relação à experimentada pelo peptídeo em solução, não é possível notar a presença de extremos internos e externos no espectro do peptídeo. Em pH 11,0, o peptídeo apresentou comportamento semelhante ao observado em pH 7,0 (Fig. 4.25).

Os espectros de EPR do peptídeo na presença de micelas de LPC:LSM (90:10) também apresentam duas populações da moléculas contendo TOAC indicando que ocorre interação entre N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ e as micelas nos três pHs estudados (Fig. 4.26). Em baixas concentrações lipídicas é possível observar nos espectros em pH 7,0 uma menor presença da população imobilizada, indicando menor afinidade do peptídeo pela micela de LPC:LSM do que pela micela de LPC nesse pH (Fig. 4.26).

Em 30 mM de LPC:LSM (90:10) o peptídeo está praticamente todo ligado nos três pH estudados. Assim como observado na presença de micelas de LPC, a sonda no peptídeo em pH 3,0 está mais imobilizada em relação aos pHs 7,0 e 11,0.

A menor ligação aparente do peptídeo em micelas contendo LSM em relação a micelas de LPC deve-se provavelmente ao maior empacotamento das micelas contendo LSM. O lisoesfingofosfolípido possui dois grupos (amina e hidroxila livres) capazes de estabelecer pontes de hidrogênio intermoleculares que poderiam levar ao aumento do empacotamento molecular do agregado e diminuir a extensão da interação com o peptídeo. LPC possui apenas um grupo hidroxila livre.

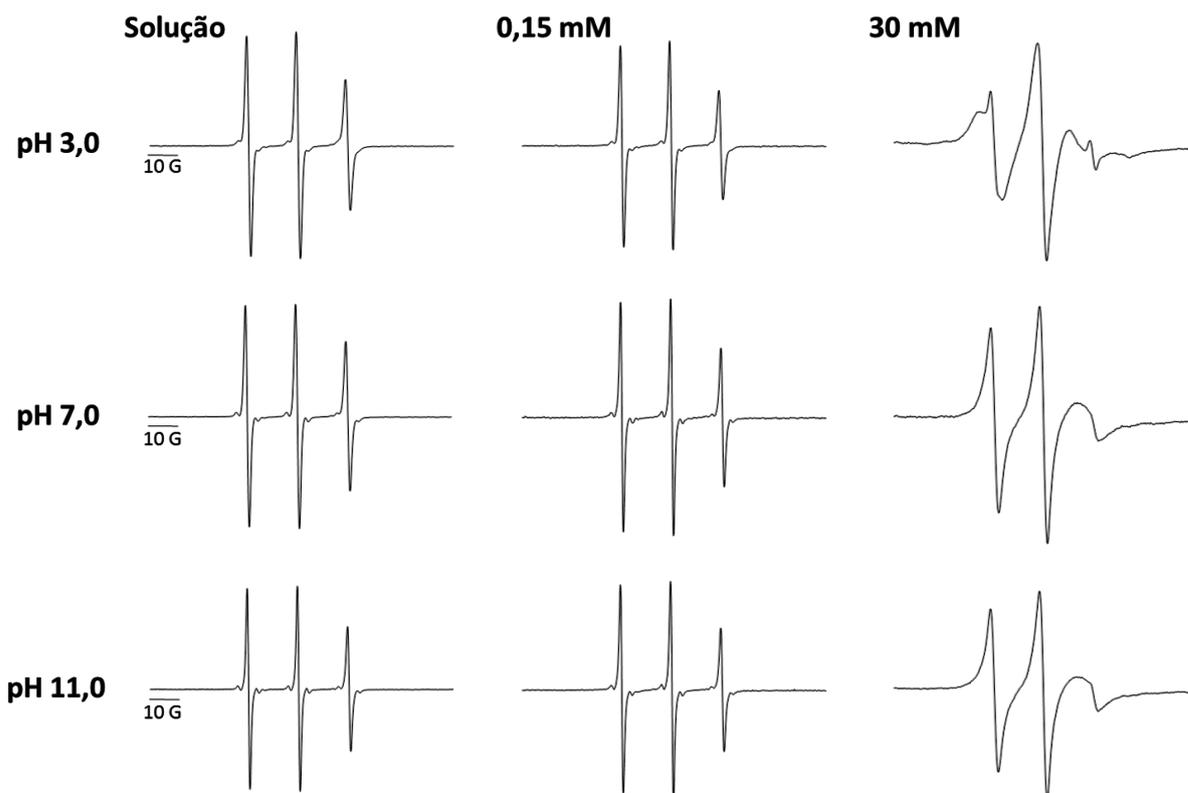


Figura 4.26. Espectros de EPR de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ em solução e na presença de micelas de LPC:LSM (90:10) em pH 3,0, 7,0 e 11,0. [Peptídeo] = 40 μ M.

Espectros de EPR de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ que apresentam duas populações com diferentes mobilidades indicam que o peptídeo ligou-se a micelas contendo o lisofosfolípido carregado negativamente LPA, de composição LPC:LPA (90:10) nos três pHs estudados (Fig. 4.27). Novamente, o peptídeo apresentou maior afinidade pelas micelas em pH 7,0 (Fig. 4.27), evidenciada pela maior presença da população imobilizada nos espectros de EPR obtidos em baixas concentrações lipídicas. Na presença de 30 mM de lipídio em pH 3,0, a sonda apresenta-se altamente imobilizada (Fig 4.27), gerando espectro com extremos internos e externos. Em pH 7,0 e 11,0 observa-se maior mobilidade da sonda (Fig. 4.27).

Em relação a micelas compostas por LPC e LPC:LSM (90:10), em pH 7,0 (Figs. 4.25 e 4.26), é possível notar que o peptídeo apresenta maior afinidade pelas micelas contendo LPA (Fig. 4.27). Interações eletrostáticas entre o LPA, de carga líquida negativa, e o peptídeo, que possui nesse pH carga líquida positiva, são as responsáveis pela diferença observada em relação a micelas compostas apenas por LPC e LSM (zwitteriônicos).

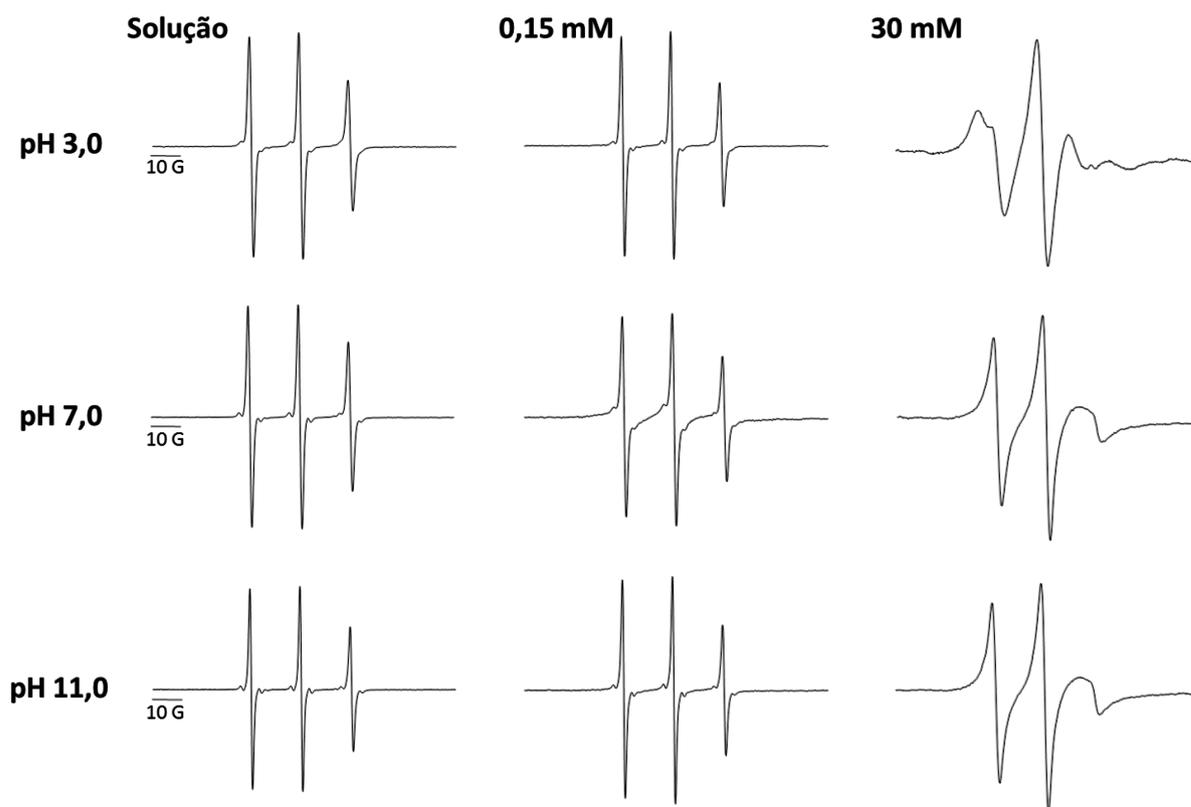


Figura 4.27. Espectros de EPR de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ em solução e na presença de micelas de LPC:LPA (90:10) em pH 3,0, 7,0 e 11,0. [Peptídeo] = 40 μ M.

Frente a micelas de LPC:LPA:LSM (80:10:10), o peptídeo se comportou de forma semelhante ao observado em micelas de LPC:LPA (90:10) (Fig. 4.28). Novamente, o resíduo de TOAC apresenta maior imobilização em pH 3,0 e uma maior afinidade pelas micelas em pH 7,0 (Fig 4.28).

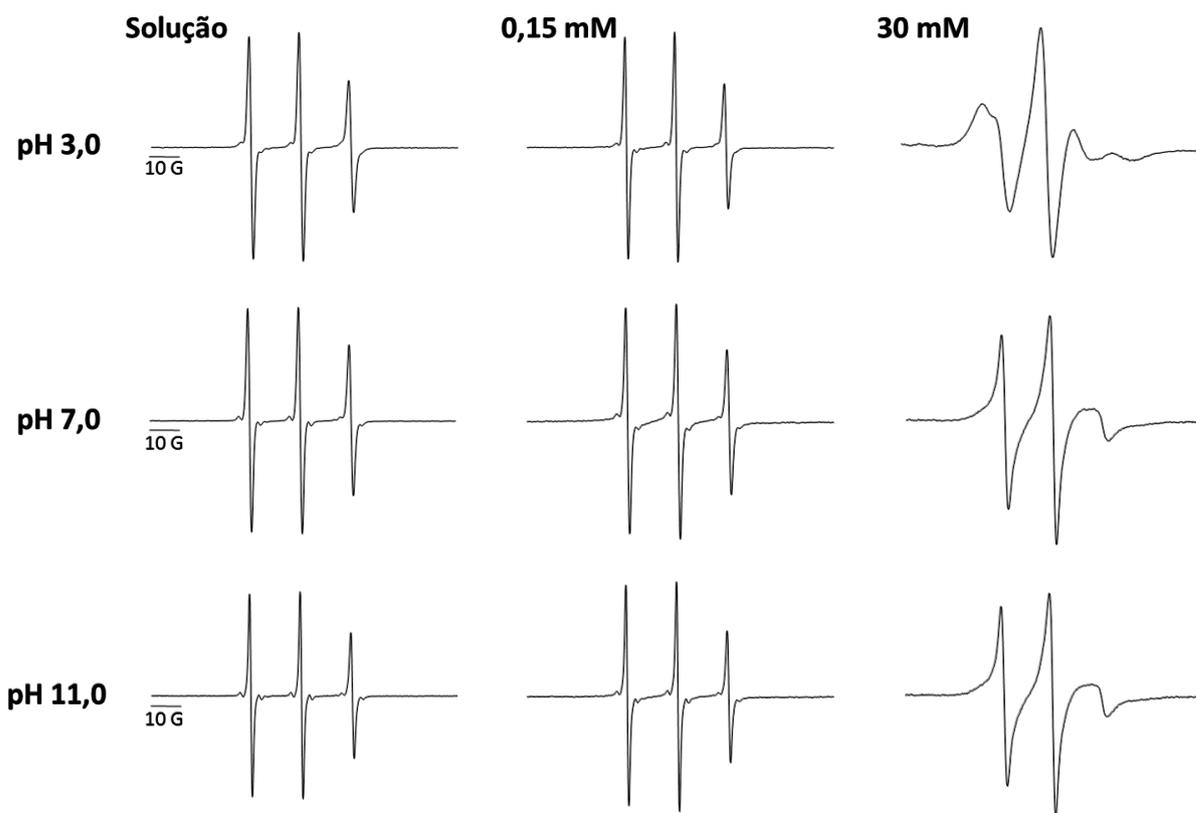


Figura 4.28. Espectros de EPR de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ em solução e na presença de micelas de LPC:LPA:LSM (80:10:10) em pH 3,0, 7,0 e 11,0. [Peptídeo] = 40 μ M.

A partir dos espectros de EPR foi calculado o coeficiente de partição do peptídeo, posteriormente convertido em constante de ligação conforme descrito na seção 3.6.9 (Tabela 4.7).

Tabela 4.7 – Constante de ligação K_b (M^{-1} , $\times 10^3$) de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ em micelas^a.

pH (carga do peptídeo)	LPC (100)	LPC:LSM (90:10)	LPC:LPA (90:10)	LPC:LPA:LSM (80:10:10)
3,0 (+4,7)	$2,9 \pm 0,9$	$3,9 \pm 0,9$	$2,9 \pm 0,5$	$3,4 \pm 0,5$
7,0 (+2,0)	$6,9 \pm 1,5$	$5,9 \pm 0,9$	18 ± 5	17 ± 4
11,0 (-1,3)	$4,5 \pm 0,5$	$4,4 \pm 0,5$	$5,9 \pm 0,9$	$5,3 \pm 0,9$

^aCoeficiente de partição calculado para concentração total de lipídio de 0,15 mM \pm Desvio padrão

Para todas as composições de micelas estudadas, a afinidade de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ pelos lipídios foi maior em pH 7,0. A diferença de afinidade entre os sistemas em pH 7,0 e os sistemas em pH 3,0 e 11,0 é ainda mais acentuada em micelas contendo LPA (Tabela 4.7).

A maior extensão da ligação ocorreu em sistemas em pH 7,0, condição em que o a região entre os resíduos 18 e 30 do peptídeo contendo TOAC apresenta carga líquida +1, enquanto que em pHs 3,0 e 11,0 tal região apresenta carga líquida +4 e -2, respectivamente (Fig. 4.29).

A maior extensão da interação em micelas contendo o lisofosfolípido carregado negativamente LPA comparada a micelas compostas apenas por lisofosfolípidos zwitteriônicos indica que forças eletrostáticas têm um papel muito importante na ligação. Outra evidência da importância de forças eletrostáticas é a variação da extensão da ligação em função do pH nos sistemas com LPA. A extensão da ligação do peptídeo a micelas foi maior em pH 11,0 em relação ao sistemas em pH 3,0.

Pelo coeficiente de partição, foram calculadas as porcentagens do peptídeo em solução e na membrana em 30 mM de lipídios. Em todos os casos, a porcentagem de peptídeo ligado nas micelas foi maior de 98,9%, indicando que os espectros observados nessa condição referem-se essencialmente à forma ligada.

Acredita-se que, devido ao empacotamento dos lipídios nas micelas, a ligação do peptídeo nesse modelo de membrana possui uma considerável contribuição de interações entre a face apolar da hélice e as cadeias acila dos lipídios.

A análise da roda helicoidal de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ e da distribuição de cargas dos resíduos em pH 3,0, 7,0 e 11,0 contribuem para o entendimento da afinidade do peptídeo pelas membranas modelo estudadas.

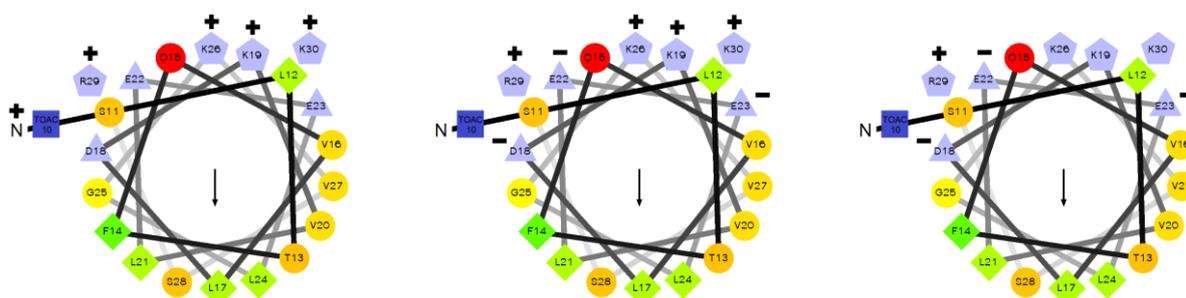


Figura 4.29. Roda helicoidal de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ com cargas da extremidade N-terminal e das cadeias laterais ionizáveis e direção vetor de momento hidrofóbico em pHs 3,0, 7,0 e 11,0.

A maior imobilização de TOAC nas membranas em pH 3,0 ocorre provavelmente devido ao fato de a extremidade N-terminal do peptídeo nessa

condição estar na forma protonada, com carga positiva. A presença de carga no grupo amino terminal possibilita que interações eletrostáticas com os grupos fosfato dos lipídios ancoram o resíduo.

Em pH 3,0, na forma predominante em solução, o peptídeo possui 5 cargas positivas e nenhuma carga negativa, enquanto no pH 7,0 a carga líquida de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ é +1. Em pH 11,0 aproximadamente 25% de cada resíduo de lisina encontram-se protonados, conferindo uma carga líquida de -1,3 ao peptídeo. A forma predominante em pH 11,0 possui carga líquida -2. As cargas das cadeias laterais foram atribuídas considerando o peptídeo em solução e os valores de pKa teóricos das cadeias laterais ionizáveis. No ambiente da membrana os valores de pKa podem ser alterados, de modo que as cargas acima atribuídas eventualmente não reflitam o estado de ionização do peptídeo ligado.

A afinidade do peptídeo por micelas contendo o lipídio carregado negativamente LPA foi consideravelmente maior em pH 7,0 em relação a todos os outros sistemas de micelas estudados (Tabela 4.7). Em pH 11,0, o peptídeo possui carga líquida negativa de -1,3 e as micelas 20 mol% de carga líquida negativa. A maior repulsão eletrostática em pH 11,0 diminui a afinidade do peptídeo pelas micelas em comparação com os sistemas em pH 7,0

A interação de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ com micelas é regida por um balanço entre as contribuições eletrostáticas e hidrofóbicas.

A medida do desdobramento hiperfino (a_N , G) nos espectros de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ em solução e na presença das diferentes composições de micelas estudadas foi feita nos três pHs estudados (Tabela 4.8). Tal parâmetro é sensível à polaridade do ambiente. Também foram calculadas as variações de a_N na passagem do peptídeo da solução para as micelas. Nos espectros com 30 mM de lisofosfolipídios em pH 7,0 e 11,0, o desdobramento hiperfino isotrópico da forma ligada com menor restrição de mobilidade foi calculado pela separação das linhas nos espectros. Um estudo de simulação de espectros de EPR em diferentes pH indicam que os espectros em pH 7,0 e 11,0 representam apenas uma população do peptídeo de modo que o desdobramento hiperfino possa ser obtido por tal medida.

Tabela 4.8 – Valores de a_N (G) nos espectros de EPR de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ e variação de a_N (G) na passagem do peptídeo da solução para o ambiente das micelas. Valores de S calculados para os espectros de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ ligado a micelas em pH 3,0.

	pH 3,0	pH 7,0	pH 11,0	S em pH 3,0
Solução	16,32	16,57	16,57	
LPC	15,31 (- 1,01)	16,13 (- 0,44)	16,08 (- 0,49)	0,504
LPC:LSM (90:10)	15,45 (- 0,87)	16,03 (- 0,54)	16,18 (- 0,39)	0,515
LPC:LPA (90:10)	15,31 (- 1,01)	16,08 (- 0,49)	16,18 (- 0,39)	0,509
LPC:LPA:LSM (80:10:10)	15,51 (- 0,81)	16,13 (- 0,44)	16,18 (- 0,39)	0,524

É possível notar em todos os casos uma diminuição no valor de a_N confirmando a ligação dos peptídeo às micelas e a passagem para um ambiente de menor polaridade. As maiores variações de a_N em pH 3,0 estariam relacionadas com uma mudança de polaridade mais pronunciada nessa condição indicando que a posição do TOAC na micela varia com o pH, e que em pH 3,0 o peptídeo estaria localizado mais profundamente na região hidrofóbica. Em pH 3,0, em todos os casos, os espectros do peptídeo em altas concentrações de lisofosfolipídios apresentaram linhas muito alargadas e extremos internos e externos, indicando alta imobilização da sonda. Em pH 7,0 e 11,0 foi possível notar o alargamento das linhas na passagem do peptídeo para as micelas entretanto, nessas condições a sonda no peptídeo ligado nas micelas apresenta maior mobilidade em relação ao pH 3,0.

O peptídeo contendo TOAC, uma vez ligado ao agregado lipídico, passa a constituir uma sonda sensível à mobilidade no ambiente das membranas modelo. Espectros que apresentam extremos externos e internos indicam uma alta imobilização da sonda no peptídeo no ambiente das micelas e permitem o cálculo do parâmetro de ordem (S) para medida do grau de imobilização da sonda.

Foram calculados os valores de S de nos espectros de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ ligado em micelas de diferentes composições em pH 3,0 (Tabela 4.8). O peptídeo ligado em micelas contendo LSM apresentou maior parâmetro de ordem em comparação com micelas sem LSM. O maior parâmetro de ordem, e a menor extensão da ligação do peptídeo nos agregados contendo LSM, poderiam estar relacionados com o maior empacotamento que o esfingolipídio confere à micela. LSM possui um grupamento amina e um grupamento hidroxila capazes de estabelecer pontes de hidrogênio intermoleculares, aumentando o empacotamento

próximo à região das cabeças polares. LPC apresenta somente um grupo hidroxila livre. O aumento do empacotamento em micelas com LSM é refletido na menor habilidade do peptídeo interagir com os agregados.

Também se realizaram estudos de EPR do peptídeo com TOAC fixando a concentração de lisofosfolípidios em 20 mM e variando o pH entre 3,0 e 11,0. Os espectros indicam que, na presença de LPC 20 mM, o resíduo paramagnético encontra-se fortemente imobilizado nas micelas em pH 3,0 e 4,0. Em pH 5,0 observa-se a presença de duas populações ligadas às micelas com diferentes mobilidades (Fig. 4.30). Entre os pHs 6,0 e 11,0, os espectros de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ apresentam apenas uma população com maior mobilidade. Nessa faixa de pH observa-se pouca mudança na forma dos espectros, indicando que, quando o pH é variado de 6,0 até 11,0, não ocorrem grandes variações na dinâmica de TOAC decorrente de interação (Fig. 4.30).

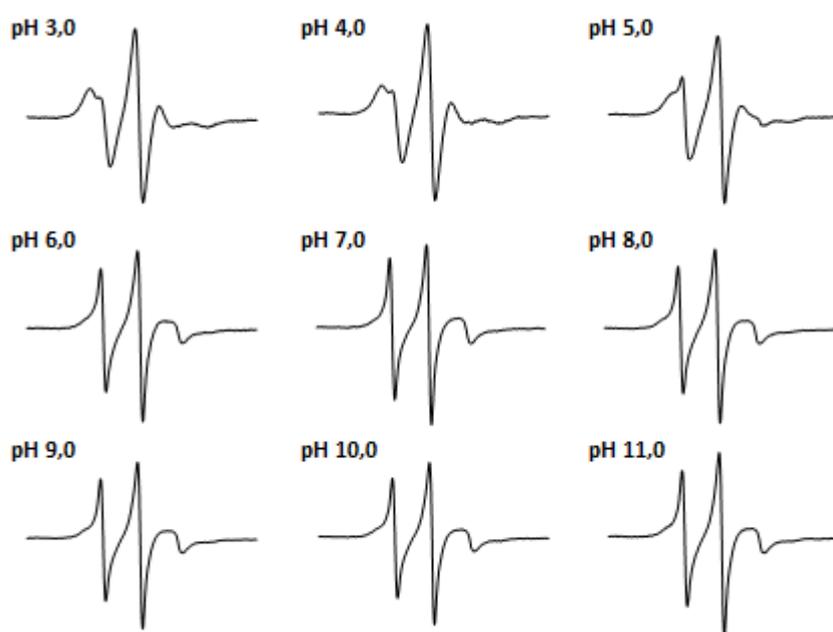


Figura 4.30. Espectros de EPR de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ em micelas de LPC 20 mM em diferentes pHs. [Peptídeo] = 30 μ M. A varredura total do campo é 100 G.

A interação de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ com micelas de LPC:LSM (90:10) também foi investigada em diferentes pHs e, assim como observado com LPC, os espectros indicaram maior grau imobilização em pHs 3,0 e 4,0. Em pH 5,0 e 6,0 nota-se o aparecimento de linhas mais estreitas e entre pH 7,0 e 11,0, os espectros indicam a presença somente da população ligada com maior mobilidade (Fig. 4.31).

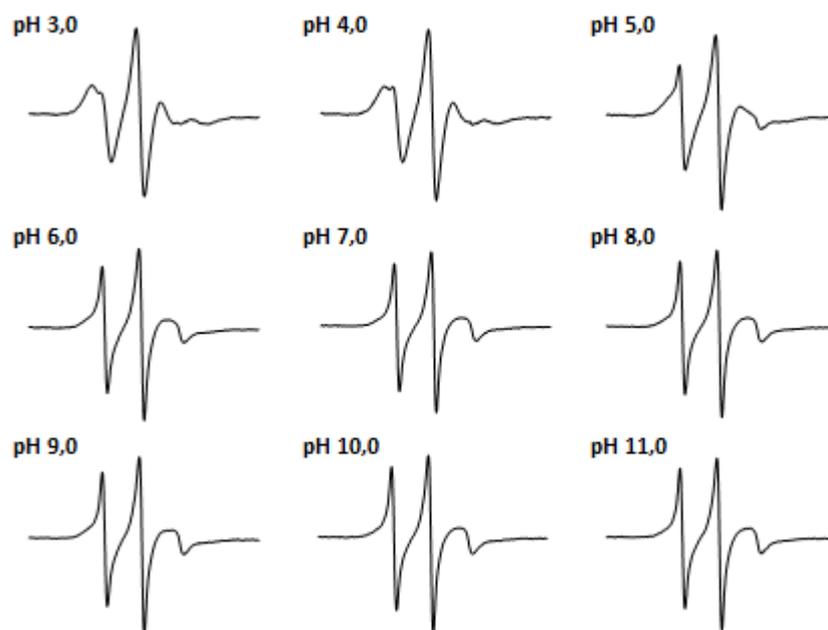


Figura 4.31. Espectros de EPR de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ em micelas de LPC:LSM (90:10) 20 mM em diferentes pHs. [Peptídeo] = 30 μ M. A varredura total do campo é 100 G.

O espectros de EPR de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ na presença de 20 mM de LPC:LPA (90:10) (Fig. 4.32) ou de LPC:LPA:LSM (80:10:10) (Fig 4.33) em diferentes pHs evidenciam um perfil de interação peptídeo-micela em função do pH semelhante ao apresentado para as micelas contendo apenas lisofosfolipídios zwitteriônicos.

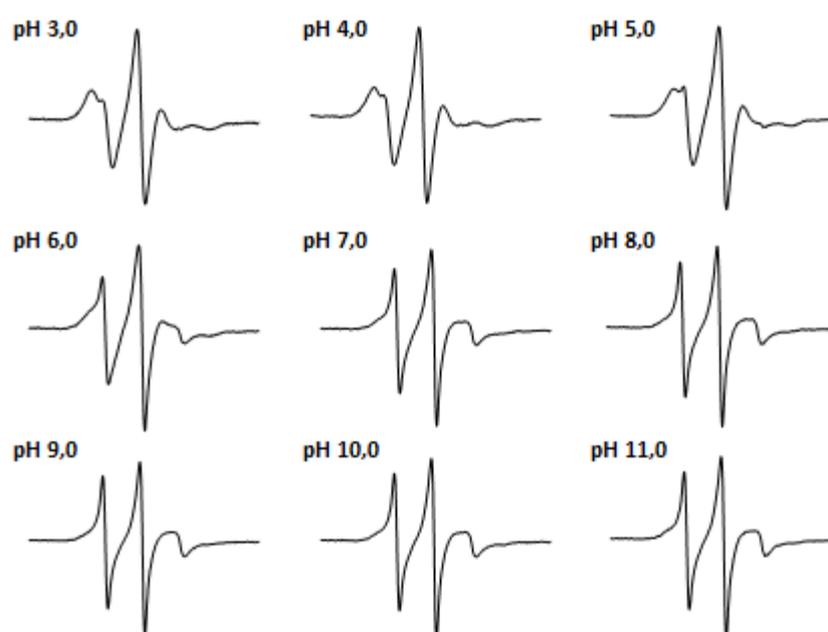


Figura 4.32. Espectros de EPR de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ em micelas de LPC:LPA (90:10) 20 mM em diferentes pHs. [Peptídeo] = 30 μ M. A varredura total do campo é 100 G.

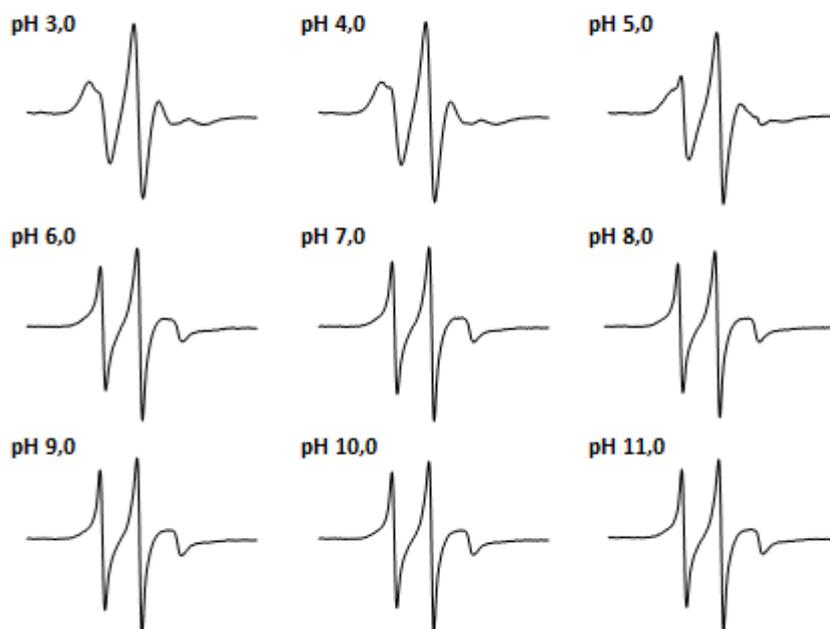


Figura 4.33. Espectros de EPR de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ em micelas de LPC:LPA:LSM (80:10:10) 20 mM em diferentes pHs. [Peptídeo] = 30 μ M. A varredura total do campo é 100 G.

É possível observar que N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ encontra-se praticamente totalmente ligado às micelas de LPC:LPA (90:10) e LPC:LPA:LSM (80:10:10) em pH 3,0 e 4,0 (Figs. 4.32 e 4.33). Em pH 5,0 é possível notar o surgimento de linhas estreitas. Em pH 6,0 o percentual de moléculas do peptídeo ligadas, mas com maior mobilidade aumenta, evidenciado pelo aumento de intensidade das linhas espectrais características dessa população em relação aos espectros obtidos em pH 5,0. Entre os 7,0 e 11,0 observamos somente a população com maior mobilidade.

4.4.1.3 Estudos da interação dos peptídeos com micelas de LPC por SAXS

A fim de se obter maiores informações acerca da interação entre os peptídeos e micelas de LPC, realizamos medias de espalhamento de raios-X a baixos ângulos, SAXS, no Laboratório nacional de Luz Síncrotron, LNLS.

Para obtermos informações estruturais das micelas de LPC em ausência e presença dos peptídeos, realizamos um ajuste aos dados experimentais, supondo que o agregado micelar possa ser descrito por um elipsoide prolato. Entre outras propriedades, este modelo é capaz de descrever o raio da região parafínica (R_{Par}), a

anisometria, a espessura e densidade eletrônica (ρ_{Core}) da região das cabeças polares, a carga efetiva da partícula espalhadora e também uma estimativa do número de agregação micelar.

Em ausência de peptídeo, percebemos que a curva de SAXS do sistema composto por LPC 20 mM (Fig. 4.34 – pontos pretos) apresenta um pico largo centrado na região de $q \sim 0,12 \text{ \AA}^{-1}$. Este tipo de pico, largo e nesta região é uma indicação clara da presença de estruturas heterogêneas em solução. Neste caso tais estruturas heterogêneas são as micelas de LPC.

O melhor ajuste obtido para este sistema, considerando este modelo pode ser apreciado na figura 4.34 (linha sólida vermelha) e os parâmetros estruturais deste agregado micelar estão descritos na Tabela 4.9.

Estudos anteriores de SAXS focando nas alterações no tamanho e forma de micelas de LPC em decorrência da interação com o peptídeo correspondente aos 30 resíduos N-terminais (StII₁₋₃₀) (Paulino, 2010) mostraram que o peptídeo é capaz de alterar de forma significativa a estrutura das micelas de LPC. Em presença de 2 mM de StII₁₋₃₀ (Fig. 4.34, pontos vermelhos) as micelas de LPC se tornam mais esféricas (Fig. 4.34). Esse efeito poderia estar relacionado à capacidade da hélice N-terminal da esticolisinas de induzir curvatura positiva em lipídios para estruturação do poro toroidal.

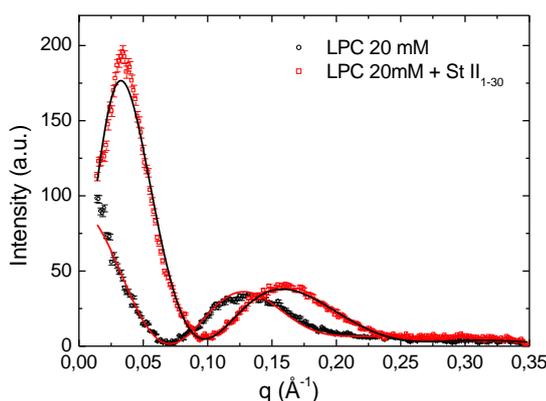


Figura 4.34. Curvas de SAXS de LPC 20 mM na ausência e presença de 2,0 mM de StII₁₋₃₀ (Paulino, 2010).

Na presença dos peptídeos, as curvas de SAXS das micelas de LPC foram alteradas, indicando que a interação é capaz de modificar as características estruturais dos agregados lipídicos Fig (4.35).

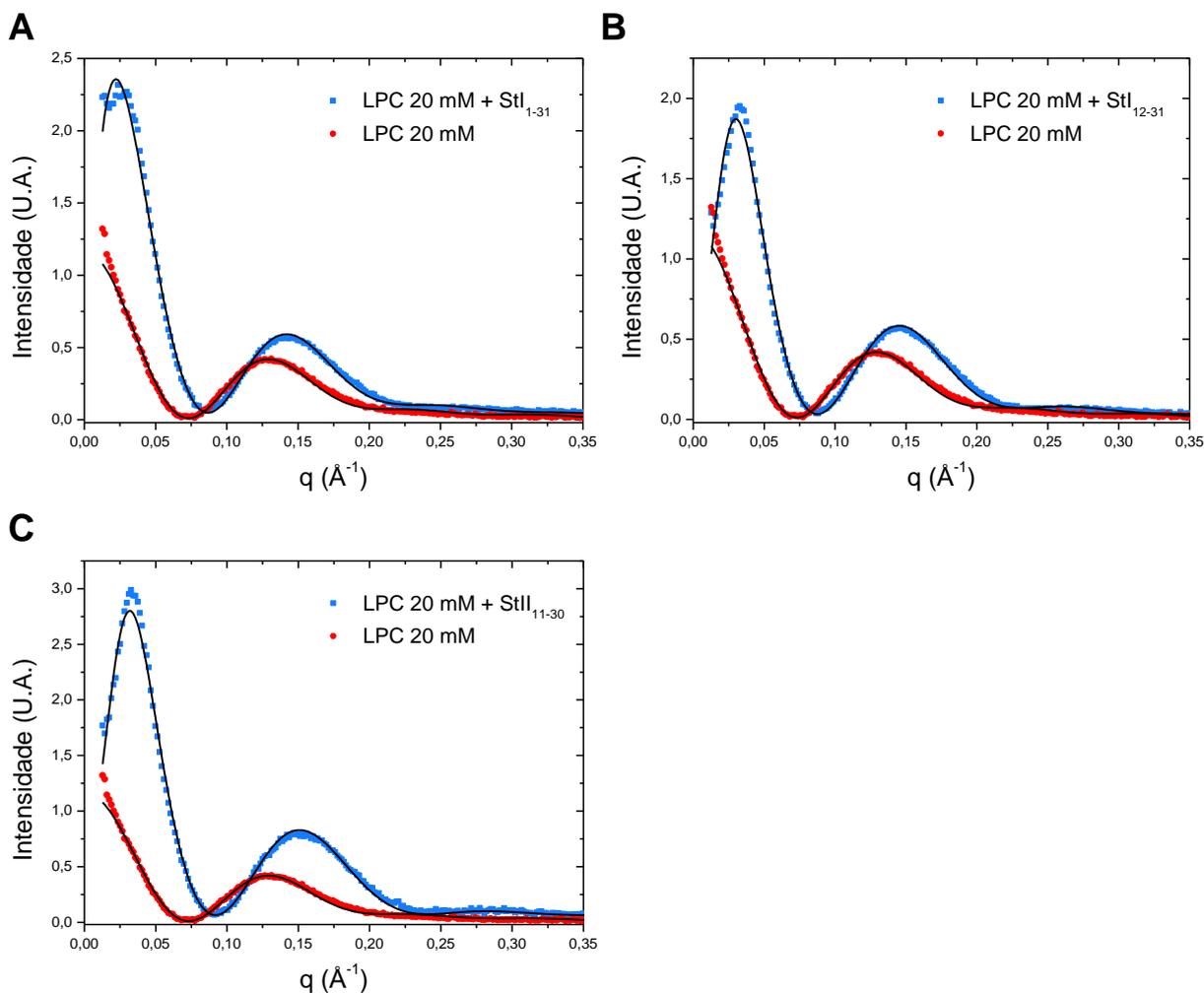


Figura 4.35. Curvas de SAXS de LPC 20 mM na ausência ou presença de 2 mM dos peptídeos StI₁₋₃₁ (A), StI₁₂₋₃₁ (B) e StII₁₁₋₃₀ (C).

O aumento de intensidade de espalhamento em valores de $q < 0,05 \text{ \AA}^{-1}$ (região de pequenos valores de q) é indicativo do aparecimento de uma função de interferência entre as micelas, indicando que nessas condições a aproximação para sistemas diluídos (onde a separação entre as partículas espalhadoras é suficiente para que não ocorra interação entre elas) não é mais válida, como no caso em ausência de peptídeo. O aparecimento de tal função deve-se provavelmente ao desbalanço de cargas na superfície do agregado, induzido pela presença dos peptídeos. A curva de SAXS para o sistema composto por StI₁₋₃₁ 2 mM (que possui carga líquida 0) em presença de LPC 20mM possui um pico pouco pronunciado na região de $q \sim 0,025 \text{ \AA}^{-1}$ (Fig. 4.35A) indicando uma menor influência deste peptídeo em comparação ao StI₁₂₋₃₁ (Fig. 4.35B) e do StII 11-30 (Fig. 4.35C). É importante mencionar que ambos StI₁₂₋₃₁ quanto StII₁₁₋₃₀ possuem carga líquida +2, sendo este um dos prováveis motivos para os diferentes comportamentos observados. Além disso, podemos

observar um deslocamento do primeiro mínimo da curva de espalhamento (na região de $q \sim 0,07 \text{ \AA}^{-1}$) para maiores valores de q (para cerca de $q \sim 0,10 \text{ \AA}^{-1}$), indicando uma diminuição da estrutura micelar, além disso, tal diminuição é maior para os peptídeos de StII (Fig. 4.34 e 4.35C), relacionado a um maior efeito dos mesmos.

Em todos os casos o R_{Par} e o número de agregação das micelas diminuíram na presença dos peptídeos (Tabela 4.9), indicando que estes são capazes de promover uma reorganização das micelas. A extensão na diminuição desses parâmetros é semelhante entre StI_{1-31} e StI_{12-31} e entre $StII_{1-30}$ e $StII_{11-30}$, sugerindo que tal fenômeno estaria relacionado com a acomodação da região em hélice (resíduos 11-30) das sequências.

As cargas atribuídas às partículas pelo ajuste estão de acordo com o esperado. Após ser fixada em zero para LPC, calculou-se uma menor carga superficial para StI_{1-31} e maior carga superficial para os demais peptídeos com carga líquida +2. A ligação também mudou a espessura da região hidrofílica das micelas de forma similar para todos os peptídeos. É importante mencionar que dentro do modelo ajustado, essas cargas experimentais não podem ser entendidas como o valor direto da carga líquida da estrutura, mas sim como um parâmetro efetivo.

Tabela 4.9 – Parâmetros estruturais das micelas de LPC em solução e na presença dos peptídeos.

	LPC	StI_{1-31}	StI_{12-31}	$StII_{1-30}$	$StII_{11-30}$
R_{Par} (Å)	29,9	25,7	23,9	20,5	21,7
Anisometria	1,63	1,63	1,52	1,25	1,38
Esp. Cab. Pol. (Å)	8,4	11,8	12,4	12,2	13,9
ρ_{Core}	0,281	0,270	0,277	0,255	0,263
Carga partícula	0	3,4	6,4	6,4	6,3
Núm. Agregação	110	81	75	67	68

A equação utilizada para o ajuste considera a micela como um elipsóide prolato apresentando os semi-eixos com a seguinte equivalência: $a > b = c$. A anisometria das micelas foi calculada pela relação entre os eixos a e b , e indica que, exceto para StI_{1-31} , a interação e reorganização dos lipídios diminuem a anisometria, tornando as micelas mais esféricas. Como descrito acima, o aumento da esfericidade das micelas estaria relacionado à capacidade dos peptídeos de induzir curvatura positiva nos lipídios para a formação do poro toroidal.

4.4.2 Estudos na presença de bicamadas

4.4.2.1 Estudos conformacionais dos peptídeos na presença de LUV por CD

As propriedades conformacionais e de ligação dos peptídeos em bicamadas de diferentes composições lipídicas foram estudadas por CD. Assim como para as micelas, a aquisição de estrutura secundária pelo peptídeo foi tomada como indicativo da ligação do peptídeo nas bicamadas.

Stl₁₋₃₁ na presença de concentrações crescentes de vesículas de POPC e POPC:SM (90:10) apresenta espectros característicos de conformação randômica assim como em solução, indicando que o peptídeo não interage com as vesículas dessas composições (Fig. 4.36). Em presença de bicamadas contendo o lipídio carregado negativamente POPA, o peptídeo apresentou aumento no conteúdo de estrutura em α -hélice, indicando ligação aos lipídios. A interação foi analisada por meio de curvas de ligação (Fig 4.36). Apesar de o peptídeo possuir carga líquida zero, a ligação ocorre devido a interações eletrostáticas entre as cargas negativas em POPA e as cadeias laterais dos resíduos de lisina e arginina concentrados na extremidade C-terminal da sequência.

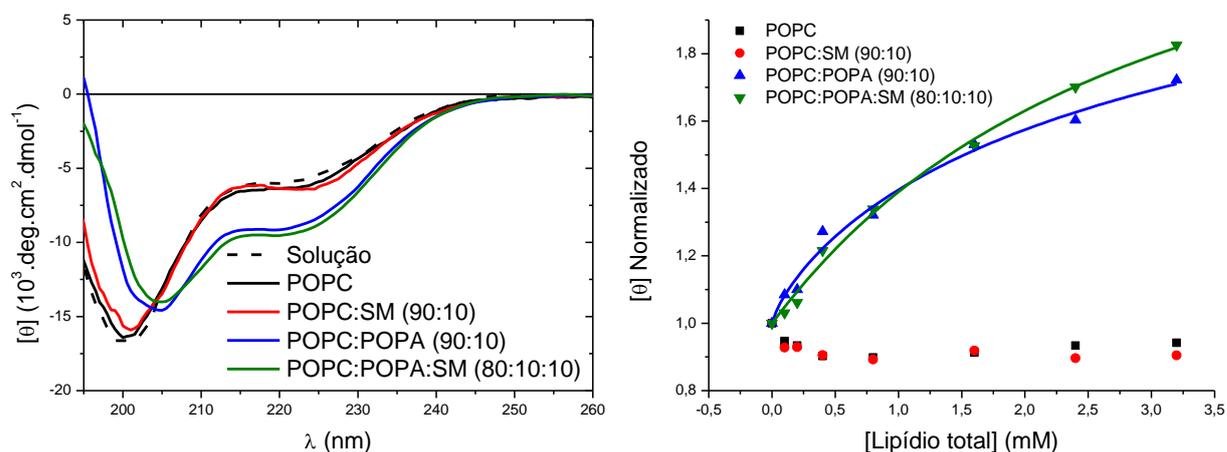


Figura 4.36. Espectros de CD de Stl₁₋₃₁ em solução e na presença de 1,6 mM de LUV de composição lipídica variada (esquerda); Intensidades de [θ] em 222 nm normalizado e curvas de ligação ajustada aos valores experimentais em função da concentração lipídica (direita). POPC (—), POPC:SM (90:10) (—), POPC:POPA (90:10) (—) e POPC:POPA:SM (80:10:10) (—).

Stl₁₂₋₃₁ não interagiu com vesículas de POPC e POPC:SM (90:10) como indicado pelos espectros de CD que mostram que o peptídeo permanece com

conformação ao acaso (Fig. 4.37). Novamente, a presença de forças eletrostáticas entre o peptídeo com carga líquida +2 e a carga negativa de POPA possibilitou a interação peptídeo-membrana fazendo com que o peptídeo adquirisse conformação em α -hélice.

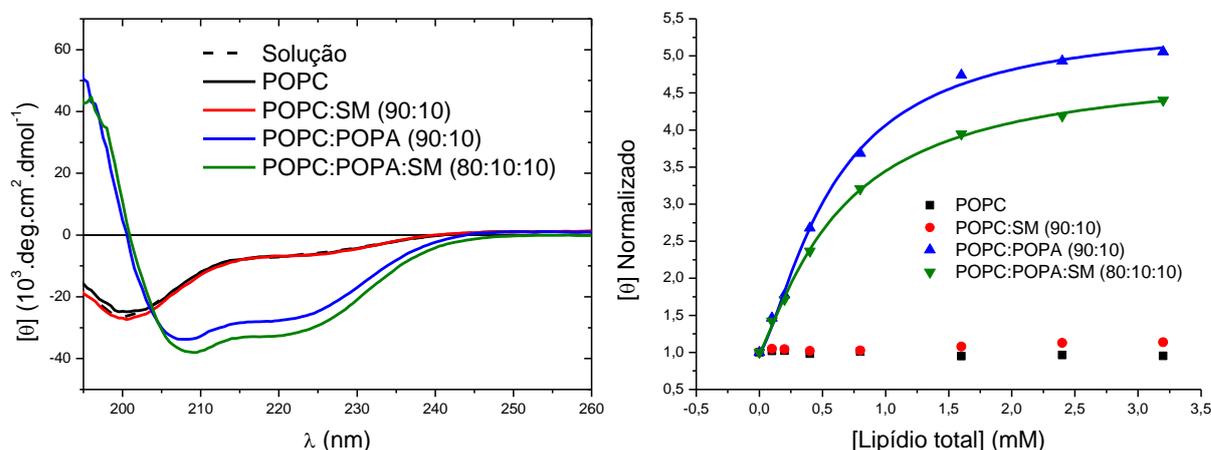


Figura 4.37. Espectros de CD de StI_{12-31} em solução e na presença de 1,6 mM de LUV de composição lipídica variada (esquerda); Intensidades de $[\theta]$ em 222 nm normalizado e curvas de ligação ajustada aos valores experimentais em função da concentração lipídica (direita). POPC (—), POPC:SM (90:10) (—), POPC:POPA (90:10) (—) e POPC:POPA:SM (80:10:10) (—).

As curvas de ligação de StI_{12-31} em vesículas contendo POPA indicam que o peptídeo ligou-se com a mesma afinidade em vesículas de POPC:POPA (90:10) e POPC:POPA:SM (80:10:10). StI_{12-31} , com carga líquida +2, apresentou maior afinidade pelas bicamadas contendo POPA em comparação com StI_{1-31} , que nessa condição possui carga líquida zero. Os resíduos negativos no segmento 1-10 do peptídeo StI_{1-31} estabelecem interações repulsivas com as cargas negativas de POPA, diminuindo a afinidade do peptídeo longo pelas bicamadas quando comparado com o fragmento de 20 resíduos.

Os espectros de CD de StII_{1-30} indicam que este também ligou-se em alta extensão somente a LUV contendo POPA, adquirindo estrutura essencialmente em α -hélice (Fig 4.38). Na presença de vesículas de POPC:SM (90:10) foi possível notar alterações no espectro do peptídeo que, embora sutis, indicam que há interação, mesmo que em baixa extensão.

StII₁₁₋₃₀ e N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ apresentam comportamento semelhante em presença de LUV, indicando que a sonda paramagnética não altera as propriedades de conformação e ligação do peptídeo (Figs. 4.39 e 4.40).

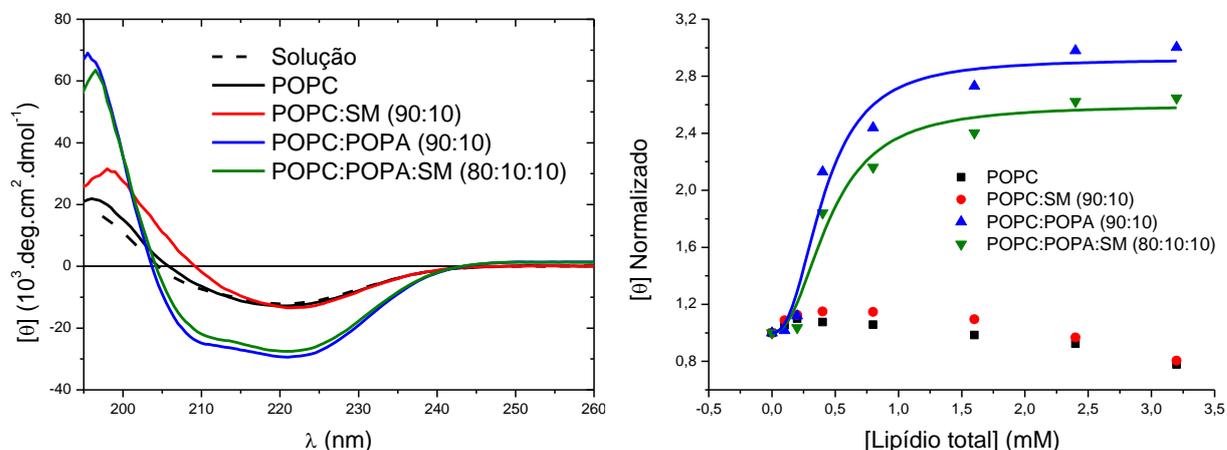


Figura 4.38. Espectros de CD de StII₁₁₋₃₀ em solução e na presença de 1,6 mM de LUV de composição lipídica variada (esquerda); Intensidades de $[\theta]$ em 222 nm normalizado e curvas de ligação ajustada aos valores experimentais em função da concentração lipídica (direita). POPC (—), POPC:SM (90:10) (—), POPC:POPA (90:10) (—) e POPC:POPA:SM (80:10:10) (—).

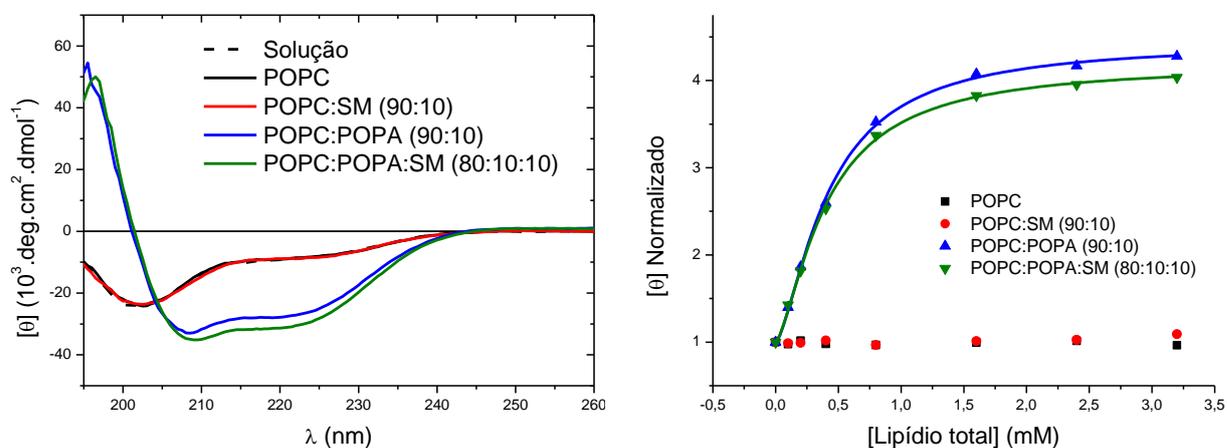


Figura 4.39. Espectros de CD de StII₁₁₋₃₀ em solução e na presença de 1,6 mM de LUV de composição lipídica variada (esquerda); Intensidades de $[\theta]$ em 222 nm normalizado e curvas de ligação ajustada aos valores experimentais em função da concentração lipídica (direita). POPC (—), POPC:SM (90:10) (—), POPC:POPA (90:10) (—) e POPC:POPA:SM (80:10:10) (—).

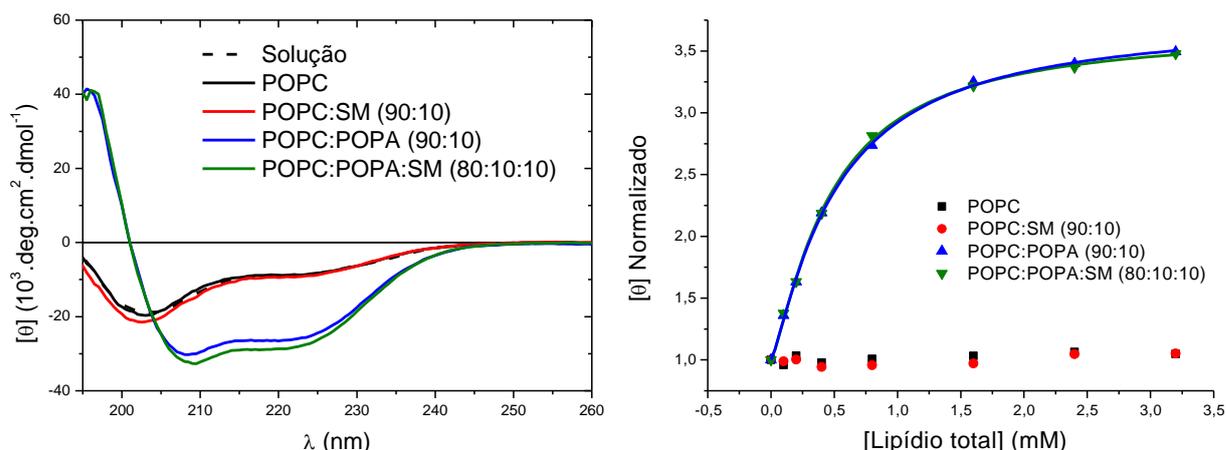


Figura 4.40. Espectros de CD de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ em solução e na presença de 1,6 mM de LUV de composição lipídica variada (esquerda); Intensidades de $[\theta]$ em 222 nm normalizado e curvas de ligação ajustada aos valores experimentais em função da concentração lipídica (direita). POPC (■), POPC:SM (90:10) (●), POPC:POPA (90:10) (▲) e POPC:POPA:SM (80:10:10) (▼).

Novamente, forças eletrostáticas favoreceram a ligação dos peptídeos a bicamadas contendo POPA, fazendo com que os peptídeos passem de conformação randômica em solução para α -hélice. A afinidade do peptídeo com a sequência nativa pelas LUV contendo POPA é ligeiramente maior em relação ao peptídeo com TOAC que, em pH 7,0, possui o N-terminal desprotonado e, portanto, uma carga positiva a menos que o peptídeo não marcado. As constantes de afinidade dos peptídeos pelas vesículas calculadas por meio das curvas de ligação indicam a importância da presença de forças eletrostáticas atrativas para a ligação. StI₁₋₃₁, com carga líquida zero, apresenta constante uma ordem de grandeza menor que os outros peptídeos estudados (Tabela 4.10). As diferenças de carga entre StII₁₁₋₃₀ e o peptídeo contendo TOAC também indicam a importância desse tipo de contribuição.

Tabela 4.10 – Constantes de ligação K_b (M^{-1} , $\times 10^3$) e coeficiente de cooperatividade (n) obtidos a partir de CD dos peptídeos em presença de LUV em pH 7,0.

	Carga pH 7,0	POPC:POPA (90:10)		POPC:POPA:SM (80:10:10)	
		K_b	n	K_b	n
StI ₁₋₃₁	0	0,27	0,8	0,33	1,0
StI ₁₂₋₃₁	+ 2	1,7	1,4	1,6	1,2
StII ₁₋₃₀	+ 2	2,4	2,4	2,2	2,3
StII ₁₁₋₃₀	+ 2	2,4	1,5	2,5	1,5
N-TOAC-StII ₁₁₋₃₀	+ 1	2,0	1,2	2,1	1,3

A comparação entre os fragmentos equivalentes das duas toxinas indica que as diferenças observadas entre StI e StII devem-se não somente às substituições não conservativas nas posições 2 e 9, mas também à troca de posição do resíduo negativo de ácido glutâmico na região 11-30 das sequências. O resíduo em questão localiza-se na posição 16 em StI e 22 em StII.

Por meio do software PEPFIT, o conteúdo estrutural dos peptídeos ligados em bicamadas de POPC:POPA (90:10) foi calculado realizando a desconvolução dos espectros de CD (Tabela 4.11). A análise foi realizada a partir dos espectros de CD dos peptídeos obtidos em presença de 2,4 mM de lipídio, condição em que praticamente todo o peptídeo na amostra encontra-se na forma ligada. Não foi possível calcular o conteúdo de StI₁₋₃₁ ligado em LUV pois, devido à baixa afinidade, não é possível obter um espectro de CD representativo da forma ligada.

Tabela 4.11 – Conteúdo estrutural dos peptídeos ligados a LUV de POPC:POPA (90:10) calculado a partir dos espectros de CD. Porcentagem (%) e número de resíduos (N).

	% α -hélice (N)	% Folha- β (N)	% Randômica (N)	R ²
StI ₁₋₃₁	---	---	---	---
StI ₁₂₋₃₁	80 (16)	0	20 (5)	0,942
StII ₁₋₃₀	70 (21)	10 (3)	20 (6)	0,996
StII ₁₁₋₃₀	81 (16)	0	19 (4)	0,983
N-TOAC-StII ₁₁₋₃₀	71 (15)	0	29 (6)	0,970

Como observado qualitativamente nos espectros de CD, todos os peptídeos do N-terminal das esticolisinas tiveram seu conteúdo helicoidal aumentado ao se ligarem às bicamadas. A passagem de StII₁₋₃₀ para a bicamada aumentou o conteúdo helicoidal de 4 para 21 resíduos, enquanto a estrutura ao acaso teve seu conteúdo diminuído de 17 para 6 resíduos (Tabela 4.11). Os dois peptídeos de 20 resíduos, bem como o análogo contendo TOAC apresentaram as mesmas alterações conformacionais ao se ligarem às membranas. Ambos passaram de 15 para 5 resíduos com estrutura ao acaso. Por outro lado, o número de resíduos em α -hélice passou de 5 para 15 (Tabela 4.11).

A ligação e a conformação dos peptídeos StII₁₁₋₃₀ e N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ em vesículas de DPPC e DPPC:DMPA (90:10), que em temperatura ambiente encontram-se em fase gel, foram estudadas para comparação com sistemas de

bicamadas em fase líquido-cristalina de POPC e POPC:POPA (90:10). Esses experimentos tiveram também o objetivo de validar estudos de localização da sonda paramagnética em membranas por supressão da fluorescência de lipídios marcados com NBD (Seção 4.4.2.3).

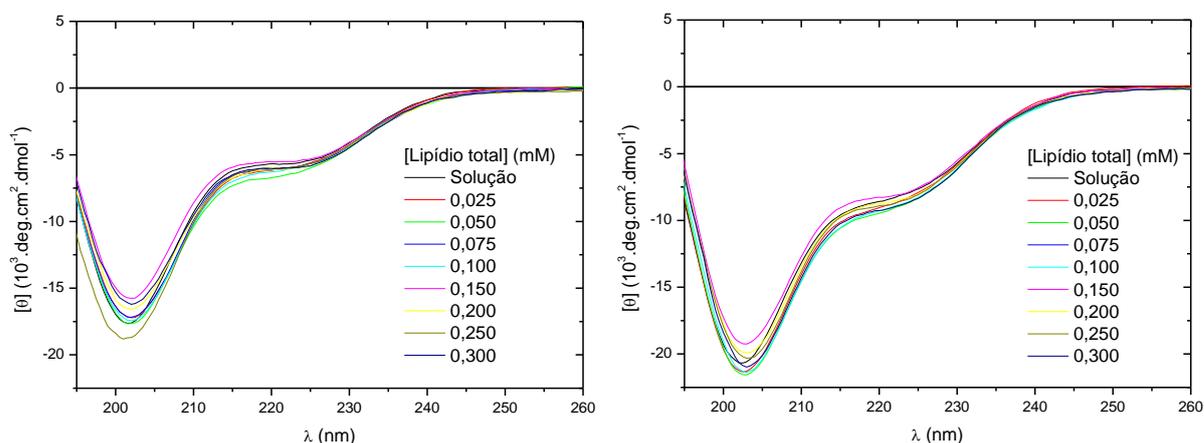


Figura 4.41. Espectros de CD dos peptídeos StII₁₁₋₃₀ e N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ em solução e na presença de LUV de DPPC em pH 7,0. [Peptídeo] = 5 μ M.

Na presença de bicamadas de DPPC ambos os peptídeos apresentam espectros de CD característicos de conformação essencialmente randômica, indicando que não ocorre interação (Fig. 4.41). Os peptídeos ligaram-se somente às bicamadas contendo DMPA, adquirindo conformação helicoidal (Fig. 4.42) assim como observado para bicamadas em fase líquido-cristalina. A presença de forças eletrostáticas de atração novamente mostrou-se fundamental para a interação peptídeo-membrana.

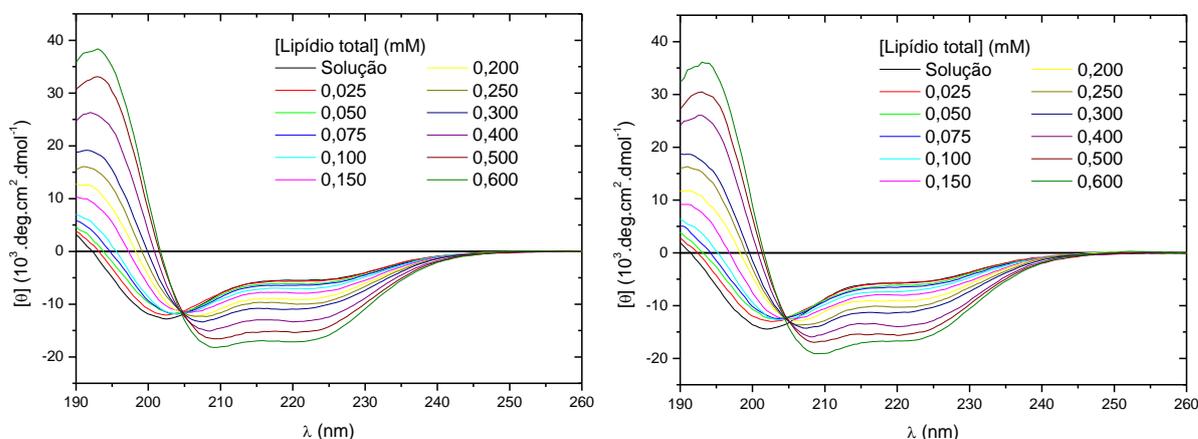


Figura 4.42. Espectros de CD dos peptídeos StII₁₁₋₃₀ e N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ em solução e na presença de LUV de DPPC:DMPA (90:10) em pH 7,0. [Peptídeo] = 5 μ M.

4.4.2.2 Estudos do peptídeo N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ em bicamadas por EPR

Assim como no estudo de interação de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ com micelas, a interação do peptídeo com vesículas de diferentes composições lipídicas foi estudada em função do pH. Foram obtidos espectros de EPR do peptídeo contendo TOAC em diferentes concentrações lipídicas em pHs 3,0, 7,0 e 11,0.

Em pH 3,0 o peptídeo interagiu em extensão considerável com LUVs de POPC (Fig. 4.43). Na presença de 10 mM de POPC é possível observar, mesmo que em baixa extensão, linhas espectrais referentes à população ligada às bicamadas.

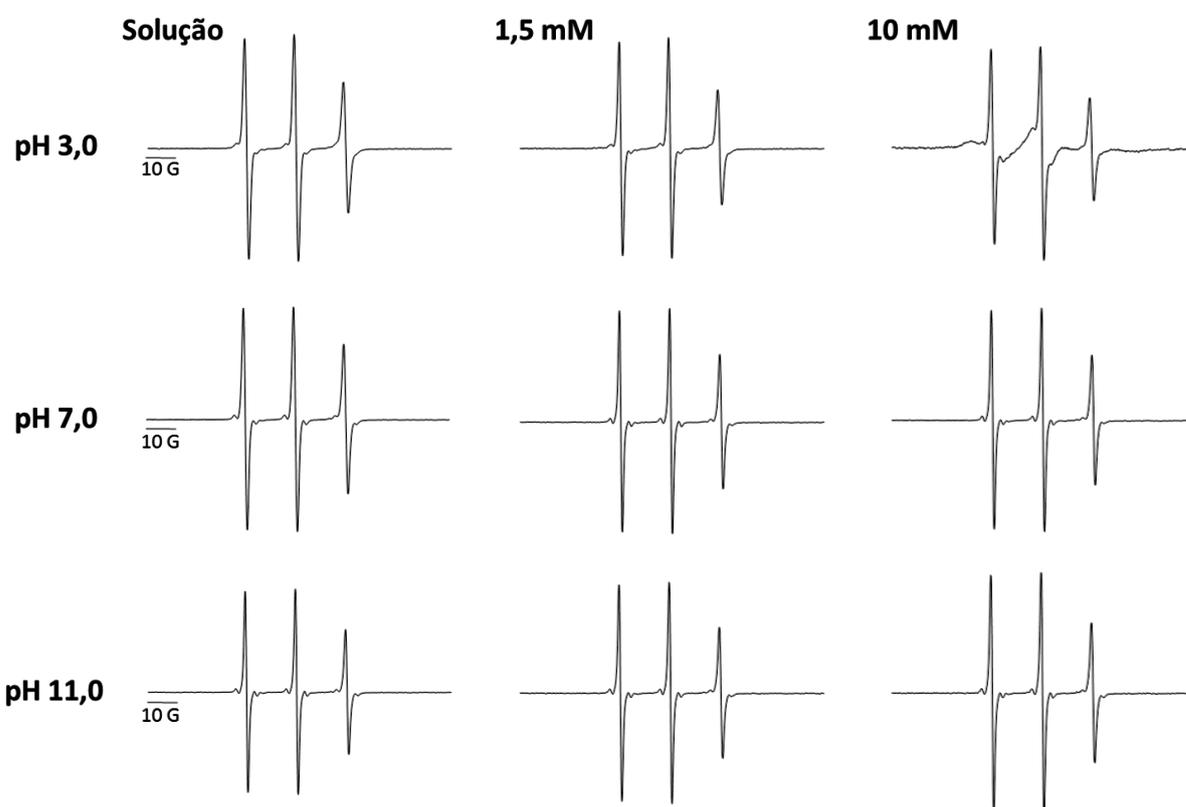


Figura 4.43. Espectros de EPR de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ em solução e na presença de LUV de POPC em pH 3,0, 7,0 e 11,0. [Peptídeo] = 40 μ M.

O peptídeo não interagiu com LUV de POPC em pH 7,0 e 11,0. Nesses pHs não é possível observar, mesmo em que baixa extensão, a presença de linhas alargadas referentes à população do peptídeo ligada nas LUV (Fig. 4.43).

Na presença de LUV de POPC:SM (90:10), assim como observado para LUV de POPC, o peptídeo apresentou um grau de interação considerável somente em pH 3,0 (Fig. 4.44).

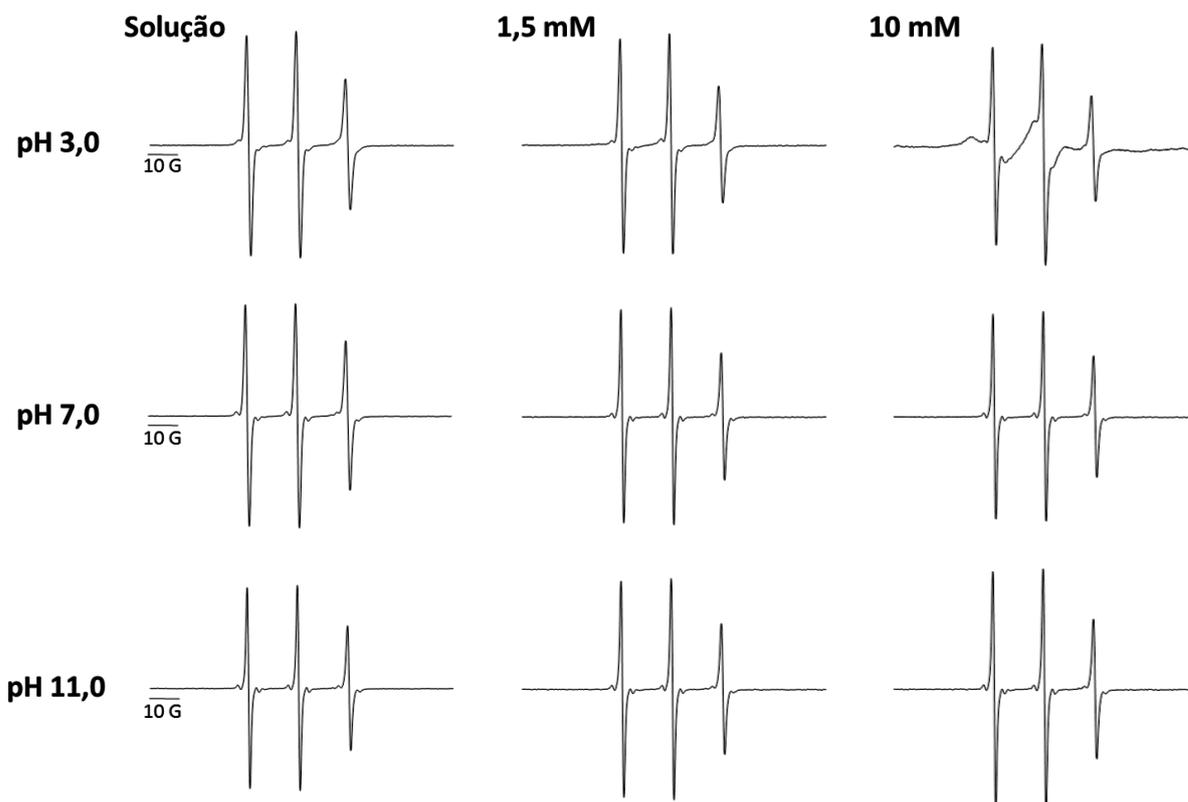


Figura 4.44. Espectros de EPR de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ em solução e na presença de LUV de POPC:SM (90:10) em pH 3,0, 7,0 e 11,0. [Peptídeo] = 40 μ M.

Em pH 7,0 e 11,0 o peptídeo não interagiu com as LUV de POPC:SM (90:10) (Fig. 4.44). A ligação a LUV compostas por lipídios zwitteriônicos mostrou-se dependente do pH, evidenciando a importância do estado de ionização do peptídeo e de forças eletrostáticas para a ligação.

A partir dos espectros de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ em pH 3,0 na presença de 10 mM de POPC e POPC:SM (90:10) foi possível medir a separação das linhas referentes à população imobilizada (extremos externos): 53,76 G para N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ ligado em POPC, e 54,65 G para o peptídeo ligado em POPC:SM (90:10), indicando maior imobilização no ambiente das bicamadas contendo SM. A maior restrição de mobilidade deve-se ao fato de o esfingofosfolipídio possuir um grupamento amina livre capaz de realizar pontes de hidrogênio intermoleculares, aumentando o empacotamento na região das cabeças polares.

A interação de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ com LUV de POPC:POPA (90:10) também mostrou-se dependente do pH. Novamente, a ligação se deu em maior extensão em pH 3,0 (Fig. 4.45). Diferentemente do observado para vesículas compostas somente por lipídios zwitteriônicos, foi possível observar interação do peptídeo com as bicamadas contendo POPA em pH 7,0 (Fig. 4.45). Na presença de vesículas de POPC:POPA (90:10), em pH 11,0, o peptídeo permaneceu em solução como é possível observar pelos espectros de EPR de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ que, mesmo em altas concentrações de lipídios, apresentam apenas linhas estreitas (Fig. 4.45).

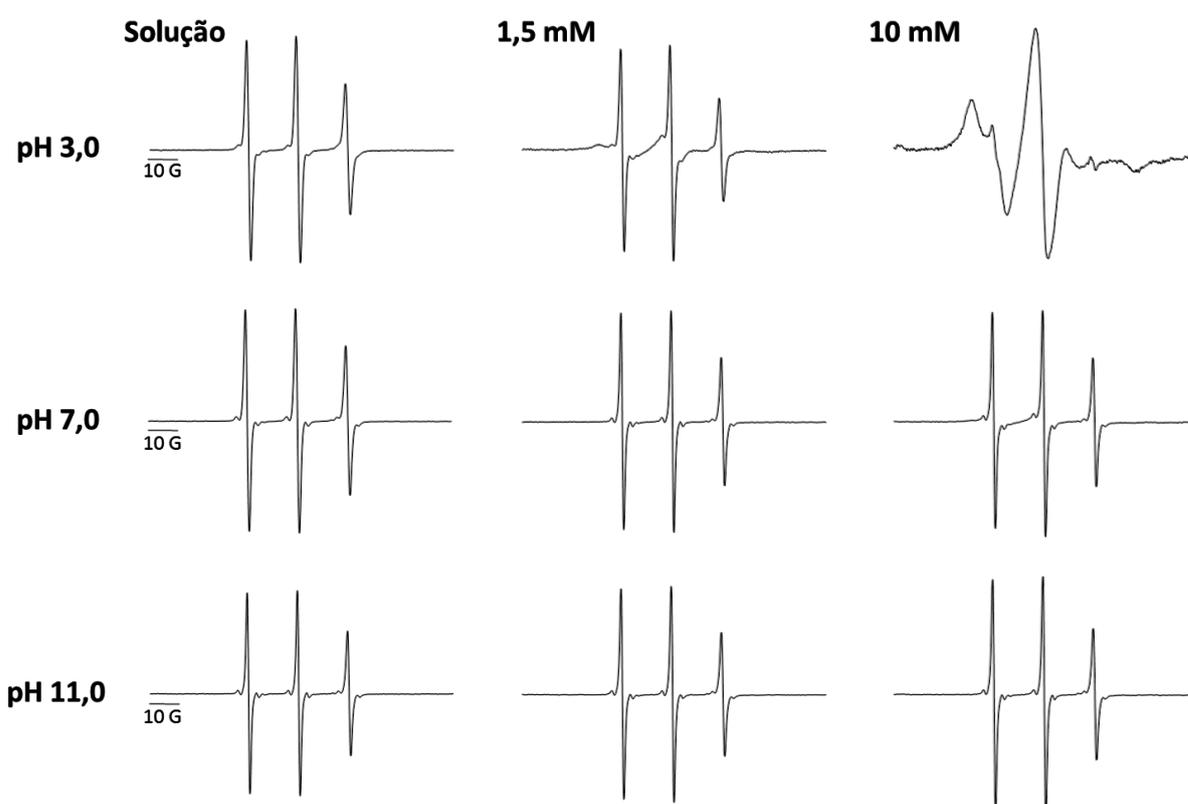


Figura 4.45. Espectros de EPR de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ em solução e na presença de LUV de POPC:POPA (90:10) em pH 3,0, 7,0 e 11,0. [Peptídeo] = 40 μ M.

Na presença de vesículas compostas por POPC:POPA:SM (80:10:10) o peptídeo apresentou comportamento semelhante ao observado em LUV de POPC:POPA (90:10) nos três pHs estudados. Em pH 7,0 o peptídeo ligou-se nas bicamadas em baixa extensão (Fig. 4.46). Na presença de 10 mM de lipídios, é possível notar o aparecimento de linhas alargadas no espectro de EPR referentes à população ligada nas vesículas. Aparentemente, a extensão da ligação de N-TOAC-

StII₁₁₋₃₀ às LUV em pH 11,0 é ainda menor em comparação com o sistema em pH 7,0 (Fig. 4.46).

Assim como observado em todos os sistemas de LUV estudados, o peptídeo apresentou maior afinidade pelas bicamadas em pH 3,0 (Fig. 4.46). Nesse pH, o espectro de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ obtido na presença de 10 mM de lipídios indica que praticamente todo o peptídeo está ligado às LUV, sendo possível notar uma pequena contribuição da população livre no espectro (Fig. 4.46). Os espectros obtidos em pH 3,0 também indicam uma alta imobilização da sonda em bicamadas contendo POPA (Fig. 4.44 e 4.46). É possível notar nos espectros a presença de extremos internos e externos que evidenciam o alto grau de imobilização da sonda no ambiente das membranas.

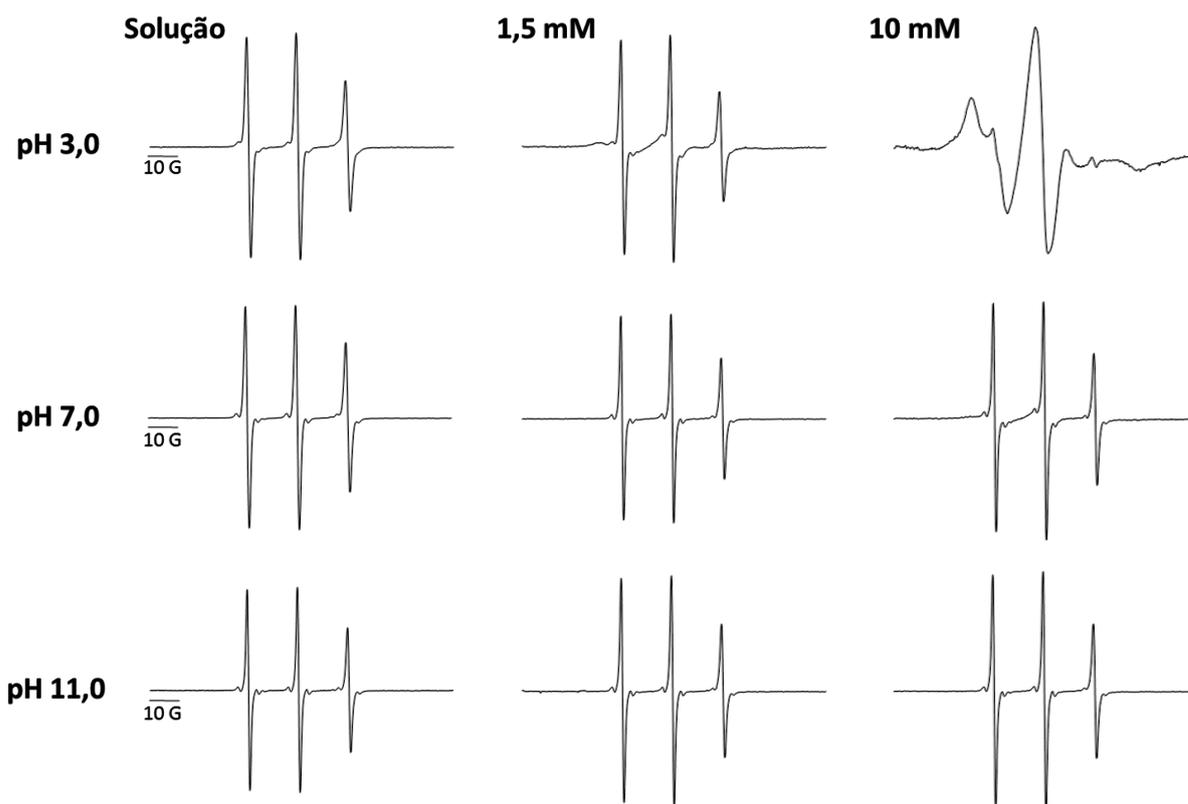


Figura 4.46. Espectros de EPR de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ em solução e na presença de LUV de POPC:POPA:SM (80:10:10) em pH 3,0, 7,0 e 11,0. [Peptídeo] = 40 μ M.

Pelos espectros, calculou-se a constante de ligação em bicamadas.

Tabela 4.12 – Constante de ligação K_b (M^{-1} , $\times 10^2$) de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ em LUV^a.

pH (carga do peptídeo)	POPC (100)	POPC:SM (90:10)	POPC:POPA (90:10)	POPC:POPA:SM (80:10:10)
3,0 (+4,7)	3,4 ± 0,1	5,9 ± 0,4	15 ± 4	13 ± 4
7,0 (+1,0)	2,3 ± 0,3	3,0 ± 0,4	4,5 ± 0,8	4,9 ± 0,2
11,0 (-1,3)	2,7 ± 0,4	3,1 ± 0,3	3,8 ± 0,8	3,0 ± 0,8

^aCoefficiente de partição calculado para concentração total de lipídio de 0,75 mM ± Desvio padrão

A afinidade de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ pelas vesículas de todas as composições lipídicas estudadas é maior em pH 3,0. Os valores de constante de ligação em LUV compostas somente por lipídios zwitteriônicos indicam que praticamente há pouca diferença de afinidade entre os pH 7,0 e 11,0. Nos sistemas de LUV com POPA, a extensão da ligação mostrou-se altamente dependente do estado de ionização da extremidade N-terminal e das cadeias laterais do peptídeo. Em pH 3,0 aproximadamente metade das moléculas de POPA, que em bicamadas de POPC possui pK_{a1} de 3,2 (Kooijmann et al., 2005), está protonada (carga 0), e as membranas aproximadamente 5 mol% do total de moléculas com carga negativa na superfície. Nessa condição, o peptídeo possui carga líquida + 4,7 e apresenta uma alta afinidade pelas bicamadas.

Entre pH 7,0 e 11,0 também ocorre a titulação do segundo próton de POPA que possui $pK_{a2} = 7,92$ (Kooijman et al., 2005). Em pH 11,0, portanto, as moléculas de PA na bicamada possuem carga líquida -2 e os peptídeos possuem carga líquida aproximada de - 1,3, o que deveria levar a uma repulsão eletrostática entre peptídeo e lipídio, diminuindo a afinidade entre peptídeo e membrana, como é possível observar.

Espectros de EPR de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ na presença de LUV contendo POPA em pH 3,0 permitiram a medida do desdobramento hiperfino para o peptídeo ligado às LUV (Tabela 4.13).

Tabela 4.13 – a_N (G) nos espectros de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ em solução e ligado em LUV, pH 3,0.

	a_N	S em pH 3,0
Solução	16,32	
POPC:POPA (90:10)	15,72	0,658
POPC:POPA:SM (80:10:10)	15,65	0,655

O menor valor de a_N no espectro do peptídeo ligado às bicamadas reflete a passagem da sonda de um ambiente altamente polar (solução aquosa) para o ambiente da membrana, de menor polaridade. Marsh & Toniolo (2008) através de medidas de desdobramento hiperfino de marcadores de spin lipídicos intercalados em diferentes posições de membranas de DPPC e correlacionados com os valores de desdobramento hiperfino de TOAC, montaram curvas de calibração para a localização da posição da sonda na bicamada. É, portanto, possível relacionar o valor de a_N medido no espectro de EPR de TOAC do peptídeo ligada aos lipídios com a profundidade de inserção do peptídeo na membrana. Os valores obtidos para N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ indicam que o resíduo N-terminal de TOAC encontra-se entre a região das cabeças polares e o C4 da cadeia acila dos lipídios.

O parâmetro de ordem para o peptídeo ligado em vesículas contendo POPA em pH 3,0 foi calculado para avaliar o grau de imobilização da sonda nesse ambiente (Tabela 4.13). A presença de SM, assim como a presença de LSM em micelas, aparentemente aumentou o empacotamento dos lipídios, como é possível observar pelo maior valor de S.

A ligação do peptídeo contendo TOAC também foi estudada em vesículas de DPPC:DMPA (90:10) que, à temperatura ambiente e em pH 7,0, se apresentam em fase gel (Garidel et al., 1997). Assim como visto por CD, o peptídeo interagiu com as LUV de DPPC:DMPA (90:10) (Fig. 4.47). Embora não seja possível notar com clareza a presença da população ligada em baixa concentração de lipídios, a constante de ligação calculada a por EPR é de $5,6 \pm 1,4 \times 10^2$, indicando que a interação ocorre praticamente na mesma extensão observada para o sistema análogo em fase fluida de POPC:POPA (90:10), no qual o peptídeo apresenta constante de ligação de $4,5 \pm 0,8 \times 10^2$ (Tabela 4.12).

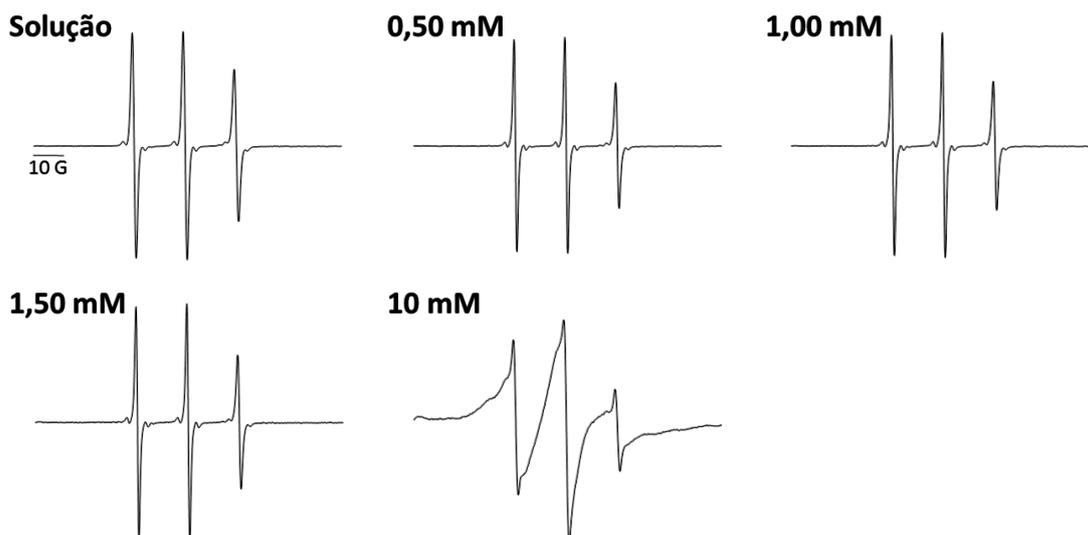


Figura 4.47. Espectros de EPR de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ em solução e na presença de LUV de DPPC:DMPA (90:10). [Peptídeo] = 40 μ M, pH 7,0.

O espectro na presença de 10 mM de DPPC:DMPA (90:10) apresenta além da população livre, mais duas populações com menor mobilidade. Pelas linhas de campo baixo é possível notar duas componentes com mobilidade restrita, indicando que nessa condição é possível que existam duas populações do peptídeo ligado à bicamada com diferentes mobilidades.

A interação de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ com LUV de POPC, POPC:SM (90:10), POPC:POPA (90:10) e POPC:POPA:SM (80:10:10) foi também investigada por EPR em diferentes pHs.

O fragmento peptídico contendo TOAC apresentou interação com LUV de POPC 15 mM, indicada pela presença de linhas espectrais alargadas, características de uma população imobilizada devido à ligação, apenas em pH 3,0 e 4,0, sendo que em pH 3,0 a ligação ocorreu em maior extensão (Fig. 4.48). Em pH 5,0 é possível notar uma diminuição da população ligada, e entre os pHs 6,0 e 11,0 as linhas alargadas praticamente desaparecem dos espectros, e aparentemente não há mais nenhum indicativo de variações consideráveis na proporção entre as populações ligada e livre nessa faixa de pH.

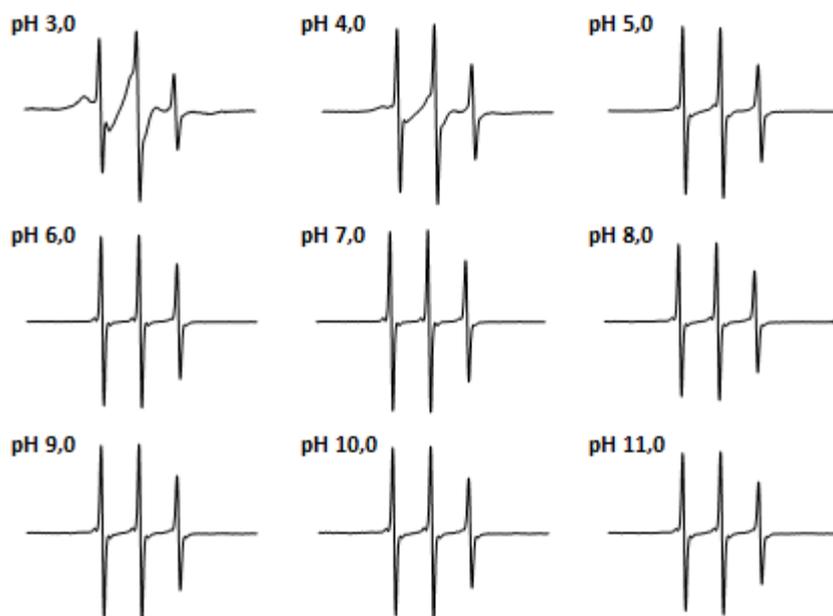


Figura 4.48. Espectros de EPR do peptídeo N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ na presença de LUV de POPC 15 mM em diferentes pHs. [Peptídeo] = 25 μ M. A varredura total nos espectros é de 100 G.

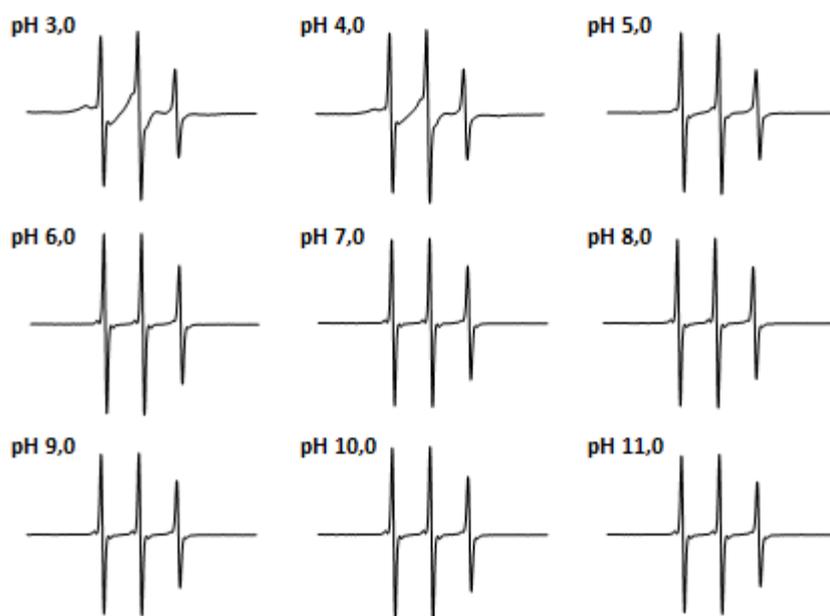


Figura 4.49. Espectros de EPR do peptídeo N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ na presença de LUV de POPC:SM (90:10) 15 mM em diferentes pHs. [Peptídeo] = 25 μ M. A varredura total nos espectros é de 100 G.

Um comportamento de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ semelhante ao observado na presença de LUV de POPC é também observado na presença de LUV de POPC:SM

(90:10) (Fig. 4.49). Nos espectros obtidos em pH 3,0 e 4,0 é possível notar a presença de uma população ligada às vesículas (em menor extensão em relação às LUV de POPC), em pH 5,0 já quase não se observam linhas alargadas, e de pH 6,0 até 11,0 os espectros praticamente não mudam, indicando que não há mudanças nas proporções de cada uma das populações (Fig. 4.49).

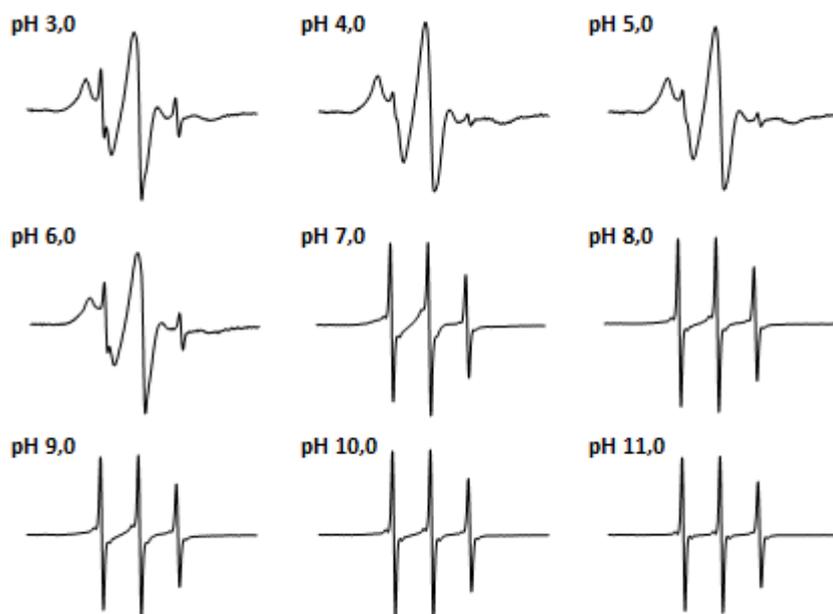


Figura 4.50. Espectros de EPR do peptídeo N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ na presença de LUV de POPC:POPA (90:10) 15 mM em diferentes pHs. [Peptídeo] = 25 μ M. A varredura total nos espectros é de 100 G.

A interação de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ com vesículas unilamelares de POPC:POPA (90:10) também foi investigada por EPR em diferentes pHs (Fig. 4.50) e, corroborando os resultados de CD, o peptídeo apresentou maior grau de interação com as vesículas contendo 10 mol% de POPA (Fig 4.50) em relação a LUV compostas somente por fosfolípidos zwitteriônicos (Figs. 4.48 e 4.49).

Entre pH 3,0 e 6,0 é possível notar que a população ligada às LUV de POPC:POPA (90:10) está presente em grande quantidade. As linhas espectrais alargadas, referentes à população imobilizada, podem ser observadas claramente nos espectros obtidos entre pH 3,0 e 6,0 (Fig 4.50). Em pH 7,0 ainda é possível notar a presença considerável de linhas alargadas no espectro, referentes à população das moléculas do peptídeo ligada às bicamadas, e entre pHs 8,0 e 10,0

se observa a presença uma pequena parcela da população ligada. Em pHs 11,0 e 12,0 essa população praticamente não está mais presente (Fig. 4. 50).

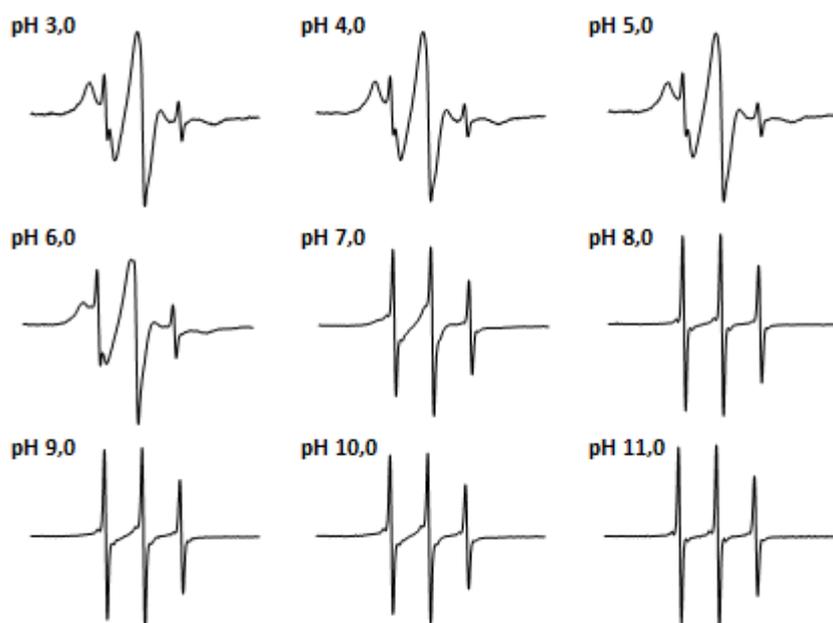


Figura 4.51. Espectros de EPR do peptídeo N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ na presença de LUV de POPC:POPA:SM (80:10:10) 15 mM em diferentes pHs. [Peptídeo] = 25 μ M. A varredura total nos espectros é de 100 G.

Em meio com 15 mM de LUV de POPC:POPA:SM (80:10:10) o peptídeo marcado com TOAC interagiu em grande extensão com as LUV em pHs 3,0, 4,0, 5,0 e 6,0 como é possível observar pela presença de linhas alargadas, características da população imobilizada pela ligação à bicamada (Fig. 4.51). Assim como para as LUV compostas por POPC:POPA (90:10), o espectro de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ em pH 7,0 apresentou populações de linhas estreitas e alargadas em proporção considerável. Entre os pHs 8,0 e 10,0 praticamente não se observa a presença da população ligada às LUV e, dentro dessa faixa de pH, os espectros de EPR praticamente não mudam, sugerindo que não ocorre variação nos percentuais relativos das populações ligada e livre em solução (Fig. 4.51). Em pHs 11,0 e 12,0 a população ligada às LUV entre os pHs 8,0 e 10,0 não está mais presente.

4.4.2.3 Estudos de localização de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ em bicamadas por fluorescência

A profundidade de inserção da extremidade N-terminal do peptídeo N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ foi analisada por meio de experimentos de supressão da fluorescência de

lipídios marcados em diferentes posições com NBD pelo nitróxido de TOAC. Foram utilizados os seguintes lipídios marcados com NBD: DPPE-NBD (marcação na cabeça polar), PC-6-NBD e PC-12-NBD (marcação em C6 e C12 das cadeias acila, respectivamente).

O grupo nitróxido do peptídeo foi capaz de suprimir a fluorescência de DPPE-NBD em LUV compostas de POPC:POPA:DPPE-NBD e DPPC:DMPA:DPPE-NBD (Fig. 4.52). A supressão de fluorescência do grupo NBD em DPPE-NBD evidencia que a sonda paramagnética, nessa condição, encontra-se próxima à região das cabeças polares na bicamada.

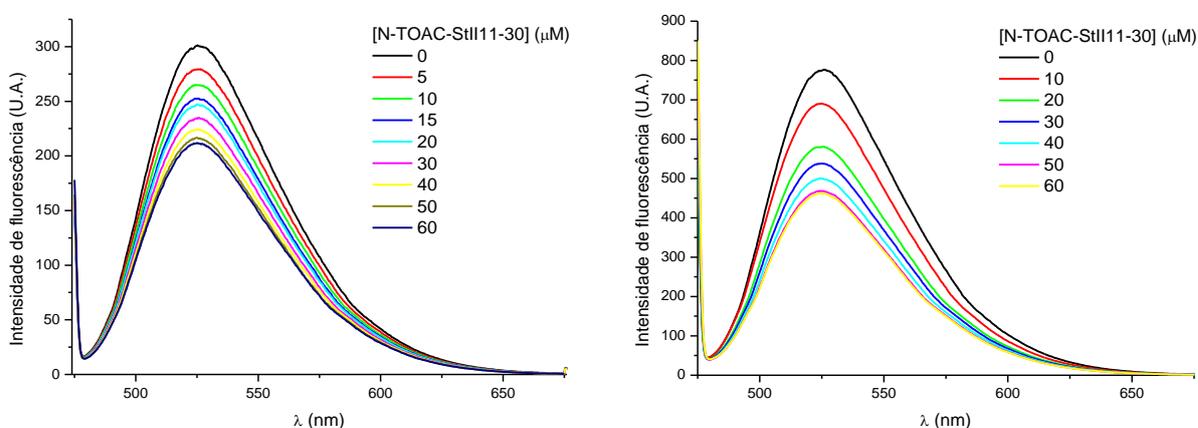


Figura 4.52. Espectros de emissão de fluorescência de DPPE-NBD em LUV de POPC:POPA:DPPE-NBD (89:10:1) (esquerda) e DPPC:DMPA:DPPE-NBD (89:10:1) (esquerda) na ausência e presença de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀. [Lipídio] = 50 μM, pH 7,0.

Esse resultado está de acordo com observações já realizadas para os peptídeos de Sts que indicam que apenas a região 1-10 de StII, de caráter hidrofóbico, é capaz de se inserir mais profundamente na região das cadeias acila (Ros et al., 2013). No modelo proposto para o poro toroidal, a região ao redor do resíduo 11 (início aproximado da hélice anfipática) do peptídeo (ou da toxina) se inseriria apenas parcialmente na bicamada localizando-se próxima da interface como observado nos estudos de supressão de fluorescência.

A emissão de fluorescência de PC-6-NBD em bicamadas compostas de DPPC:DMPA:PC-6-NBD (89:10:1) aumentou com a adição do peptídeo e o comprimento de onda de máximo de emissão foi deslocado para o azul em até 3,6 nm (Fig. 4.53). Esse resultado indica que, de alguma forma, o peptídeo, ainda que em baixa concentração, é capaz de alterar o ambiente da sonda na membrana sem

que a extremidade N-terminal esteja próxima do fluoróforo a ponto de suprimir sua fluorescência. Com o aumento da concentração do peptídeo, foi possível observar uma pequena diminuição na emissão de fluorescência de PC-6-NBD, indicando que a sonda é capaz de penetrar até a altura do C6 das cadeias acila.

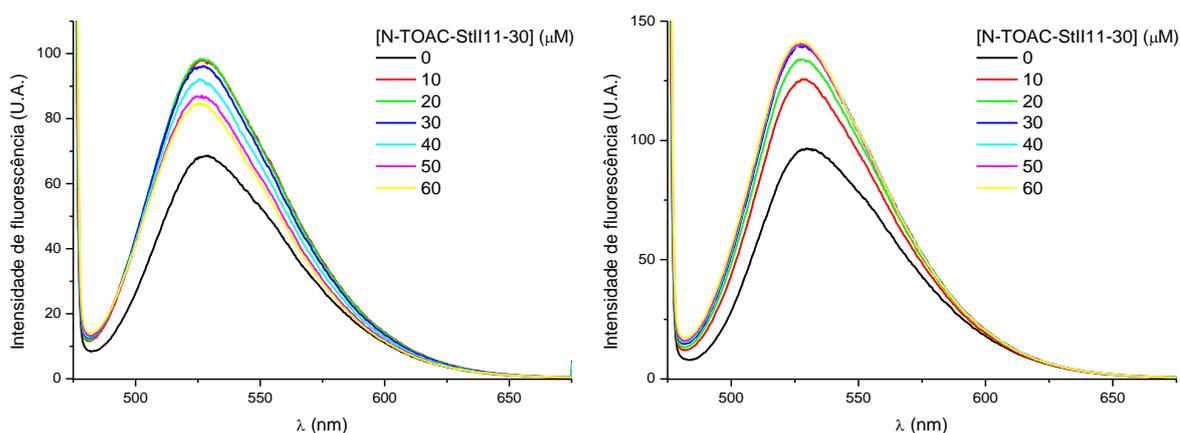


Figura 4.53. Espectros de emissão de fluorescência de PC-6-NBD e de PC-12-NBD em LUV de DPPC:DMPA:Lip-NBD (89:10:1) na ausência e presença de diferentes concentrações de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀. [Lipídio] = 50 μM, pH 7,0.

Em LUV de DPPC:DMPA:PC-12-NBD (89:10:1) também observou-se um aumento da emissão e deslocamento de até 3,0 nm do máximo de fluorescência para o azul em decorrência da adição do peptídeo (Fig. 4.53), indicando que o peptídeo também altera a bicamada na região do carbono 12. O aumento da concentração do peptídeo não alterou a intensidade de emissão de PC-12-NBD, indicando que não ocorre supressão da fluorescência do lipídio marcado pelo resíduo paramagnético de TOAC. A extremidade N-terminal do peptídeo não é capaz de penetrar na região das cadeias acila até a altura do carbono 12 (Fig. 4.53).

Analisando a relação F_0/F em função da concentração do peptídeo nos sistemas em fase gel, nota-se a supressão da emissão de DPPE-NBD, e o aumento na fluorescência de PC-6-NBD e PC-12-NBD em decorrência da adição do peptídeo (Fig. 4.54). No caso de PC-6-NBD, ainda é possível notar a supressão de emissão pelo TOAC em função da concentração de peptídeo, indicando que a sonda penetra na bicamada até a posição 6. No entanto, o efeito de supressão não é observado para PC-12-NBD, indicando que a sonda não está localizada na região de C12 (Fig. 4.54). O efeito de supressão observado para PC-6-NBD é menor que o observado

para DPPE-NBD, um indicativo de que o resíduo de TOAC estaria a maior parte do tempo na região das cabeças polares.

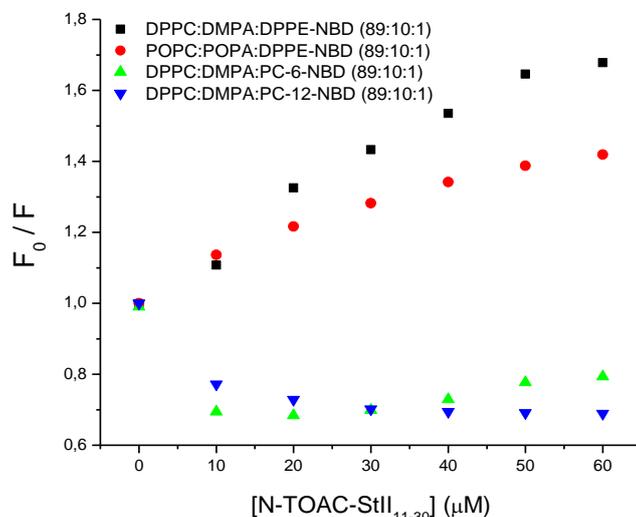


Figura 4.54. Razão F_0/F nos espectros de emissão de fluorescência de DPPE-NBD, PC-6-NBD e PC-12-NBD em função da concentração de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀. [Lipídio] = 50 μM, pH 7,0.

Como já relatado na literatura (Raghuraman et al., 2007), devido ao caráter polar do grupo NBD em PC-6-NBD e PC-12-NBD, é possível que ocorra a dobra da cadeia carbônica de modo que o fluoróforo passe a localizar-se no ambiente das cabeças polares, não reportando de forma correta o ambiente das cadeias carbônicas. Foi relatado também que o dobramento da cadeia carbônica em bicamadas em fase fluida ocorre com maior frequência em comparação a bicamadas em fase gel (Raghuraman et al., 2007).

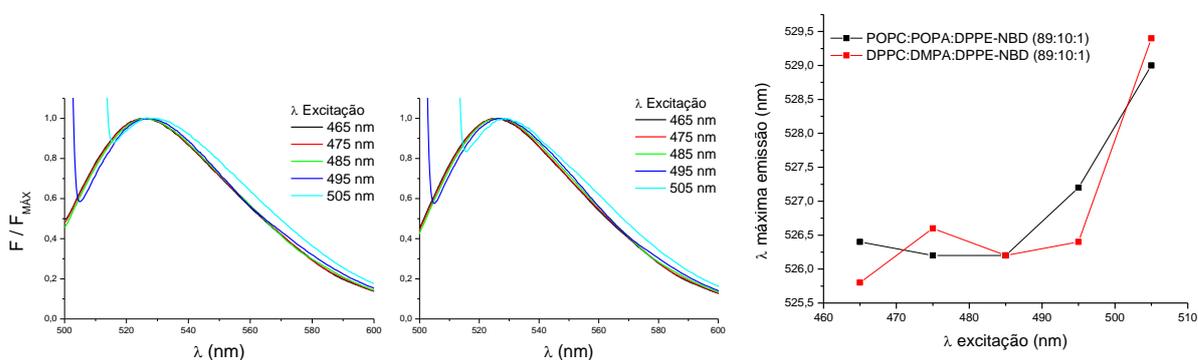


Figura 4.55. Espectros de emissão de fluorescência de DPPE-NBD em LUV de POPC:POPA:DPPE-NBD (89:10:1) (esquerda) e DPPC:DMPA:DPPE-NBD (89:10:1) (centro) obtidos com diferentes comprimentos de onda de excitação e normalizados pela intensidade do máximo de emissão. Comprimento de onda do máximo de emissão em função do comprimento de onda de excitação (direita).

Foram realizadas medidas de REES para estudo da real posição dos marcadores em bicamadas em fase fluida de POPC:POPA:Lip-NBD (89:10:1) e em fase gel de DPPC:DMPA:Lip-NBD (89:10:1). Incorporado em membranas em fase gel e em fase fluida, DPPE-NBD apresenta um REES considerável, como esperado para uma sonda fluorescente localizada na região das cabeças polares (Fig. 4.55). O comprimento de onda de máximo de emissão aumentou com o aumento do comprimento de onda de excitação (Fig. 4.55).

Os espectros de emissão de PC-6-NBD indicam que, quando o fosfolipídio é incorporado em bicamadas em fase fluida, observa-se o fenômeno de REES, evidenciando que a sonda encontra-se na região da interface, não reportando corretamente sobre o ambiente da posição 6 das cadeias acila. Não se observa REES em PC-6-NBD incorporado em bicamadas em fase gel. Neste caso, o marcador encontra-se na região das cadeias acila, como esperado (Figs. 4.56).

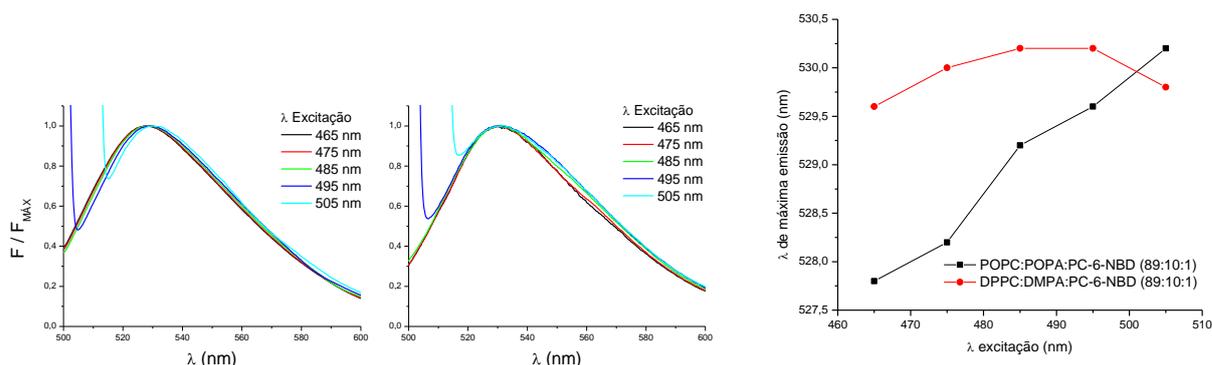


Figura 4.56. Espectros de emissão de fluorescência de PC-6-NBD em LUV de POPC:POPA:PC-6-NBD (89:10:1) (esquerda) e DPPC:DMPA:PC-6-NBD (89:10:1) (centro) obtidos com diferentes comprimentos de onda de excitação e normalizados pela intensidade do máximo de emissão. Comprimento de onda do máximo de emissão em função do comprimento de onda de excitação (direita).

Relacionando os comprimentos de onda de excitação e de máximo de emissão, é possível notar com clareza a diferença na magnitude do fenômeno de REES para os diferentes sistemas com o lipídio PC-6-NBD (Fig. 4.56).

Assim como no caso de PC-6-NBD incorporado em fase fluida, espectros de PC-12-NBD em POPC:POPA:PC-12-NBD (89:10:1) também apresentam REES considerável, indicando que ocorre a dobra da cadeia acila e a exposição da sonda à região das cabeças polares (Figs. 4.57).

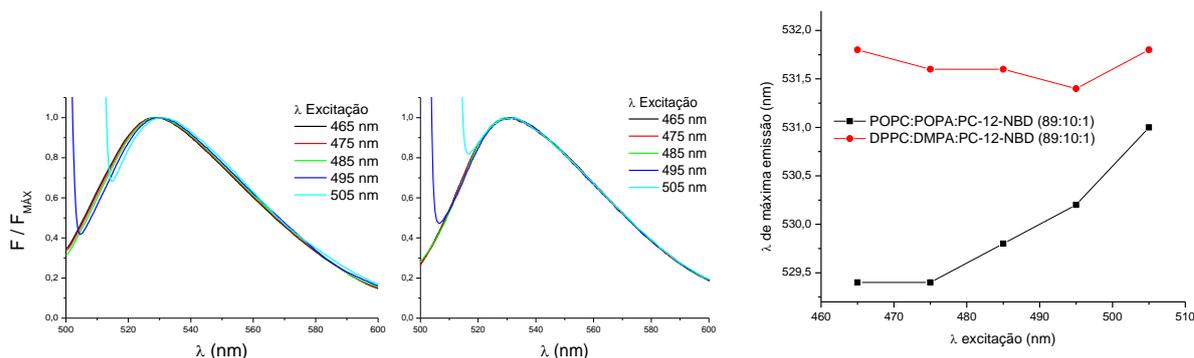


Figura 4.57. Espectros de emissão de fluorescência de PC-12-NBD em LUV de POPC:POPA:PC-12-NBD (89:10:1) (esquerda) e DPPC:DMPA:PC-12-NBD (89:10:1) (centro) obtidos com diferentes comprimentos de onda de excitação e normalizados pela intensidade do máximo de emissão. Comprimento de onda do máximo de emissão em função do comprimento de onda de excitação (direita).

O experimento de REES indica também que em bicamadas de DPPC:DMPA:PC-12-NBD (89:10:1) a sonda está localizada na região das cadeias hidrocarbônicas, como esperado. (Figs. 4.57).

4.4.2.4 Estudos do efeito de N-TOAC-StII11-30 na organização dos lipídios em bicamadas através de REES

Resultados obtidos nos experimentos de supressão de fluorescência que mostram um aumento de emissão de PC-6-NBD e PC-12-NBD indicam que o peptídeo seria capaz de perturbar o ambiente da membrana alterando as características de emissão do fluoróforo.

Foram realizados experimentos de REES dos lipídios marcados com NBD incorporados em LUV de DPPC:DMPA:Lip-NBD (89:10:1) na ausência e presença do peptídeo para estudo de possíveis alterações que N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ possa causar no ambientes das sondas.

Em LUV com DPPE-NBD foi possível observar REES considerável na presença e ausência do peptídeo contendo TOAC, como esperado. Em todos os comprimentos de onda de excitação, houve um pequeno deslocamento do máximo de emissão para o azul (Fig. 4.58).

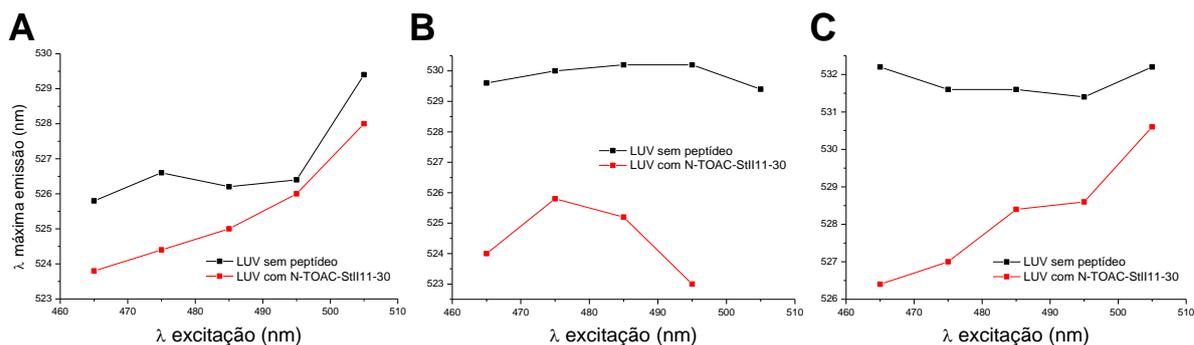


Figura 4.58. Comprimento de onda do máximo de emissão de fluorescência em função do comprimento de onda de excitação de DPPE-NDB (A), PC-6-NBD (B) e PC-12-NBD (C) em LUV de DPPC:DMPA:Lip-NBD (89:10:1) na ausência e presença de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀. [Lipídio] = 50 μM, pH 7,0.

O experimento de REES com PC-6-NBD incorporado em LUV em fase gel para estudo do efeito do peptídeo na organização dos lipídios não apresentou resultados que permitissem alguma conclusão sobre o aumento ou não do efeito de REES. Não é possível notar com clareza o deslocamento do máximo de emissão para o azul (Fig. 4.58).

PC-12-NBD na ausência do peptídeo não apresenta REES considerável, indicando que a sonda está localizada na região das cadeias hidrocarbônicas. O peptídeo altera o ambiente da sonda de modo que esta passe a apresentar REES. Também nota-se o deslocamento dos comprimentos de onda de máximo de emissão para o azul (Fig. 4.58).

4.4.2.5 Estudos de fluorescência do movimento transmembranar de lipídios pelo (eventual) poro toroidal

Espectros de fluorescência do lipídio DOPE-Pyr são sensíveis à concentração do próprio lipídio na bicamada. Em altas concentrações do fluoróforo, o espectro de fluorescência de DOPE-Pyr exibe uma banda de emissão ao redor de 465 nm (excímero) enquanto, em baixas concentrações na bicamada, o espectro de DOPE-Pyr exibe duas bandas de emissão em 375 e 395 nm (monômero).

Vesículas contendo o lipídio fluorescente DOPE-Pyr incorporado assimetricamente nas bicamadas foram utilizadas para estudo do movimento transmembranar de lipídios que poderia ocorrer em decorrência da formação de um poro toroidal como proposto para as toxinas. O poro toroidal permite que os lipídios

passem de uma lamela a outra da bicamada por difusão lateral na região do poro onde os lipídios encontram-se em curvatura positiva. A redistribuição do lipídio marcado entre os dois folhetos da bicamada em decorrência da formação de um poro toroidal alteraria a proporção entre as formas de monômero e excímero e o espectro de fluorescência de DOPE-Pyr.

Todos os peptídeos estudados foram capazes de interagir com as vesículas e causar a redistribuição de DOPE-Pyr entre os folhetos da bicamada como indicado pelos gráficos de redistribuição normalizada em função da concentração de peptídeo (Fig. 4.59). Essa observação consiste em uma forte evidência de que os poros formados pelos peptídeos são toroidais e da mesma natureza que os poros formados pelas esticolisinas. A porcentagem de redistribuição mostrou-se em todos os casos dependente da concentração dos peptídeos.

Os peptídeos Stl₁₋₃₁ e Stll₁₋₃₀ (Figs. 4.59A e 4.59C) apresentam um maior efeito de cooperatividade no fenômeno de redistribuição quando comparados com seus correspondentes mais curtos (Figs. 4.59B e 4.59D). O efeito de cooperatividade foi quantificado para comparação por meio do ajuste de uma equação de Hill aos dados experimentais e análise do coeficiente de Hill, confirmando maior cooperatividade no caso dos peptídeos longos (Tabela 4.14). A extensão máxima total de redistribuição observada foi de aproximadamente 85% para todos os peptídeos, exceto N-TOAC-Stll₁₁₋₃₀. O peptídeo com TOAC também apresentou um coeficiente de cooperatividade maior em comparação ao peptídeo Stll₁₁₋₃₀.

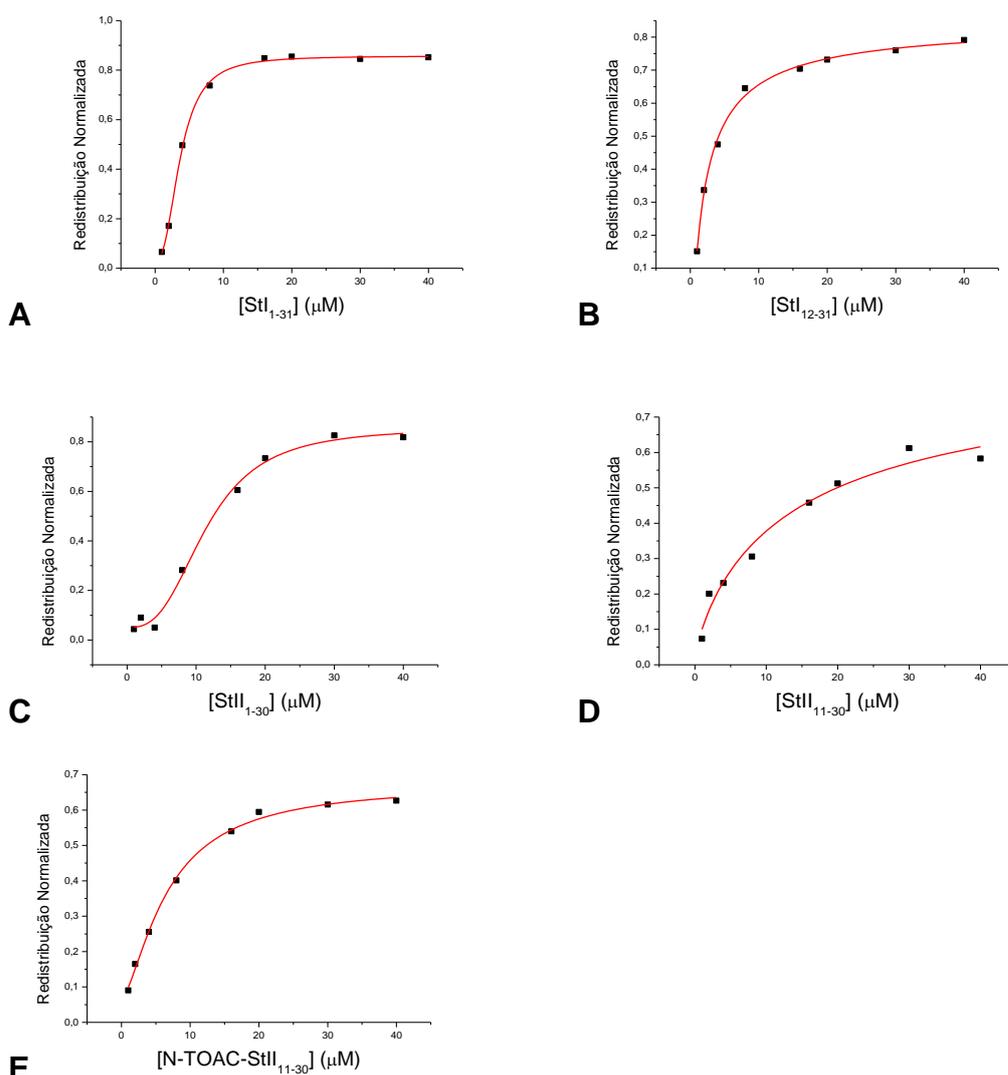


Figura 4.59. Redistribuição do lipídio DOPE-Pyr entre os folhetos da bicamada normalizada em função da concentração de peptídeo. Em vermelho: ajuste da curva da equação de Hill aos pontos experimentais.

Tabela 4.14 – Parâmetros de cooperatividade (n) e máximo de redistribuição do ajuste da equação de Hill aos pontos experimentais de redistribuição de DOPE-Pyr.

	n	Máximo	R^2
StI_{1-31}	2,5	0,86	0,998
StI_{12-31}	0,9	0,85	0,995
StII_{1-30}	2,8	0,86	0,990
StII_{11-30}	0,8	0,88	0,955
$\text{N-TOAC- StII}_{11-30}$	1,5	0,67	0,996

4.5 Ensaios de atividade dos peptídeos

4.5.1 Ensaio de permeabilização de membranas modelo

A atividade permeabilizante dos peptídeos foi estudada pelo ensaio de vazamento de CF encapsulada em vesículas unilamelares grandes de composição lipídica variada. Com esses ensaios foi possível verificar a capacidade dos peptídeos de formarem poros nas vesículas, e o efeito a presença de POPA e de SM na atividade dos peptídeos. A extensão total de permeabilização após 50 minutos de exposição foi plotada em função da concentração dos peptídeos para comparação entre os diferentes peptídeos e composições lipídicas (Fig 4.60).

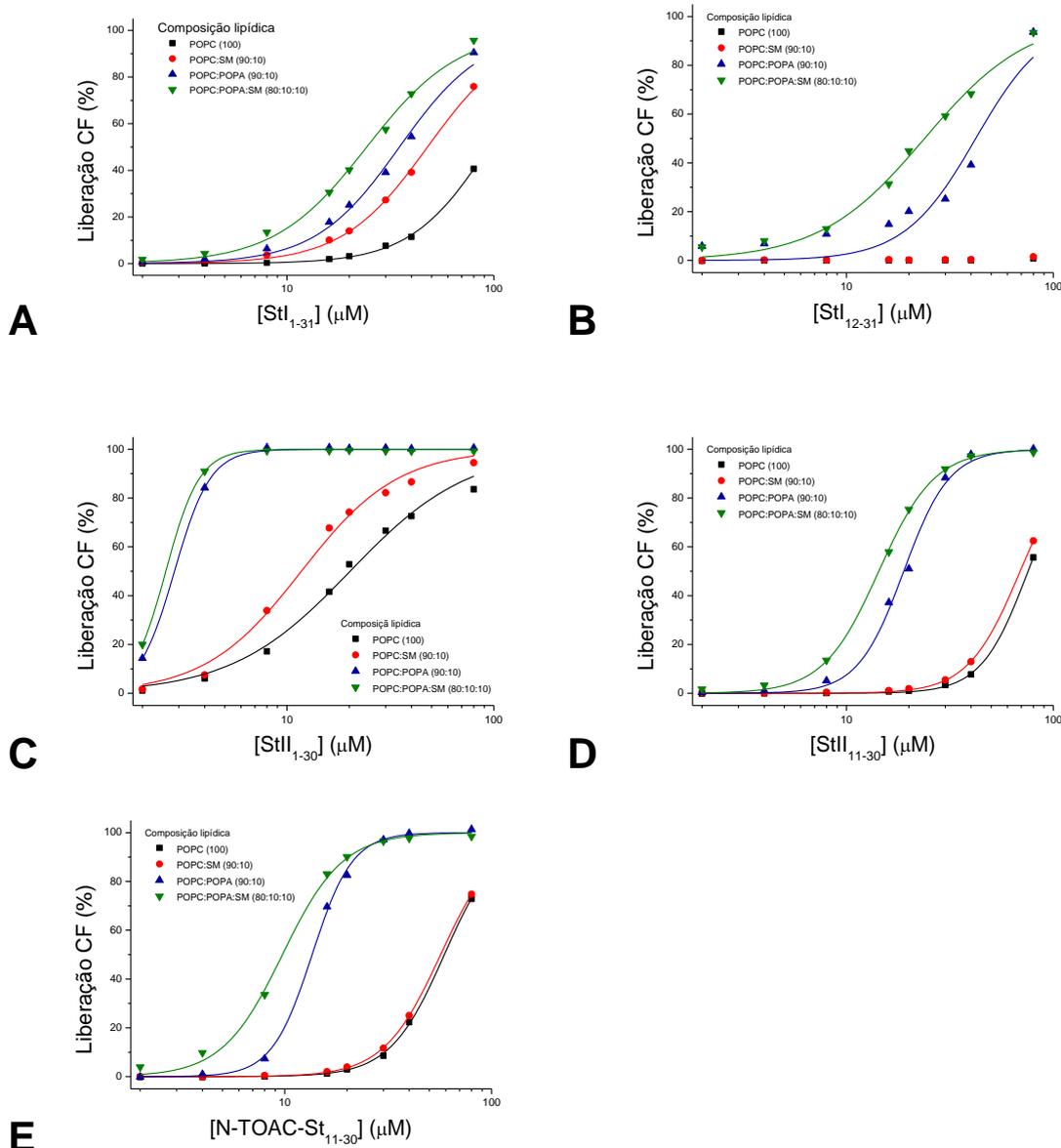


Figura 4.60. Liberação de CF após 50 minutos em função da concentração de peptídeo e ajuste da curva da equação de Hill aos pontos experimentais.

Todos os peptídeos estudados foram capazes de mimetizar as toxinas do ponto de vista funcional, formando poros nas membranas e permitindo o vazamento da CF encapsulada (Fig. 4.60). Stl₁₋₃₁ apresentou menor atividade em relação ao peptídeo de 30 resíduos de StII em todos os sistemas estudados (Figs. 4.60A, 4.60C e Tabela 4.15). Os resultados corroboram os estudos de ligação realizados por CD que mostram maior afinidade do peptídeo de StII pelas bicamadas. As diferenças de carga líquida e de hidrofobicidade entre os segmentos 1-10 das toxinas são as responsáveis pelas diferenças de ligação e atividade observadas por diferentes técnicas. A inclusão de SM ou de POPA na composição das vesículas aumentou a atividade medida para os peptídeos longos de StI e StII. Diferente do observado nos estudos de ligação por CD nos quais a presença de SM não alterou a ligação dos peptídeos às bicamadas, a atividade dos peptídeos de 31 e 30 resíduos mostrou-se sensível à presença de tal lipídio.

Também foram observadas diferenças de atividade entre Stl₁₂₋₃₁ e StII₁₁₋₃₀ (Tabela 4.14), evidenciando que as diferenças de ligação e atividade entre os peptídeos longos devem-se não somente às diferenças na região 1-10 mas também à posição do resíduo de ácido glutâmico nas posições 16 em StI e 22 em StII.

Tabela 4.15 – Concentração de peptídeo (EC₅₀, μM) necessária para causar liberação de 50% da CF encapsulada em 20 μM de lipídio e coeficiente de cooperatividade de Hill (n) obtido pelos ajustes aos dados experimentais.

	POPC (100)		POPC:SM (90:10)		POPC:POPA (90:10)		POPC:POPA:SM (80:10:10)	
	EC ₅₀	n	EC ₅₀	n	EC ₅₀	n	EC ₅₀	n
Stl ₁₋₃₁	95	2,3	48	2,1	35	2,1	24	1,9
Stl ₁₂₋₃₁	No Fit		No Fit		42	2,5	24	1,7
StII ₁₋₃₀	20	1,5	12	1,9	2,9	5	2,6	5
StII ₁₁₋₃₀	75	3,8	69	3,5	18	3,9	14	3,2
N-TOAC-StII ₁₁₋₃₀	59	3,3	57	3,1	14	4,5	9,7	3,0

A comparação entre os peptídeos de 31 e 20 resíduos de StI mostra a importância do segmento 1-11 da toxina na interação com vesículas de POPC e POPC:SM (90:10). Apesar da presença de cargas negativas nas posições 2 e 9 de StI conferir uma baixa constante de ligação à Stl₁₋₃₁ em presença de vesículas

contendo POPA, tal segmento mostrou-se importante para interação e ação sobre vesículas formada apenas por lipídios zwitteriônicos. Stl₁₂₋₃₁ não apresenta atividade permeabilizante sobre vesículas compostas somente por POPC e SM.

StII₁₋₃₀ apresenta maior atividade em relação a StII₁₁₋₃₀ em todas as condições estudadas evidenciando novamente a importância do segmento 1-10 (Tabela 4.15). Em StII, essa sequência apresenta caráter altamente hidrofóbico que contribuiria especialmente para a interação com lipídios zwitteriônicos como POPC e SM. Além disso, como visto por SAXS, StII₁₋₃₀ apresentaria maior capacidade de induzir curvatura positiva nos lipídios para formação o poro toroidal e tal propriedade também contribuiria no sentido de aumentar a atividade do peptídeo em relação a StII₁₁₋₃₀. Em sistemas de LUV contendo POPA, a atividade dos peptídeos de StII foi aumentada de quatro a seis vezes em relação aos sistemas de LUV sem o lipídio negativo, corroborando os estudos de ligação por CD (Tabela 4.15).

Assim como verificado por outras técnicas, o comportamento funcional do peptídeo N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ frente a vesículas de composição lipídica variada foi semelhante ao do peptídeo StII₁₁₋₃₀ (Tabela 4.15).

Ensaio de atividade permeabilizante do peptídeo Stl₂₀₋₃₁ e seus mutantes E24A, E24Q e E24K, bem como do peptídeo StII₁₋₁₀ indicam que tais fragmentos mesmo em alta concentração não são capazes de perturbar as vesículas a ponto de causar vazamento da CF.

4.5.2 Ensaio de atividade antibacteriana

4.5.2.1 Ensaio de determinação de concentração inibitória mínima (MIC)

Ensaio de determinação de MIC dos peptídeos foram realizados com quatro espécies diferentes de bactérias, duas gram-negativas, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, e duas gram-positivas, *Staphylococcus aureus*, e *Enterococcus faecalis*. A verificação do desenvolvimento bacteriano foi feita visualmente após 18 horas de incubação e os resultados indicam que, na faixa de concentração estudada, nenhum dos peptídeos foi capaz de abolir completamente a proliferação das bactérias (Fig. 4.61).

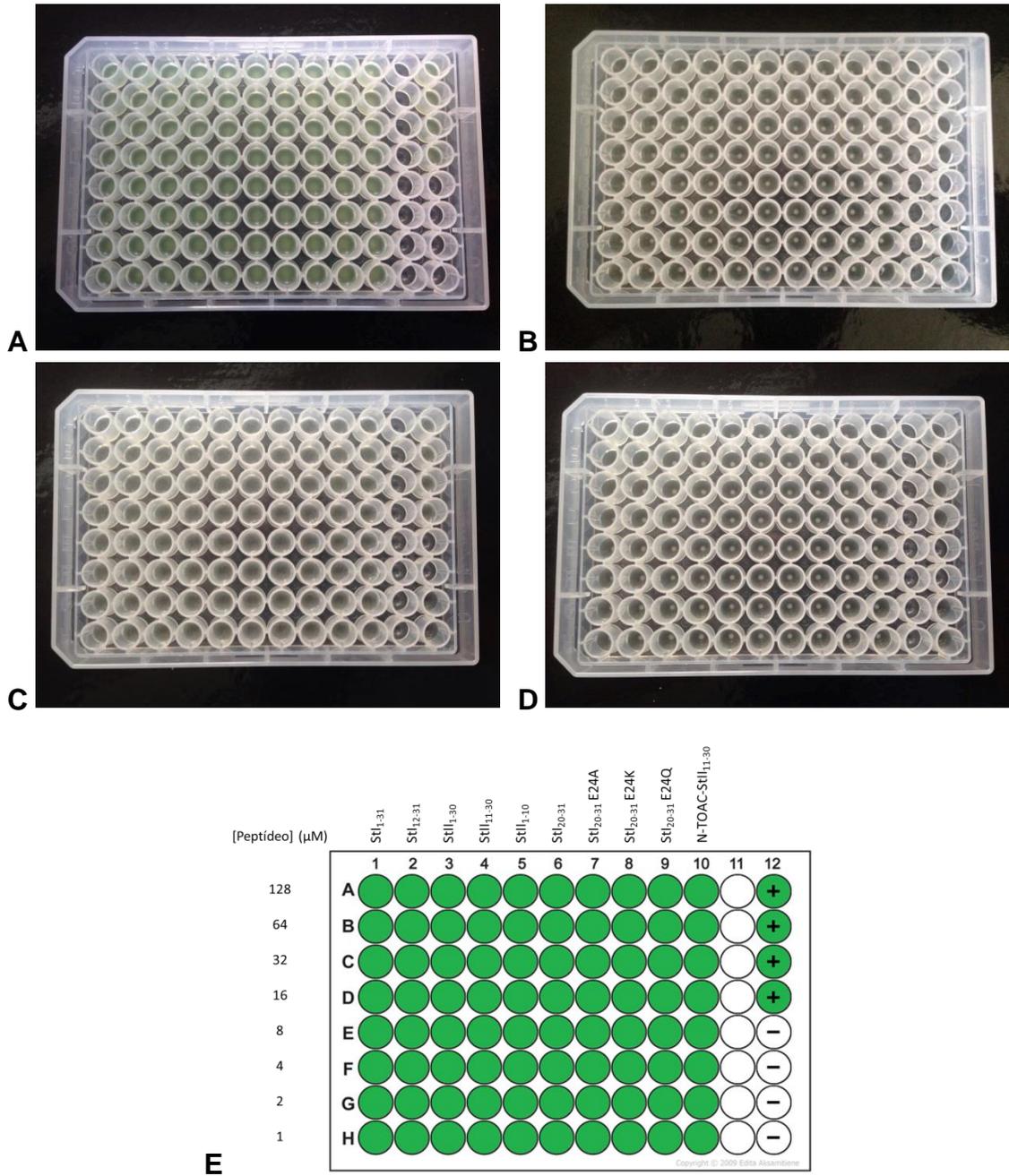


Figura 4.61. Fotos das placas de ensaio de MIC dos peptídeos de Sts I e StII contra: (A) *Pseudomonas aeruginosa*, (B) *Staphylococcus aureus*, (C) *Escherichia coli* e (D) *Enterococcus faecalis*. Layout da placa com os resultados obtidos no ensaio de MIC com as quatro espécies estudadas (E).

4.5.2.2 Ensaio inibição de proliferação bacteriana

Apesar da não possibilidade de determinação da MIC dos peptídeos, a atividade e influência destes sobre o crescimento das bactérias *E. coli* e *S. aureus*

foram analisadas por meio de curvas de crescimento na presença dos peptídeos (Figs. 4.62 e 4.63).

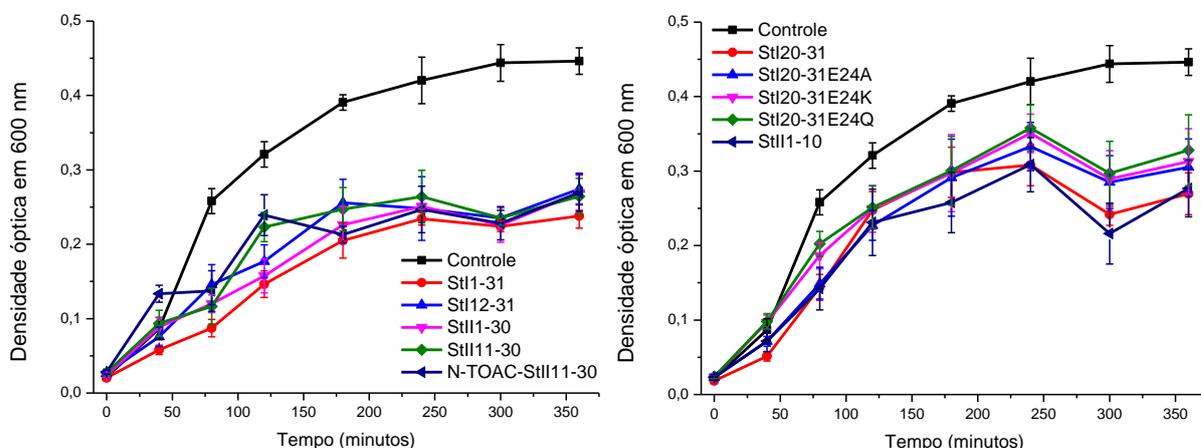


Figura 4.62. Curvas de crescimento da bactéria *E. coli* na ausência e presença de 50 μ M dos peptídeos derivados do N-terminal de esticolisinas.

Todos os peptídeos utilizados nesse estudo foram capazes de diminuir a taxa de proliferação da bactéria *E. coli*. A atividade dos peptídeos mais longos (gráfico a esquerda) é ligeiramente maior em comparação com os peptídeos curtos (Fig 4.62). Apesar da pouca diferença observada, Stl_{1-31} e $Stll_{1-30}$ parecem inibir a proliferação com maior eficiência do que seus análogos de 20 resíduos.

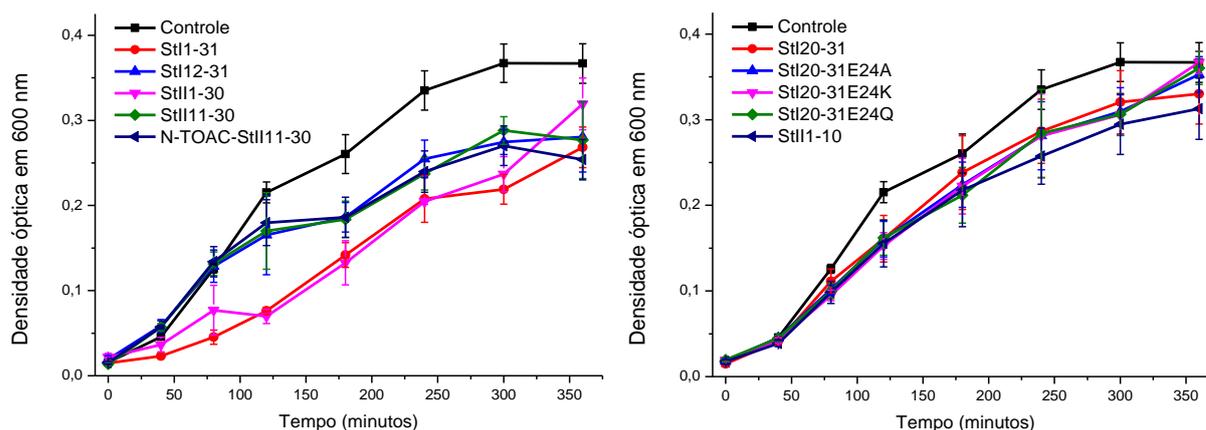


Figura 4.63. Curvas de crescimento da bactéria *S. aureus* na ausência e presença de 50 μ M dos peptídeos derivados do N-terminal de esticolisinas.

Contra *S. aureus*, a diferença de atividade entre os peptídeos longos e curtos é ainda mais acentuada. Stl_{1-31} e $Stll_{1-30}$, principalmente nas três primeiras horas de ensaio inibem a proliferação bacteriana de forma mais eficiente que os peptídeos de 20 resíduos. Os peptídeos curtos sintetizados para “screening” de moléculas ativas

também foram capazes de diminuir a taxa de crescimento bacteriano, entretanto em menos extensão que os outros peptídeos com maior número de resíduos.

4.5.3 Ensaio de atividade contra células humanas

4.5.3.1 Atividade hemolítica

A atividade hemolítica dos peptídeos derivados do N-terminal das esticolisinas foi medida para comparação entre os diferentes fragmentos e entendimento do papel de cada região do N-terminal nesse tipo de atividade, e análise de toxicidade dos fragmentos curtos de StI alvos do estudo de “screening” de sequências ativas.

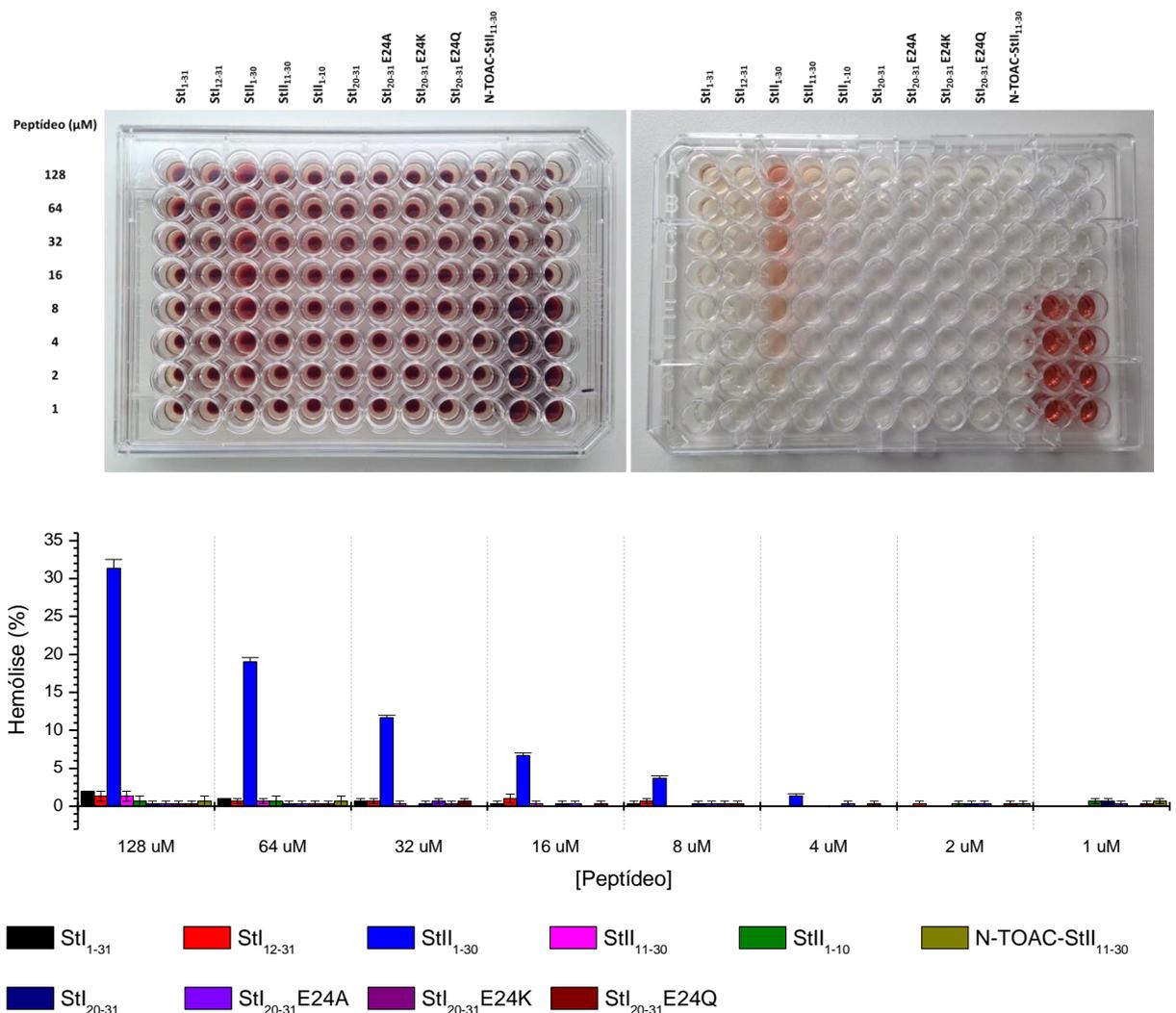


Figura 4.64. Foto das placas do ensaio de hemólise dos peptídeos de Sts I e II. Placa de ensaio contendo os peptídeos e hemácias (esquerda) e placa de medida com a diluição do sobrenadante da placa anterior (direita). Porcentagem de hemólise dos peptídeos de Sts I e II em diferentes concentrações (inferior).

Apenas StII₁₋₃₀ apresentou atividade hemolítica considerável na faixa de concentração estudada. É possível notar, tanto na placa de ensaio quanto na placa

de medida, uma coloração vermelha dispersa referente à presença de hemoglobina em solução somente nos poços com o peptídeo longo de StII e no controle positivo (Fig 4.64). Nos demais poços da placa de ensaio nota-se apenas uma coloração vermelha concentrada referente às células não lisadas (Fig 4.64).

A ausência de atividade dos segmentos 1-10 e 11-30 de StII separados indica a importância de ação conjunta de ambas as porções para que StII₁₋₃₀ seja capaz de ligar-se e exercer atividade sobre as hemácias. Juntamente com os resultados dos ensaios de atividade permeabilizante de vesículas lipídicas, os resultados de hemólise indicam que o segmento 1-10 estaria mais relacionado com a ligação de StII₁₋₃₀ à membranas zwitteriônicas e a porção 11-30 com a formação do poro estruturado em parte pelas hélices de caráter anfipático. A membrana externa dos eritrócitos, composta somente por lipídios zwitteriônicos (Virtanen et al., 1998) é alvo somente de StII₁₋₃₀, que mantém a habilidade de ligação e formação de poros em membranas com carga líquida superficial igual a zero.

As substituições nas posições 2 e 9 de StI e o resíduo extra de serina na posição 1, que diminuem o caráter hidrofóbico em relação à outra isoforma, são determinantes para abolir a atividade hemolítica de StI₁₋₃₁. A partir das observações com StII₁₋₃₀ e os outros peptídeos de StII, além dos estudos de ligação e atividade de StI₁₋₃₁ em vesículas lipídicas, acredita-se que a ausência de atividade do peptídeo longo de StI deva-se à sua incapacidade de se ligar às membranas das hemácias.

Em toda a faixa de concentração estudada os peptídeos curtos utilizados nos estudos de “screening” não apresentam atividade hemolítica considerável. A ausência de atividade hemolítica dos fragmentos curtos de StI podem contribuir no sentido de se obter moléculas com bom potencial terapêutico contra infecções. Os peptídeos curtos capazes de diminuir a taxa de proliferação bacteriana e que exibem baixa toxicidade poderiam eventualmente ser utilizados ou servirem de ponto de partida para o desenvolvimento de moléculas com as sequências derivadas de esticolisinas a fim de serem usadas no combate a infecções.

4.5.3.2 Toxicidade contra células humanas HeLa

Dois ensaios enfocando aspectos distintos do efeito tóxico dos peptídeos sobre células HeLa foram realizados. O ensaio de viabilidade celular, que mede a atividade metabólica das células, foi utilizado para medir a capacidade dos peptídeos de matar as células, e o ensaio de vazamento de LDH foi realizado para investigar possíveis perturbações na membrana celular causada pelos peptídeos. Apesar do tamanho da enzima LDH ser maior do que o raio hidrodinâmico do poro formado pelas esticolisinas e pelos peptídeos, o ensaio de LDH pretende avaliar a possível saída da enzima em função do desbalanço de íons dentro e fora da célula em função da formação do poro que poderia ao final romper a membrana permitindo o vazamento de LDH.

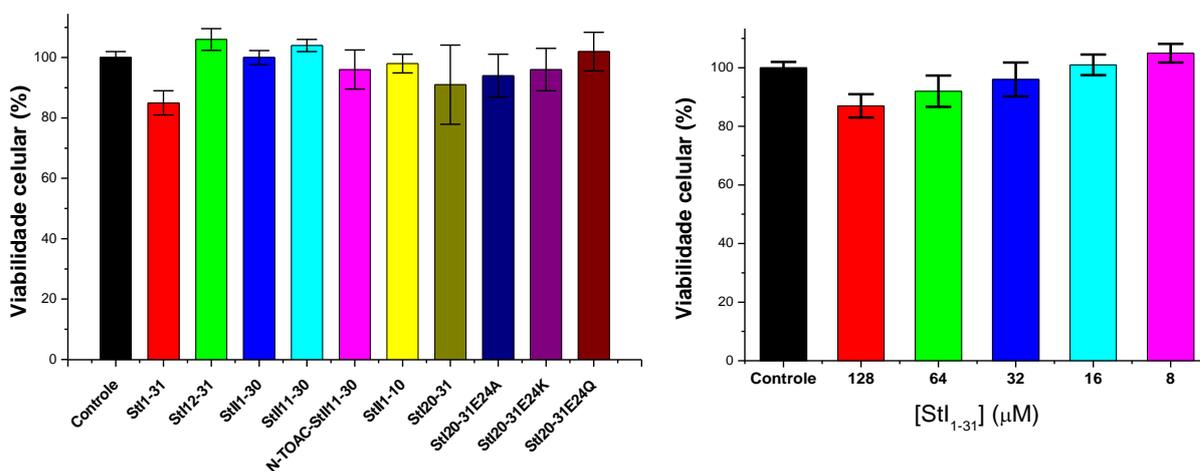


Figura 4.65. Porcentagem de células HeLa viáveis na presença de 128 µM de peptídeo em relação ao controle feito sem peptídeo (esquerda). Efeito de concentração de StI₁₋₃₁ na viabilidade de células HeLa (direita).

Apenas StI₁₋₃₁ foi capaz de diminuir a viabilidade celular de maneira significativa na concentração de 128 µM (Fig 4.65), diferentemente da tendência observada até então nos ensaios de ligação e atividade que mostrava o peptídeo longo de StII como sendo o mais ativo. StII₁₋₃₀ e os peptídeos de 20 resíduos StII₁₂₋₃₁ e StII₁₁₋₃₀ apresentaram baixa toxicidade. A atividade de StI₁₋₃₁ mostrou-se dependente da concentração do peptídeo (Fig 4.65).

Assim como observado nos ensaio de hemólise, os peptídeos curtos derivados da sequência 20-31 de StI apresentam baixa toxicidade contra células humanas HeLa (Fig 4.65). StI₂₀₋₃₁ e o mutante E24A apresentaram valores de viabilidade menores que o do controle, entretanto as diferenças não são

estatisticamente significativas. A baixa toxicidade contra esse modelo de célula reforça possíveis aplicações de moléculas derivadas dessa sequência no controle de bactérias presentes numa infecção.

Embora em baixa extensão, os ensaios de vazamento de LDH mostraram os peptídeos longos de ambas, StI e StII, como capazes de causar a maior porcentagem de dano na membrana das células (Fig. 4.66). StI₁₂₋₃₁ e StI₂₀₋₃₁E24Q também apresentam um extensão de dano significativa.

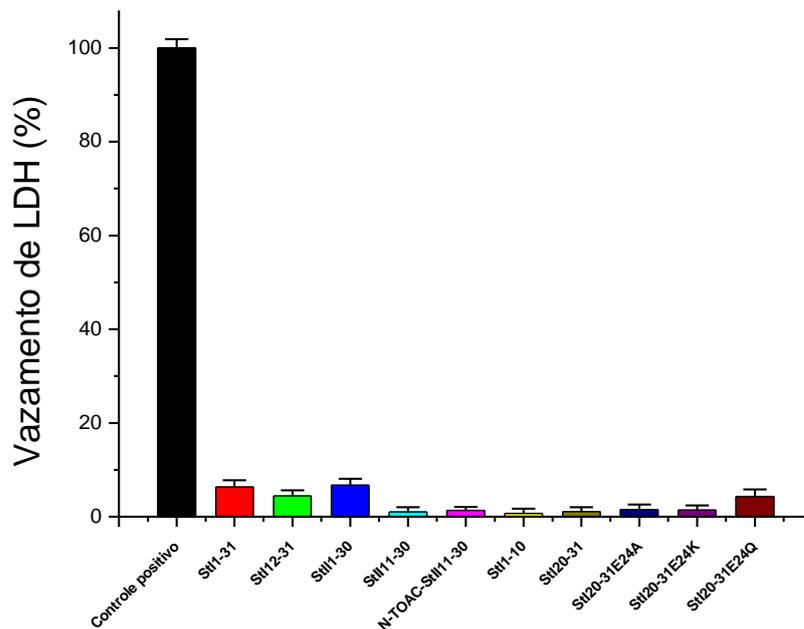


Figura 4.66. Porcentagem vazamento de LDH de células HeLa na presença de 128 μ M de peptídeo em relação ao controle feito sem peptídeo.

Novamente, os peptídeos de 31 e 30 resíduos apresentam maior atividade sobre a membrana, evidenciando a importância do segmento 1-10 na atividade de ambos os peptídeos de StI e StII. Essas regiões estariam relacionadas principalmente à etapa de ligação dos peptídeos nas membranas para posterior formação do poro.

5. Discussão:

5.1 Estudos dos peptídeos de esticolisinas e solução e em presença de membranas modelo

Os estudos realizados enfocam diversos aspectos da ação dos peptídeos como: ligação à membrana, dependência da composição lipídica, estrutura secundária, perturbação da membrana, habilidade formadora de poros e atividade biológica. A combinação de diversas técnicas espectroscópicas como CD, EPR e fluorescência, além de estudos *in silico* e de atividade foram capazes de mostrar as principais diferenças entre o N-terminal das duas isoformas e de como essas diferenças influenciam na atividade das toxinas. Utilizando peptídeos das sequências 1-31 (ou 30) e análogos mais curtos de 20 resíduos, sem os primeiros resíduos do N-terminal, a importância dessas regiões e da diferença nela entre as isoformas pode ser explorada.

A escolha de micelas como modelos de membrana está relacionada ao fato destas apresentarem os monômeros dispostos em curvatura positiva, assim como os lipídios na região do poro toroidal. Nosso laboratório tem proposto em trabalhos recentes que, dessa forma, em termos de curvaturas e outras propriedades relacionadas à disposição espacial dos monômeros nos agregados, a interação dos peptídeos com as micelas mimetizaria a condição encontrada quando da formação do canal. Para comparação, foram escolhidas cabeças polares correspondentes para os estudos com bicamadas e micelas.

5.1.1 Estudos *in silico*

Os resultados de predição e modelagem de estrutura mostraram que a região N-terminal de ambas as toxinas apresentam alta propensão de aquisição de conformação helicoidal na região entre os resíduos 14-25, de acordo com as estruturas de StI e StII resolvidas em alta resolução (Castrillo et al., 2010, Mancheño et al., 2003). No caso de StI₁₋₃₁, a região 1-8 apresentou uma certa tendência de estruturação em α -hélice enquanto o segmento 9-12 estaria essencialmente desordenado nas predições e modelos obtidos por PEPFOLD. O motivo com duas hélices ligadas por um segmento flexível foi observado experimentalmente em

estudos NMR do peptídeo StI₁₋₃₁ em micelas de DPC (Castrillo et al., 2010). Para o segmento 1-10 de StII₁₋₃₀ foi predito por Psipred que esse segmento conteria os resíduos 6-8 em fita- β . A presença de fita- β foi observada nos estudos de CD do peptídeo em solução e estaria relacionada à agregação dessa região de caráter hidrofóbico. PEPFOLD indicou que os resíduos 1-7 de StII₁₋₃₀ possuem certa tendência de estruturação em α -hélice, de forma que é possível especular que o motivo estrutural adotado pelo peptídeo seja semelhante ao de StI₁₋₃₁.

Os modelos em alta resolução obtidos por PEPFOLD evidenciaram a presença da α -hélice de caráter anfipático majoritariamente concentrada na região 14-25 dos quatro peptídeos estudados. O posicionamento das cadeias laterais hidrofóbicas em uma das faces da hélice e das cadeias laterais hidrofílicas na outra face confere à estrutura um alto momento hidrofóbico, característica de alta relevância para peptídeos capazes de interagir com a membrana e determinante na forma da interação (Eisenberg et al., 1982; Eisenberg et al., 1984). As simulações envolvendo a minimização da energia das moléculas em solução realizadas para a geração dos modelos sugere a interação entre as cadeias laterais com carga positiva e negativa em voltas sucessivas da face hidrofílica da hélice como, por exemplo, os pares Glu24-Lys20 em StI₁₋₃₁, Glu22-Ly26 em StI₁₋₃₀ e StII₁₁₋₃₀. A energia envolvida em tais interações é importante na estabilização da estrutura helicoidal e, na passagem dos peptídeos da água para o ambiente da membrana, favorecendo energeticamente a interação.

As regiões 8-12 dos modelos de StI₁₋₃₁ e StII₁₋₃₀ apresentam estrutura flexível, de acordo com as estruturas preditas e com o obtido por NMR para StI₁₋₃₁ (Castrillo et al., 2010). A flexibilidade de tal região e o fato de ela determinar o ângulo formado entre os segmentos em hélice possivelmente está relacionada à indução de curvatura positiva nos lipídios e formação do poro toroidal. Desse modo, a variação do ângulo entre as hélices que ocorreria entre a forma na superfície da membrana e a forma no poro manteria o peptídeo sempre próximo da região de interface da membrana, e com a face hidrofóbica voltada para o lado côncavo da curvatura.

Estudos *in silico* enfocando a interação com membranas apresentaram resultados que corroboram uma série de estudos realizados com as toxinas e os

peptídeos apresentados nesse trabalho. MEMSAT-SVM indicou a região entre os resíduos 7-24 das toxinas como a região de interação com a membrana e a hélice formada pelos peptídeos como uma hélice envolvida na formação de um poro/canal. Como visto nos modelos obtidos, essa região compreende essencialmente a hélice anfipática, a qual, devido ao alto valor de seu momento hidrofóbico, é predita como presente na região de interface da membrana.

5.1.2 Estudos em solução

Estudos da estrutura dos peptídeos em solução realizados empregando CD mostraram que todos apresentam um conteúdo helicoidal médio de 5 resíduos (Tabela 4.3). Relacionando os resultados de CD com os estudos de predição e modelagem temos que tal hélice estaria compreendida na região 14-25 das sequências. As porções em direção às extremidades dos peptídeos, exceto no caso de StII₁₋₃₀, estariam então, pelo cálculo do conteúdo estrutural, com conformação essencialmente ao acaso. Também com exceção de StII₁₋₃₀, o conteúdo estrutural dos peptídeos em solução não apresentou variações significativas com a mudança do pH.

StII₁₋₃₀ apresentou em pH 7,0 um maior conteúdo de resíduos em estrutura do tipo β . Anteriormente, estudos de CD em função da concentração do peptídeo relacionaram o aparecimento de tal estrutura à agregação do peptídeo em solução (Casallanovo et al., 2006). Pelas predições, a região hidrofóbica 1-10 do peptídeo concentraria maior parte de fita- β , sugerindo que essa seria a região sujeita a alteração conformacional observada em decorrência da agregação do peptídeo. O balanço de cargas na molécula também é capaz de alterar o estado de agregação de StII₁₋₃₀. O maior conteúdo de estrutura β em pH 7,0 (carga líquida +2) indica maior agregação nesse pH em relação ao pH 3,0 (carga líquida +4,7), provavelmente relacionada com a maior repulsão eletrostáticas entre as moléculas em pH 3,0 que, portanto, apresentam menor tendência de agregação.

O peptídeo N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ tomba rapidamente em solução originando espectros de EPR com linhas estreitas. A análise do desdobramento hiperfino e da relação de alturas h_0/h_{-1} em função do pH permitiu medir o pK_a do grupamento

amino-terminal do peptídeo bem como relacionar mudanças no estado de ionização da molécula com alterações no tombamento da molécula em solução. O estudo de tais propriedades em solução permitiram o melhor entendimento da variação na mobilidade da sonda em membranas em função do pH..

5.1.3 Estudos na presença de micelas

Ligação

Todos os peptídeos foram capazes de interagir com micelas de diferentes composições em diferentes pHs. A ligação em micelas pôde ser confirmada tanto por CD (Fig. 4.14), onde deflagrou um aumento da estrutura helicoidal dos peptídeos, quanto por EPR para o análogo contendo TOAC (Figs. 4.25 a 4.28). No caso do EPR, a interação peptídeo-micela foi evidenciada pelo alargamento das linhas nos espectros de EPR, refletindo uma diminuição na velocidade de tombamento do peptídeo, e pela diminuição nos valores de desdobramento hiperfino (Tabela 4.8), que refletem a passagem da sonda para um ambiente de menor polaridade.

A afinidade dos peptídeos pelas micelas foi quantificada por CD e EPR e permitiu a análise de diversos fatores relacionados à interação. Vale notar que tanto para micelas como para bicamadas, os valores de constante de ligação calculados pelas duas técnicas se mostraram satisfatoriamente concordantes em termos de números absolutos e de tendências relativas.

A comparação dos valores de K_b para os diferentes peptídeos evidenciou menor afinidade dos peptídeos de StI pelas micelas em comparação com os oriundos de StII e ainda que a diferença de interação entre StI₁₋₃₁ e StII₁₋₃₀ deve-se não somente às substituições nas posições 2 e 9. Estudos com os peptídeo StI₁₂₋₃₁ e StII₁₁₋₃₀ mostraram que as diferenças entre as sequências das toxinas na região 11-30 também influenciam a ligação em micelas e de modo que a ligação da sequência em StII é mais favorecida. A maior afinidade dos segmentos de StII pelas micelas pode ser relacionada ao fato de a toxina StII apresentar maior atividade que sua isoforma (de los Ríos *et al.*, 1999; Lanio *et al.*, 2001; Huerta *et al.*, 2001).

Contribuição de interações hidrofóbicas

Tanto por EPR quanto por CD foi observada a ligação dos peptídeos em micelas de LPC e LPC:LSM (90:10), formadas somente por lisofosfolipídios zwitteriônicos. A ligação dos fragmentos peptídicos nesses agregados indica a contribuição de interações hidrofóbicas entre a face apolar da hélice formada pelos peptídeos e as cadeias carbônicas de LPC e LSM para a interação.

A maior afinidade de StII₁₋₃₀ pelas micelas zwitteriônicas ressalta a importância de interações hidrofóbicas para a ligação. A ligação do peptídeo contendo o segmento 1-10, essencialmente hidrofóbico, é entropicamente favorecida (efeito hidrofóbico) na interação com as cadeias acila dos lisofosfolipídios formando a micela.

Estrutura e alterações conformacionais

A ligação dos peptídeos em micelas estudada por CD permitiu a análise das alterações conformacionais decorrentes da interação. Todos os peptídeos interagiram com os agregados, passando de conformação randômica em solução para conformação em α -hélice (Tabela. 4.6). A comparação de StII₁₁₋₃₀ com o peptídeo com TOAC mostrou que este é capaz de mimetizar satisfatoriamente o peptídeo com a sequência nativa na interação do ponto de vista conformacional.

Na estrutura cristalina da StII foi verificada a presença de uma α -hélice anfipática compreendendo os resíduos 14-23 (Mancheño et al., 2003). Os peptídeos aqui estudados contêm essa sequência. Os resultados mostram que a propensão a adquirir a estrutura α -helicoidal é mantida mesmo na ausência do restante da proteína. De fato, o número de resíduos em conformação helicoidal da forma ligada dos peptídeos parece ser um pouco maior do que o observado para a estrutura cristalina (Tabela 4.6). A formação de uma hélice mais extensa na presença da membrana poderia estar relacionada à ligação ao agregado lipídico e à formação do poro toroidal pela região N-terminal da proteína proposta como mecanismo de ação da toxina (Tejuca et al., 1996).

A análise dos valores de conteúdo estrutural em micelas em conjunto com os estudos *in silico* permite especular sobre quais regiões do N-terminal das toxinas estão sujeitas às alterações estruturais em decorrência da ligação em micelas. Com

em média 5 resíduos em hélice quando em solução, os peptídeos de 20 resíduos passaram para aproximadamente 16 resíduos em hélice na micela sendo que tal ganho estrutural estaria localizado nas regiões próximas ao C-terminal (resíduos 25-29) e N-terminal (resíduos 12-15) das sequências. Os peptídeos de 30 e 31 resíduos apresentam aproximadamente 24 resíduos em hélice e o ganho estrutural em relação à forma em solução estaria concentrado nas regiões 1-8 e 25-29, segundo os resultados de propensão de aquisição de estrutura secundária.

A forma do espectro de CD e o conteúdo de estrutura secundária das formas ligadas dos peptídeos variam muito pouco entre as várias composições lipídicas estudadas e em função do pH. Essa baixa variação indica que nessa condição, a estrutura do peptídeo depende essencialmente de propriedades básicas das micelas, comuns a todas as composições estudadas, e independe do estado de ionização das cadeias laterais dos peptídeos.

Contribuição de interações eletrostáticas

Na maioria dos casos, a inclusão de 10 mol% de LPA na composição das micelas deflagrou um aumento na afinidade dos peptídeos pelas micelas (Tabela 4.4). Esse aumento é um indicativo da contribuição de forças eletrostáticas atrativas entre as moléculas de LPA e as cargas positivas dos peptídeos. Outra evidência de como a presença de forças eletrostáticas influenciam a ligação é o fato de Stl₁₋₃₁, que possui carga líquida 0 em pH 7,0 apresentar a menor variação de afinidade em razão da inclusão de LPA nas micelas.

Quanto a micelas de LPC, apesar da estrutura final dos peptídeos nesses agregados não variar em função do pH, a afinidade pelas micelas se mostrou diferente em pHs 3,0, 7,0 e 11,0 (Tabela 4.5). Em pHs 7,0 e 11,0, as moléculas de LPC possuem uma carga positiva no átomo de nitrogênio da colina e um grupo fosfato com carga negativa. A variação da afinidade em função do estado de ionização dos peptídeos evidencia que a interação das cargas dos peptídeos com as cargas de LPC muda de acordo com o pH e a importância de forças eletrostáticas para a ligação. A menor ligação em pH 3,0 também evidencia como as cargas no peptídeo e nos lipídios influenciam a o grau de interação.

Os valores de constante de ligação calculados a partir dos espectros de EPR (Tabela 4.7) mostram maior extensão da ligação de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ em micelas contendo LPA do que em micelas compostas apenas por lisofosfolipídios zwitteriônicos, bem como a variação na afinidade do peptídeo pelas micelas em função do pH. Esse comportamento evidencia a contribuição de forças de caráter eletrostático na interação com micelas contendo carga líquida negativa na superfície.

Alterações na forma e tamanho de micelas de LPC

A interação dos peptídeos StI₁₋₃₁, StI₁₂₋₃₁ e StII₁₁₋₃₀ com micelas de LPC, confirmada por CD e EPR em diferentes pHs (Seções 4.4.1.1 e 4.4.1.2), foi estudada por SAXS (Fig. 4.35). As medidas de SAXS de micelas de LPC na ausência e presença do peptídeo indicam que os peptídeos foram capazes de alterar a forma e outras propriedades dos agregados, como visto anteriormente para StII₁₋₃₀ (Paulino, 2010).

Os peptídeos foram capazes de diminuir o raio parafínico e aumentar a esfericidade das micelas de LPC, indicando que tal habilidade depende essencialmente da região 11-30 das sequências que, quando ligadas, possuem estrutura em α -hélice. As alterações no formato e tamanho das micelas, de acordo com a variação observada no número de agregação, ocorrem em decorrência da reorganização e redistribuição dos monômeros de LPC entre as micelas. O fato de o tamanho e o número de agregação variar da mesma forma para os peptídeos de 20 e 31 (ou 30) resíduos de cada toxina reforça a ideia de que os efeitos observados estão essencialmente relacionados aos segmentos 11-30 dos peptídeos.

A partir dos dados obtidos pelos ajustes das curvas de SAXS, referentes às características das micelas de LPC na ausência e presença de StII₁₋₃₀, foram criadas representações tridimensionais da micelas nessas condições. Na representação é possível observar as variações de tamanho, anisometria e espessura da cabeça polar em decorrência da interação com o peptídeo, que teria a hélice anfipática posicionada na interface entre a região parafínica e as cabeças polares.

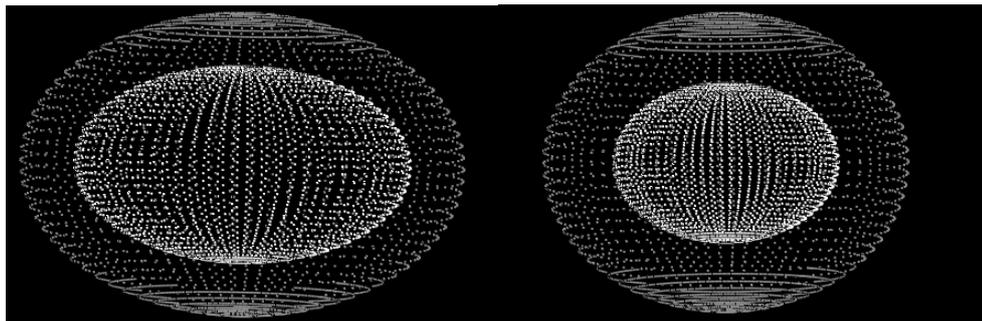


Figura 5.1. Representação da micela de LPC na ausência (esquerda) e presença de StI₁₋₃₀ (direita) elaboradas a partir dos parâmetros obtidos pelos ajustes das curvas de SAXS.

A alteração no tamanho e forma das micelas de LPC estaria relacionada com a capacidade do segmento N-terminal da toxina de induzir curvatura positiva dos lipídios em bicamadas, constituindo uma etapa importante no mecanismo de formação do poro toroidal. Por comparações entre resultados obtidos por SAXS para os diferentes peptídeos, é possível concluir que pelo menos parte da habilidade do segmento N-terminal das toxinas de induzir curvatura positiva nos lipídios para a formação do poro reside na especificidade da sequência. Os resultados corroboram os estudos do movimento transmembranar de lipídios pelo poro toroidal (Seção 4.4.2.5), que indicam que os peptídeos seriam capazes de formar poros com tal arquitetura.

Dinâmica da sonda de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ ligado em micelas

Pelos espectros de EPR do peptídeo contendo TOAC na presença de alta concentração de lisofosfolipídios é possível notar linhas mais alargadas, indicando a população fortemente imobilizada em pH 3,0 (Figs. 4.25, 4.26, 4.27 e 4.28). Em pHs 7,0 e 11,0 as linhas referentes à população imobilizada são mais estreitas, refletindo maior mobilidade nessas condições. Espectros de CD de N-TOAC indicam que, de forma geral, a estrutura da forma ligada do peptídeo não varia em função do pH; é provável então que a maior imobilização do resíduo de TOAC em pH 3,0 ocorra pela interação eletrostática entre a extremidade N-terminal com carga positiva nessa condição (e neutra em pHs 7,0 e 11,0) e o grupo fosfato com carga negativa nas micelas. Essa interação, não perturbaria de forma acentuada a estrutura da forma ligada, mas seria capaz de ancorar o resíduo de TOAC de modo a restringir sua mobilidade.

A maior variação de desdobramento hiperfino para a passagem da solução para a membrana em pH 3,0 (Tabela 4.8), assim como a maior restrição de mobilidade, indicam que nessa condição a sonda estaria localizada mais profundamente na micela.

Os estudos de variação de pH na presença de uma concentração alta de micelas indicam que a mudança entre as populações ligadas com maior e menor mobilidade ocorre entre pHs 4,0 e 6,0. Para confirmar se a mudança refere-se de fato à mudança no estado de ionização do N-terminal de TOAC, foram simulados espectros de EPR usando como base os espectros obtidos em 30 mM de LPC em pHs 3,0 e 11,0 (Fig. 4.25), onde deveriam estar presentes apenas a forma protonada ou a forma desprotonada de TOAC, respectivamente. Em seguida os espectros foram combinados considerando a proporção entre as populações de acordo com a equação de Henderson-Hasselbach, e assumindo o pK da transição como igual a 5. Os espectros simulados foram sobrepostos aos obtidos experimentalmente (Fig. 4.30) e mostraram muito boa concordância, confirmando a dependência da protonação de TOAC na mobilidade do peptídeo (Fig 5.2).



Figura 5.2. Espectros de EPR de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ simulados em pH 4,0 (—), 5,0 (—) e 6,0 (—) pela soma dos espectros experimentais em pHs 3,0 e 7,0, assumindo-se populações da forma protonada e desprotonada dadas pela equação de Henderson-Hasselbalch e um valor de pK de 5,0. Na figura, os espectros simulados estão sobrepostos aos espectros experimentais (em preto).

Valores de $\langle H \rangle$ e $\langle \mu H \rangle$ calculados para N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ indicam maior tendência de inserção das regiões entre 14-24 e 13-29 da hélice em pH 3,0 em relação ao pH 7,0 ($\langle H \rangle = 0,522$ e $\langle \mu H \rangle = 0,727$ para hélice entre 14-24 em pH 7,0 e $\langle H \rangle = 0,522$ e $\langle \mu H \rangle = 0,727$ em pH 3,0) (Eisenberg et al., 1982, Eisenberg et al., 1984, Keller, 2011). Considerando o peptídeo como quase que completamente helicoidal, de modo que a mobilidade de TOAC é influenciada pela mobilidade do

restante da hélice, a maior inserção em pH 3,0 corrobora maior imobilização de TOAC nos espectros nessa condição.

5.1.4 Estudos na presença de vesículas

Ligação dos peptídeos

Assim como observado para micelas, a interação dos peptídeos com bicamadas pôde ser verificada por CD (Figs. 4.36 a 4.40), onde a ligação deflagrou mudanças conformacionais nos peptídeos, e por EPR (Figs. 4.45 e 4.46), onde os espectros do peptídeo contendo TOAC ligado em LUV apresentam linhas alargadas e menor valor de desdobramento hiperfino quando comparados com os espectros do peptídeo em solução (Tabela 4.13).

Também foi possível confirmar a interação dos peptídeos com bicamadas pelos ensaios de atividade, de supressão da fluorescência de lipídios marcados com NBD pelo resíduo de TOAC, e de estudo do movimento transmembranar do lipídio DOPE-Pyr. Nesses ensaios, foram deflagrados processos que puderam ser monitorados de modo a confirmar a interação dos peptídeos com as bicamadas.

Dependência de interações eletrostáticas (efeito da presença de carga superficial nos lipídios e do pH)

Diferentemente do observado para micelas, a interação dos peptídeos de esticolisinas com bicamadas se mostrou essencialmente guiada por forças eletrostáticas. Por EPR (Figs. 4.43 a 4.46) e por CD (Figs. 4.36 a 4.40) verificou-se, de forma geral, a ligação dos peptídeos somente em bicamadas contendo 10 mol% de POPA ou DMPA, lipídios que podem apresentar uma ou duas cargas negativas dependendo do pH (Kooijman et al., 2005). A dependência da presença de POPA na interação também foi observada nos ensaios de atividade.

Estudos da estrutura dos peptídeos em presença de LUV por CD e as curvas de ligação relacionando a variação de $[\theta]$ em 222 nm com a concentração de lipídios indicam a necessidade de forças eletrostáticas para a interação. Em pH 7,0, observou-se por CD que, na presença de vesículas de POPC e POPC:SM (90:10), que possuem carga líquida superficial igual a zero, os peptídeos permanecem em

solução com estrutura ao acaso. Frente a LUV contendo 10 mol% de PA, os peptídeos são capazes de se ligar de modo a ter sua estrutura alterada. As constantes de ligação calculadas pelas curvas de ligação indicam que a afinidade do peptídeo Stl₁₋₃₁, com carga líquida igual a zero, é uma ordem de grandeza menor em relação aos demais peptídeos que possuem carga líquida +2 (Tabela 4.10) e ressaltam a importância de forças eletrostáticas para a interação. Apesar das diferenças, Stll₁₋₃₀, Stll₁₁₋₃₀ apresentaram essencialmente as mesmas constantes de ligação em LUV contendo POPA (Tabela 4.10), sugerindo, que a afinidade peptídeo-membrana nesse caso depende essencialmente da região 11-30 da sequência, região na qual se daria a interação eletrostática. Outra evidência que reforça a observação de que a interação eletrostática é determinante na extensão da interação com LUV contendo POPA é o fato da constante de afinidade de Stl₁₂₋₃₁, que mostrou menor afinidade dos por micelas, apresenta a mesma afinidade pelas LUV que Stll₁₋₃₀ e Stll₁₁₋₃₀. Do ponto de vista de carga líquida e número de cargas pontuais, Stl₁₂₋₃₁, Stll₁₋₃₀ e Stll₁₁₋₃₀ são equivalentes.

Outra evidência da dependência de forças de caráter eletrostático para a interação é a variação da extensão da ligação em função do pH, observada por EPR (Tabela 4.12). Em pH 3,0, N-TOAC-Stll₁₁₋₃₀ apresenta carga líquida próxima de +5 (Fig. 4.29), e a superfície da bicamada possui 5 mol% de carga negativa (Kooijman et al., 2005). Forças eletrostáticas de atração entre os grupos positivos do peptídeo e as cargas negativas de POPA seriam as responsáveis pela alta extensão da ligação do peptídeo nas LUV (Tabela 4.12). Em pH 7,0, forças eletrostáticas entre o peptídeo, que possui carga líquida +1 e a superfície da membrana contendo POPA, que possui 10 mol% de carga negativa (Kooijman et al., 2005), seriam as responsáveis pela interação. A distribuição de cargas no peptídeo e na superfície da membrana em pH 7,0 aparentemente é menos favorável para a interação em relação à distribuição de cargas no sistema em pH 3,0. Nos sistemas em pH 11,0, N-TOAC-Stll₁₁₋₃₀ apresentou praticamente a mesma afinidade por vesículas contendo ou não POPA (Tabela 4.12). A baixa afinidade do peptídeo pelas LUV contendo POPA em pH 11,0 deve-se provavelmente à repulsão eletrostática entre o peptídeo que possui carga líquida -1,3 e a superfície da bicamada com 20 mol% de carga negativa (Kooijman et al., 2005). Essa repulsão de cargas diminui a afinidade entre peptídeo e membrana em relação aos sistemas com POPA em pH 7,0.

Ligação a membranas em fase gel

Também foi possível comparar por CD e EPR a interação e as alterações conformacionais sofridas pelos peptídeos StII₁₁₋₃₀ e N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ em bicamadas em fase fluida e em fase gel (Figs. 4.42 e 4.47, respectivamente). Em bicamadas em fase gel, assim como discutido acima para bicamadas em fase fluida, a presença de forças eletrostáticas foi essencial para que ocorresse a ligação. A interação aconteceu de forma semelhante em vesículas de POPC:POPA (90:10) (fase fluida) e DPPC:DMPA (90:10) (fase gel), (Garidel et al., 1997) do ponto de vista conformacional e de afinidade. A interação dos peptídeos derivados do N-terminal de esticolisinas com membranas em diferentes fases e apresentando duas ou mais fases é importante para o entendimento da alta afinidade das toxinas por membranas com alto conteúdo de SM, que em várias condições apresentam coexistência de fase gel e líquido-cristal (Almeida et al., 2003). Estudos anteriores mostraram que StII₁₋₃₀ é capaz de perturbar em maior extensão bicamadas de POPC:DPPC (50:50) e de POPC:SM (50:50) que apresentam coexistência de fase gel e fase fluida (Paulino, 2010) em relação a bicamadas que apresentam apenas uma fase, agregando informações importantes a respeito do papel da SM e da coexistência de fases para a interação (Paulino, 2010).

Os resultados referentes à estrutura e afinidade de StII₁₁₋₃₀ e N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ obtidos por CD indicam comportamentos semelhantes de ambos na presença de LUV em fase gel. Tal semelhança é fundamental para que os resultados de estudos da posição de do resíduos de TOAC de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ pela supressão de fluorescência de NBD, que necessitam ser realizados em bicamadas em fase gel, possam ser extrapolados para StII₁₁₋₃₀.

Estrutura dos peptídeos ligados em bicamadas

Assim como na ligação em micelas, os peptídeos apresentaram espectros de CD característicos de conformação em α -hélice quando ligados em bicamadas. O cálculo do conteúdo helicoidal a partir dos espectros de CD mostra que nessa condição os StII₁₋₃₀ apresenta 21 resíduos nessa conformação enquanto os peptídeos de 20 resíduos possuem em média 16 resíduos em hélice (Tabela 4.11). Ligado à LUV, novamente, o peptídeo com TOAC mostrou-se um bom modelo para o peptídeo com a sequência nativa do ponto de vista conformacional.

O aumento do conteúdo helicoidal dos peptídeos em decorrência da ligação em bicamadas está de acordo com o de ganho de estrutura secundária em α -hélice pelas toxinas quando da interação com esse tipo de agregado como observado por CD (Mancheño et al., 2001; Alvarez et al., 2003) e FTIR (Menestrina et al., 1999). Esses estudos apontam um aumento no conteúdo helicoidal de 5% para as toxinas (aproximadamente 9 resíduos) decorrente da interação com vesículas. A α -hélice no N-terminal da toxina StII em solução possui aproximadamente 10 resíduos (Mancheño et al., 2003) e o peptídeo StII₁₋₃₀ na forma ligada apresenta 21 resíduos em hélice (Tabela 4.11). Dessa forma, a variação do conteúdo helicoidal de solução para membrana seria de 11 resíduos, próxima do ganho de hélice de 9 resíduos observados por CD e FTIR. A partir da hélice na região das posições 14 a 23 vista para StII em solução (Mancheño et al., 2003), parte do aumento no conteúdo de tal conformação se daria na direção dos resíduos C-terminais, 23-28 aproximadamente. No segmento N-terminal da sequência, região 1-10, a ligação do peptídeo antes em solução estaria relacionada com a perda de estrutura do tipo β e a formação de um segmento helicoidal. Os resultados com StII₁₁₋₃₀ ligado em LUV mostram que 16 resíduos encontram-se em α -hélice (Tabela 4.11). Considerando então que a porção 11-30 de StII₁₋₃₀ possui esses mesmos 16 resíduos em hélice, o segmento nessa conformação na região 1-10 seria de aproximadamente 5 resíduos.

Pela alta propensão de aquisição de estrutura helicoidal, e por ser uma das regiões da toxina que interagem mais fortemente com os lipídios, é concebível que as alterações conformacionais observadas na toxina refiram-se majoritariamente ao ganho de estrutura secundária observado para os peptídeos derivados da região N-terminal das esticolisinas.

Topologia da interação com bicamadas

Ensaio de supressão de fluorescência de NBD por N-TOAC-StII₁₁₋₃₀, e medidas de desdobramento hiperfino nos espectros de EPR do peptídeo permitiram o estudo da localização da sonda em bicamadas.

Os estudos de REES mostraram que nos lipídios marcados na cadeia acila, quando incorporados em LUV em fase gel, o grupamento NBD permanece na região das cadeias hidrocarbônicas, permitindo uma correta interpretação do efeito de

supressão de fluorescência sobre o fluoróforo em relação à posição deste na bicamada.

Foi possível observar a supressão de emissão de fluorescência somente no caso de DPPE-NBD. A supressão de fluorescência de DPPE-NBD em LUV de DPPC:DMPA:DPPE-NBD (89:10:1) corrobora o resultado observado para o mesmo lipídio marcado em LUV de POPC:POPA:DPPE-NBD (89:10:1) (Fig. 4.52). Nos dois sistemas, o fluoróforo encontra-se na posição esperada, e a supressão de fluorescência indica que a sonda paramagnética na posição N-terminal do peptídeo encontra-se na região das cabeças polares na bicamada.

Nos estudos de supressão de fluorescência em membranas em fase gel utilizando os lipídios marcados PC-6-NBD e PC-12-NBD, a adição da primeira alíquota do peptídeo deflagrou um aumento na intensidade e um deslocamento para o azul no máximo de emissão do fluoróforo (Fig. 4.53). O aumento da concentração do peptídeo diminuiu em baixa extensão a emissão de fluorescência do NBD em PC-6-NBD e não alterou a fluorescência da sonda em PC-12-NBD, indicando que a extremidade N-terminal do peptídeo estaria próxima de C6, entretanto, com menor frequência em relação à região das cabeças polares, e não se localiza próxima da altura de C12 na bicamada.

A localização do resíduo de TOAC próximo à região de interface também foi verificada por meio das medidas de desdobramento hiperfino do peptídeo ligado em bicamadas de POPC:POPA (90:10) e POPC:POPA:SM (80:10:10) (Tabela 4.6). Analisando os valores de desdobramento hiperfino nos espectros de EPR de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ ligado em bicamadas de acordo com o estudo de Marsh e Toniolo (2008) conclui-se que o resíduo de TOAC localiza-se entre a região das cabeças polares e C4.

A localização na interface é de certa forma esperada pensando-se no modelo de poro toroidal. Segundo tal modelo o peptídeo forma poros nas membranas, induzindo curvatura positiva nos lipídios, de modo que não ocorra a inserção profunda do fragmento polipeptídico nas cadeias acila. A posição da extremidade N-terminal do peptídeo está de acordo com observações já realizadas para os peptídeos de Sts que indicam que apenas a região 1-10 de StII, de caráter hidrofóbico, é capaz de se inserir mais profundamente na região das cadeias acila

(Ros et al., 2013). No modelo proposto de poro toroidal, a região ao redor do resíduo 11 (início aproximado da hélice anfipática) do peptídeo (ou da toxina) se inseriria apenas parcialmente na bicamada localizando-se próxima da interface, como observado nos estudos de supressão de fluorescência.

Alteração no empacotamento das cadeias acila resultante da interação peptídeo-membrana

O aumento de fluorescência e o deslocamento do máximo de emissão para o azul de PC-6-NBD e PC-12-NBD incorporados em LUV em fase gel indicam que a interação peptídeo-bicamada é capaz de perturbar o ambiente da sonda fluorescente de modo a alterar suas características (Fig. 4.53). O efeito observado não parece estar relacionado com a de supressão de fluorescência esperada caso a sonda paramagnética no peptídeo fosse capaz de penetrar até próximo das posições de C6 e C12 das cadeias acila. O aumento na intensidade e o deslocamento para o azul do máximo de emissão em espectros de fluorescência de fluoróforos que possuem caráter polar, de maneira geral, indicam a passagem da molécula para um ambiente de menor polaridade (Lakowicz, 2006).

Experimentos de REES indicam alterações na mobilidade do ambiente da sonda fluorescente em decorrência da ligação de N-TOAC-Still₁₁₋₃₀ (Fig. 4.58). O deslocamento do comprimento de onda de máxima emissão como consequência do aumento no comprimento de onda de excitação evidencia que o fluoróforo experimenta um ambiente com maior restrição de mobilidade devido ao maior empacotamento das moléculas dos lipídios ao redor do fluoróforo. Assim, as moléculas ao redor do fluoróforo têm sua taxa de reorientação para estabilização energética do estado excitado diminuída, aumentando o REES.

No caso de PC-12-NBD, não ocorre diminuição na intensidade de fluorescência após adição do peptídeo (Figs. 4.53 e 4.54). A não supressão da fluorescência no caso de PC-12-NBD evidencia também que o resíduo de TOAC na posição N-terminal do peptídeo não é capaz de penetrar até a posição 12 da cadeia acila na bicamada. A baixa supressão de fluorescência de PC-6-NBD e a não supressão no caso de PC-12-NBD pelo peptídeo (Fig. 4.54) sugerem que o aumento do efeito de REES causado pelo peptídeo não se deve ao “loop” das cadeias acila e

exposição do grupamento NBD à região das cabeças polares, e sim a uma maior restrição de mobilidade no ambiente da sonda.

Pelos resultados dos experimentos de REES, pela baixa supressão e não supressão da fluorescência de NBD por TOAC em PC-6-NBD e PC-12-NBD, respectivamente, e pelo aumento na intensidade de fluorescência e deslocamento do máximo de emissão para o azul, (Figs. 4.53 e 4.54) é plausível que o efeito do peptídeo nesses sistemas seja de aumento no empacotamento dos lipídios na bicamada. O maior empacotamento das cadeias acila sugerido pela alteração de comportamento da sonda NBD nas posições 6 e 12 corrobora estudos de EPR com o ester metílico do ácido esteárico contendo o grupamento nítróxido em C5 (5-MeSL) incorporado em bicamadas com coexistência de fases gel e líquido-cristalina que mostram que a interação do peptídeo StII₁₋₃₀ leva a um maior empacotamento lipídico.

Capacidade de formação de poros

Os estudos de atividade mostraram que os peptídeos são capazes de mimetizar funcionalmente as esticolisinas, conseguindo permeabilizar, por meio da formação de um poro, vesículas unilamelares causando a liberação da carboxifluoresceína encapsulada (Fig. 4.60). A permeabilização de membranas modelo mostrou-se dependente da composição lipídica da membrana. Assim como visto por CD e EPR, a interação dos peptídeos com bicamadas é pequena em vesículas formadas apenas por fosfolipídios zwitteriônicos (Fig. 4.60 e Tabelas 4.10 e 4.12).

Corroborando os experimentos de ligação em micelas, StII₁₋₃₀ apresentou maior atividade contra todas as composições de vesículas estudadas. A maior atividade do peptídeo de StII em comparação ao peptídeo StI₁₋₃₁ deve-se, segundo indicado pelos estudos de ligação por CD, à menor afinidade de StI₁₋₃₁, que possui dois resíduos com cadeias laterais com carga negativa, diminuindo a afinidade deste pelas membranas.

A diferença de atividade entre as toxinas StI e StII também pode em parte ser explicada pelas diferenças no segmento 11-30 das toxinas, visto que nos ensaios de vazamento StII₁₁₋₃₀ apresentou maior atividade que StI₁₂₋₃₁. A mudança de um

resíduo de ácido glutâmico da posição 22 em StII para 16 em StI diminui o momento hidrofóbico da hélice formada na região de 0,738 (StII) para 0,686 (StI), segundo o cálculo obtido por Heliquist (Gautier et al., 2008). Segundo o diagrama de Eisenberg, a tendência de um peptídeo acomodar-se na região de interface da membrana, como é esperado para o N-terminal das toxinas, é proporcional ao seu momento hidrofóbico, que no caso é maior em StII₁₁₋₃₀.

Comparando as constantes de afinidade dos peptídeos StII₁₋₃₀ e StII₁₁₋₃₀ por LUV calculadas por CD (Tabela 4.10) nota-se a que presença dos resíduos 1-10, de caráter hidrofóbico, não altera a afinidade em de StII₁₋₃₀ em relação ao fragmento de 20 resíduos. A maior atividade do peptídeo longo estaria então relacionada a uma maior capacidade de oligomerização na superfície da membrana e indução da curvatura positiva para a formação do poro, etapas posteriores à ligação. Os estudos de SAXS indicaram uma diminuição na anisometria das micelas em decorrência da interação com os peptídeos, sendo esse efeito maior para StII₁₋₃₀. Considerando a habilidade de os peptídeos tornarem as micelas mais esféricas como relacionada com a indução de curvatura positiva, e que o efeito é maior para StII₁₋₃₀, a maior atividade do peptídeo longo estaria então relacionada com maior eficiência de penetração e formação do poro, e não à diferenças na extensão da ligação.

A atividade dos peptídeos está na faixa de concentração entre 2 e 40 μM (Tabela 4.15), enquanto as toxinas apresentam atividade na faixa de nM em vesículas de PC contendo 5 mol% de PA (Alvarez et al., 2001). Os segmentos N-terminais são capazes de perturbar membranas formando poros, entretanto, a menor atividade em relação às toxinas evidencia a importância do corpo da proteína formado pelo sanduíche de folhas- β das esticolisinas, as regiões flexíveis em “loop” ligando as fitas- β , a α -hélice oposta à hélice N-terminal, relacionados diretamente à ligação e afinidade por bicamadas, bem como à eficiência de formação do poro. Experimentos de hemólise e de vazamento (Gutierrez-Aguirre et al., 2004; Casallanovo et al., 2006; Cilli et al., 2007; Ros et al., 2011) também mostraram a importância do corpo da proteína, que possui um sítio de interação específica com a cabeça polar de fosfolina, conferindo uma alta afinidade toxina-membrana (Mancheño et al., 2003).

Estudos de atividade hemolítica reforçaram a importância do segmento 1-10 no grau de atividade de fragmentos correspondentes à região N-terminal das esticolisinas. Enquanto StII₁₋₃₀ foi o único a exibir atividade hemolítica na faixa de concentração estudada, os outros peptídeos não se mostraram capazes de causar o vazamento de hemoglobina (Fig 4.64). O segmento 1-10 de StII é formado por aminoácidos que possuem caráter hidrofóbico e provavelmente auxiliam a toxina e o peptídeo correspondente no ancoramento na membrana e na formação do poro pela hélice N-terminal. Essa diferença também foi detectada em experimentos de vazamento de CF.

A incapacidade de formar poros e de causar vazamento de CF por parte dos peptídeos curtos sintetizados para o “screening” de atividade antibacteriana mostra que as porções do N-terminal selecionadas, bem como sequências com as substituições escolhidas, não retêm as características observadas nos outros fragmentos de 20 ou mais resíduos. Ainda, os peptídeos não se mostraram capazes de causar hemólise.

Estrutura do poro/Indução do movimento transmembranar de lipídios na bicamada

Por meio de experimentos de supressão da fluorescência de PC-6-NBD por albumina apenas no lado externo da bicamada, foi mostrado que a ação das toxinas na membrana deflagra a redistribuição de lipídios entre os folhetos da bicamada, sugerindo a formação de um poro toroidal (Alvarez et al., 2001).

No experimento utilizando o fosfolipídio marcado DOPE-Pyr foi possível constatar a formação de um poro toroidal por todos os peptídeos. O peptídeo permitiu a redistribuição do lipídio marcado, antes presente no folheto externo da bicamada, pelos dois folhetos (Figs. 4.59). Os resultados representam uma forte evidência de que o poro formado pelos peptídeos correspondentes aos segmentos N-terminais das esticolisinas apresenta estrutura igual ou semelhante ao poro proposto para as próprias toxinas.

Esses resultados complementam experimentos de medidas de raio hidrodinâmico dos poros formados pelos peptídeos (Casallanovo et al., 2006) que mostraram que, assim como as toxinas (Tejuca et al., 2001), o raio hidrodinâmico do

poro formado peptídeos é de 1 nm. Essa é mais uma indicação da semelhança estrutural entre os poros formados pelos peptídeos e pelas toxinas. Tais observações reforçam o uso dos peptídeos derivados do N-terminal das toxinas no estudo do mecanismo de formação de poros pelas esticolisinas.

Comparação entre micelas e bicamadas – correlação com diferentes arranjos lipídicos nas etapas de formação do poro

Micelas e vesículas apresentam diferentes estruturas, grau de empacotamento, bem como hidratação na região da cabeça polar (Israelachvili et al., 1975), resultando em diferentes características em relação à interação com os peptídeos derivados do N-terminal de esticolisinas.

Os diferentes graus de empacotamento entre os dois tipos de agregado pôde ser confirmado por EPR. Comparando os valores de S obtido para o peptídeo ligado em micelas ($S \approx 0,51$, Tabela 4.8) e em bicamadas ($S \approx 0,66$, Tabela 4.13) fica claro que as LUV apresentam maior empacotamento em relação a micelas. A diferença no empacotamento e na exposição da região das cadeias carbônicas ao meio aquoso é provavelmente a principal responsável pela diferença de afinidade calculada para os peptídeos em relação aos diferentes tipos de agregados.

É também plausível que a diferença no empacotamento dos agregados lipídicos esteja relacionada com a necessidade (para bicamadas) ou não (para micelas) da participação de forças eletrostáticas para que ocorra a ligação dos peptídeos às membranas modelo. Os peptídeos ligaram com maior afinidade a micelas contendo ou não lipídios com pelo menos uma carga negativa (Tabelas 4.4 e 4.5) do que a bicamadas, quando a ligação ocorreu apenas em membranas contendo 10 mol% de POPA ou DMPA (Tabela 4.10). A curvatura positiva e a maior exposição e hidratação do início das cadeias hidrocarbônicas nas micelas permitem mais facilmente a interação com a face apolar da hélice, aumentando assim a afinidade dos peptídeos pelo agregado. Em bicamadas, onde as cadeias hidrocarbônicas estão menos expostas, forças eletrostáticas se fazem necessárias para a interação que a interação ocorra.

Os valores de desdobramento hiperfino medidos em bicamadas em pH 3,0 ($a_N \approx 15,7$ G, Tabela 4.13) são maiores que os obtidos em micelas nas mesmas

condições ($a_N \approx 15,4$ G, Tabela 4.8), sugerindo que quando ligado às micelas o resíduo de TOAC N-terminal experimenta um ambiente mais apolar. Esse fato deve-se ao menor empacotamento molecular das micelas que permite que o peptídeo penetre mais na região das cadeias acila dos lisofosfolípidios.

Foi relatado na literatura que os dez primeiros resíduos de Still₁₋₃₀ são capazes de penetrar mais profundamente na região das cadeias acila (Ros et al., 2013) em relação ao segmento 11-30, que consiste essencialmente no segmento contendo a hélice anfipática, e que localiza-se preferencialmente na região da interface, como visto pelas medidas de desdobramento hiperfino, e nos ensaios de supressão de fluorescência de Lip-NBD pelo peptídeo contendo TOAC.

Os resultados aqui descritos levam à proposta de que a ligação dos peptídeos derivados do N-terminal de esticolisinas em bicamadas representaria a etapa de ligação, ganho de estrutura secundária e acomodação da hélice da toxina na interface água-membrana. Devido ao empacotamento dos lipídios em micelas, que possivelmente se assemelha àquele presente na estrutura do poro toroidal, onde os lipídios se encontrariam em curvatura positiva, a interação com micelas mimetizaria a topografia dos peptídeos e do segmento N-terminal da toxina na região do poro. A proposta de que os dois casos representariam os diferentes momentos da interação do peptídeo com membranas foi também formulada em estudos da interação do peptídeo antimicrobiano tritripticina com bicamadas e micelas (Bozelli Jr. et al., 2012) (Salay et al, 2004).

Foi também verificado maior conteúdo helicoidal dos peptídeos ligados em micelas (Tabelas 4.6 e 4.11) do que em bicamadas; essa diferença poderia estar relacionada a alterações conformacionais na passagem do peptídeo da interface da bicamada para a forma constituindo o canal. Ainda, a maior afinidade dos peptídeos por micelas pode estar relacionada ao mecanismo de formação do poro e manutenção das hélices do N-terminal das toxinas na estrutura do poro.

A sequência de amino ácidos dos peptídeos teria a capacidade de selecionar os lipídios para formar o poro (propensão para curvatura positiva) e a organização dos lipídios teria a capacidade de modular a conformação da sequência peptídica para participar do poro toroidal. Seria um processo de influência bi-direcional.

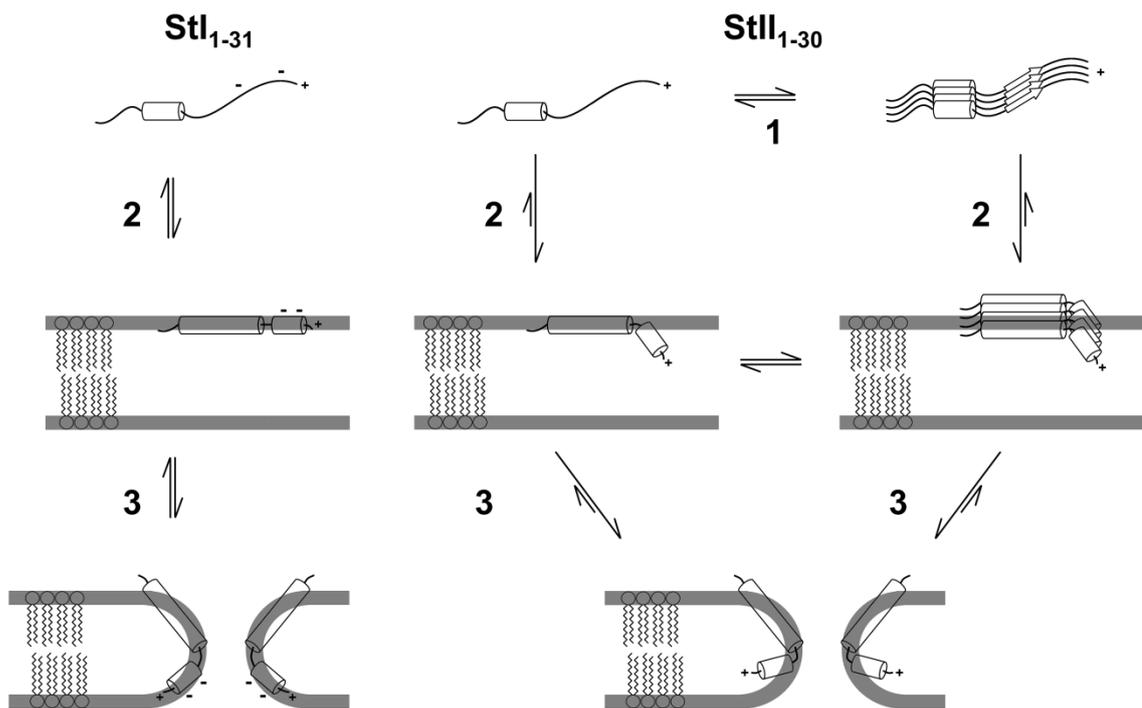


Figura 5.2. Esquema representativo das etapas de desagregação (1), ligação (2) e formação de um poro toroidal (3) pelos peptídeos StI₁₋₃₁ e StII₁₋₃₀.

As etapas envolvendo desde a passagem dos peptídeos longos de ambas as toxinas da solução para a membrana bem como a formação de um poro toroidal estão sumarizadas no esquema da Figura 5.2.

O equilíbrio de desagregação de StII₁₋₃₀ em solução estaria diretamente acoplado com sua passagem para a superfície da membrana. O peptídeo, que possui a região 1-10 com alto índice de hidrofobicidade (<H>), quando agregado apresenta um conteúdo de estrutura do tipo β como representado no esquema. Estudos de variação de pH mostraram que as formas menos agregadas apresentam menor conteúdo dessa estrutura indicando que as formas monoméricas em solução apresentam mais estrutura ao acaso. As formas monoméricas em solução de StI₁₋₃₁ e StII₁₋₃₀ apresentam um baixo conteúdo helicoidal de aproximadamente 5 resíduos, mais provavelmente localizados na região 14-25 dos peptídeos. StII₁₋₃₀ poderia ligar-se à membrana tanto na forma monomérica quanto na forma agregada e a forma do agregado não é conhecida.

Resultados de CD indicam que a passagem dos peptídeos da solução para a superfície da membrana deflagrou o aumento no conteúdo helicoidal de 5 para 21 resíduos em StII₁₋₃₀. Como discutido anteriormente, levando em consideração

resultados de Castrillo et al. (2010) e as predições e modelagem estrutural, seriam formados dois segmentos de hélice entre os resíduos 13-28 e 4-9 aproximadamente, ligados por uma região flexível. StII₁₋₃₀, que possui carga líquida +2, além de maior hidrofobicidade, liga-se com maior afinidade às bicamadas do que StI₁₋₃₁, como representado pelas setas (Fig. 5.3), indicando o equilíbrio entre as formas ligada e em solução. As cargas negativas na região 1-11 de StI fazem com que o poder de ligação do peptídeo e penetração da extremidade N-terminal na membrana sejam limitados. Devido ao caráter hidrofóbico da região 1-10 de StII₁₋₃₀, essa penetraria mais profundamente na região das cadeias acila como já descrito anteriormente na literatura (Ros et al., 2013) e evidenciado no esquema.

A maior penetração da região 1-10 de StII na membrana (Ros et al., 2013) também está relacionada com as etapas seguintes de oligomerização, reorganização dos lipídios na membrana, inserção parcial das hélices e formação do poro toroidal. Nos estudos de SAXS, StII₁₋₃₀ mostrou maior capacidade de alterar o tamanho e forma de micelas de LPC, habilidade essa que poderia estar relacionada com a indução de curvatura positiva para a formação do poro. Essa característica também desloca em maior extensão o equilíbrio dessa etapa no sentido de formação do poro para StII₁₋₃₀ em relação à StI₁₋₃₁. A forma final do poro formado pelos diferentes fragmentos seria semelhante, com uma maior inserção dos dez primeiros resíduos de StII nos lipídios em curvatura positiva.

5.1.5 Atividade biológica

Atividade antibacteriana

Embora não tenha sido possível determinar a concentração inibitória mínima dos peptídeos (Fig. 4.61), os ensaios com as curvas de crescimento bacteriano em função do tempo mostraram que os peptídeos, desde os mais longos até os mais curtos sintetizados para screening de atividade, são capazes de interagir com as bactérias Gram-negativa *E. coli* e Gram-positiva *S. aureus* (Figs. 4.62 e 4.63). A diminuição na taxa de crescimento bacteriano indica que os fragmentos peptídicos são capazes de interagir com as células, mais provavelmente ligando-se à membrana, e que, nesse caso, essa ligação se dá provavelmente por interações

eletrostáticas entre os fragmentos que possuem alta densidade de cargas positivas e lipídios carregados negativamente. A importância desse tipo de interação na ação de peptídeos antimicrobianos já é conhecida da literatura (Jenssen et al., 2006).

Outra característica estrutural importante de agentes antimicrobianos que agem em membranas é o balanço entre hidrofobicidade e hidrofiliabilidade (Jenssen et al., 2006). Todos os peptídeos testados, exceto StII₁₋₁₀, possuem praticamente o mesmo número de cadeias laterais hidrofóbicas e cadeias laterais polares sem carga ou com carga líquida diferente de zero. Além disso, a conformação adotada pelos peptídeos de 20 ou mais resíduos, e as possíveis estruturas helicoidais dos peptídeos da região 20-31 de StI, como já discutido anteriormente, concentram cada tipo de cadeia lateral em faces opostas da estrutura de modo a ressaltar o caráter anfipático.

Além da alta concentração de cargas positivas, e ainda relacionado ao balanço anfipático nas moléculas, algumas classes de peptídeos antimicrobianos destacam-se pelo alto conteúdo de resíduos de triptofano (Jenssen et al., 2006). Esse aminoácido é conhecido pela alta afinidade pela região de interface das membranas (Killian & von Heijne, 2000), e sua ausência na sequência do N-terminal das estolicinas provavelmente é determinante em limitar a potência dos peptídeos contra bactérias. Nas toxinas, a região responsável pelo reconhecimento e ligação das mesmas a membranas é rica em resíduos de triptofano e está localizada no sanduíche de folhas- β (Mancheño et al., 2003) de modo que, evolutivamente, a sequência da região N-terminal haveria se desenvolvido sem contemplar tal função.

Toxicidade dos peptídeos

De forma geral, todos os peptídeos apresentaram baixa toxicidade nos ensaios de hemólise e de atividade contra células HeLa. Apenas StII₁₋₃₀ apresentou atividade hemolítica considerável nos ensaios realizados, enquanto nos ensaios de viabilidade de células HeLa, apenas StI₁₋₃₁ alterou significativamente o número de células viáveis e ainda assim em baixa extensão.

Apesar de aparentemente não alterar a viabilidade celular em grande extensão, os peptídeos foram capazes de perturbar a membrana dessas células causando vazamento da enzima citossólica LDH.

Apesar da baixa toxicidade, a faixa de atividade antimicrobiana de todos os peptídeos estudados é baixa em comparação com outros peptídeos já relatados na literatura (Jenssen et al., 2006). A baixa atividade diminui o índice terapêutico das moléculas no tratamento de infecções bacterianas.

A baixa toxicidade dos fragmentos estudados, e a ideia de que a atividade de alguns dos peptídeos como StII₁₋₃₀ seria limitada essencialmente pela ligação à membrana, indica que o uso de somente a porção N-terminal das toxinas na montagem de imunocjugados seria interessante no sentido de tornar as moléculas híbridas mais seletivas. Excluindo o sítio de ligação da toxina, a atividade formadora do peptídeo dependeria então essencialmente da ligação anticorpo-antígeno, de alta especificidade.

6. Conclusões

Os estudos das propriedades funcionais, estruturais e dinâmicas dos peptídeos correspondentes à região N-terminal das esticolisinas I e II reportados nesse trabalho foram capazes de confirmar a hipótese de que os peptídeos são capazes de mimetizar a hélice do N-terminal nas toxinas, além de agregar informações relevantes ao mecanismo de formação do poro.

Foram esclarecidas as contribuições das regiões 1-10 e 11-30 dos peptídeos das esticolisinas para a ligação em membranas modelo – micelas e bicamadas – bem como para etapas posteriores da formação do poro, como oligomerização e, principalmente, na reorganização dos lipídios para formação do poro toroidal. StII₁₋₃₀ apresentou os maiores valores de constantes de ligação em micelas, maior alteração na forma de micelas de LPC e maior atividade em relação aos outros peptídeos estudados. Os resultados indicam que a região hidrofóbica dos dez primeiros resíduos é determinante nas diferenças observadas.

As constantes de ligação calculadas evidenciam a espontaneidade da interação com membranas. A extensão na ligação varia de acordo com as características intrínsecas de cada peptídeo e com as propriedades do agregado lipídico. As comparações entre os diversos sistemas permitiu a análise da contribuição de forças eletrostáticas e de interações entre regiões apolares dos peptídeos e dos lipídios.

Estudos conformacionais mostraram que os peptídeos, ao se ligar a membranas modelo possuem a capacidade de adquirir estrutura α -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). Correlacionando os conteúdos de estrutura secundária calculados a partir do CD com as predições de estrutura e modelagem molecular foi possível analisar as estruturas dos diferentes fragmentos nas diferentes etapas do mecanismo de formação do poro. A distribuição das diferentes estruturas secundárias ao longo das moléculas também pôde ser investigada, e os resultados mostraram a alta tendência de estruturação em hélice da região 14-25 de todos os peptídeos, e diferenças de conformação entre as regiões 1-10 das duas toxinas. Além do caráter hidrofóbico, diferenças nas estruturas secundárias adotadas pelas regiões de 1-10 de StI e StII

parecem também ser determinantes da forma como os peptídeos interagem com as membranas.

Além da possibilidade de medida do coeficiente de partição do peptídeo com TOAC em membranas modelo, a partir dos quais se elucidou a natureza das forças presentes na interação, foi possível obter por estudos de EPR de N-TOAC-StII₁₁₋₃₀ informações sobre a dinâmica do peptídeo em solução e ligado a bicamadas e micelas, bem como inferir a posição da sonda na bicamada.

Estudos de supressão de fluorescência de lipídios marcados com NBD pelo resíduo paramagnético em N-TOAC-StII₁₁₋₃₀, assim como as medidas de desdobramento hiperfino por EPR, indicaram a presença da sonda na região das cabeças polares dos lipídios na bicamada. Esses resultados corroboram estudos com análogos fluorescentes de StII₁₋₃₀ que apontam a presença do início do segmento formando a hélice anfipática (região ao redor do resíduo 11) na região de interface (Ros et al., 2013) e estão de acordo com o modelo proposto para o poro toroidal formado pelas actinoporinas, no qual ocorreria apenas uma inserção parcial do segmento constituindo a hélice anfipática na membrana (Anderluh et al., 2003).

Mudanças na organização dos lipídios puderam ser monitoradas pela fluorescência de lipídios marcados com NBD em ensaios de REES e nos experimentos de supressão de fluorescência mencionados acima. Aparentemente o peptídeo foi capaz de aumentar o empacotamento dos lipídios na altura de C12.

A presença de SM na composição das membranas modelo, esfingolipídio conhecido como receptor putativo da toxina em membranas (Tejuca et al., 1996; de los Ríos et al., 1998), não teve efeito significativo na ligação, conformação e atividade dos peptídeos alvos desse estudo. Esses e outros resultados indicam que a alta afinidade das esticolisinas por membranas contendo SM está relacionada a aspectos na estrutura da proteína contemplando a região do sanduíche de folhas β .

Estudos com micelas representaram um modelo topográfico do poro toroidal. É interessante ressaltar o aumento no conteúdo helicoidal dos peptídeos quando ligados em micelas e a maior afinidade destes por micelas em relação a bicamadas.

Os resultados obtidos pelo estudo de peptídeos correspondentes ao N-terminal de esticolisinas I e II corroboram diversas observações já realizadas

envolvendo as toxinas nas diferentes etapas de formação do poro. O esquema proposto na discussão engloba uma série de novas informações relevantes para o mecanismo de ação das actinoporinas considerando informações já reportadas na literatura e obtidas com os estudos desenvolvidos.

7. Referências bibliográficas

- Abrams, F.S., London, E. EXTENSION OF THE PARALLAX ANALYSIS OF MEMBRANES PENETRATION DEPTH OF THE POLAR REGION OF MODEL MEMBRANES: USE OF FLUORESCENCE QUENCHING BY A SPIN-LABEL ATTACHED TO THE PHOSPHOLIPID POLAR HEADGROUP. (1993) *Biochemistry* 32, 10826-31.
- Alegre-Cebollada, J. Martínez del Pozo, A., Gavilanes, J.G., Goormaghtigh E. INFRARED SPECTROSCOPY STUDY ON THE CONFORMATIONAL CHANGES LEADING TO PORE FORMATION OF THE TOXIN STICHOLYSIN II. (2007) *Biophys. J.* 93, 3191-3201.
- Almeida, R.F.M., Fedorov, A., Prieto, M. SPHINGOMYELIN/PHOSPHATIDYLCHOLINE/CHOLESTEROL PHASE DIAGRAM: BOUNDARIES AND COMPOSITION OF LIPID RAFTS. (2003) *Biophys. J.* 85, 2406-2416.
- Alvarez, C., Dalla Serra, M., Potrich, C., Bernhart, I., Tejuca, M., Martinez, D., Pazos, F., Lanio, M.E., Menestrina, G. EFFECTS OF LIPID COMPOSITION ON MEMBRANE PERMEABILIZATION BY STICHOLYSIN I AND II, TWO CYTOLYSINS OF THE SEA ANEMONE *STICHODACTYLA HELIANTHUS*. (2001) *Biophys. J.* 80, 2761-2774.
- Alvarez, C., Casallanovo F., Shida, C.S., Nogueira, L.V., Martinez, D., Tejuca, M., Pazos, I.F., Lanio, M.E., 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. (2003) *Chem. Phys. Lipids* 122, 97-105.
- Alvarez, C., Mancheño, J.M., Martínez, D., Tejuca, M., Pazos, F., Lanio, M.E. STICHOLYSINS, TWO PORE-FORMING TOXINS PRODUCED BY THE CARIBBEAN SEA ANEMONE *STICHODACTYLA HELIANTHUS*: THEIR INTERACTION WITH MEMBRANES. (2009) *Toxicon* 54, 1135-47.
- Anderluh, G., Pungercar, 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*. (1997) *Protein Eng.*, 10, 751-755.
- Anderluh, G., Barlic, A., Podlesek, Z., Maček, P., Pungercar, J., Gubensek, F., Zecchini, M., Dalla Serra, M., Menestrina, G. CYSTEINE SCANNING MUTAGENESIS OF AN EUKARYOTIC PORE-FORMING TOXIN FROM SEA ANEMONE: TOPOLOGY IN LIPID MEMBRANES. (1999) *Eur. J. Biochem.* 263, 128-136.
- Anderluh, G., Macek, P. CYTOLYTIC PEPTIDE AND PROTEIN TOXINS FROM SEA ANEMONE (ANTHOZOA: ACTINIARIA). (2002) *Toxicon* 40, 111-124.
- 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. (2003) *J. Biol. Chem.* 46, 45216-45223.

- Anderson, D.J., Hanson, P., McNulty, J., Millhauser, G., Monaco, V., Formaggio, F., Crisma, M., Toniolo, C. SOLUTION STRUCTURES OF TOAC-LABELED TRICHOGIN GA IV PEPTIDES FROM ALLOWED ($G \approx 2$) AND HALF-FIELD ESR. (1999) *J. Am. Chem. Soc.* 121, 6919–6927.
- Antonini, V., Pérez-Barzaga, V., Bampi, S., Pentón, D., Martínez, D., Dalla Serra, M., Tejuca, M. FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF STICHOLYSIN I AND W111C MUTANT REVEALS THE SEQUENCE OF THE ACTINOPORIN'S PORE ASSEMBLY. (2014) *PLoS One*. 9, 110824.
- 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. (2001) *Structure* 39, 341-346.
- Atherton, E., Sheppard, R. C. FMOC SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS: A PRACTICAL APPROACH. (1989) Oxford University Press.
- Avila, A.D., de Acosta, M.C., Lage, A. A NEW IMMUNOTOXIN BUILT BY LINKING A HEMOLYTIC TOXIN TO A MONOCLONAL ANTIBODY SPECIFIC FOR IMMATURE T LYMPHOCYTES. (1988) *Intl. J. of Cancer* 42, 568–571.
- Avila, A.D., de Acosta, M.C., Lage, A. A CARCINOEMBRYONIC ANTIGENDIRECTED IMMUNOTOXIN BUILT BY LINKING A MONOCLONAL ANTIBODY TO A HEMOLYTIC TOXIN. (1989) *Intl. J. of Cancer* 43, 926–929.
- Bakrač, B., Gutiérrez-Aguirre, I., Podlesek, Z., Sonnen, A.F., Gilbert, R.J., Macek, P., Lakey, J.H., Anderluh, G. MOLECULAR DETERMINANTS OF SPHINGOMYELIN SPECIFICITY OF A EUKARYOTIC PORE-FORMING TOXIN. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 18665-18677.
- Belmonte, G., Pederzoli, C., Macek, P., Menestrina, G. PORE FORMATION BY THE SEA ANEMONE CYTOLYSIN EQUINATOXIN II IN RED BLOOD CELLS AND MODEL LIPID MEMBRANES. (1993) *J. of Memb. Biol.* 131, 11-22.
- Bianconi, M.L., Schreier, S. EPR STUDY OF MEMBRANE PARTITIONING, ORIENTATION, AND MEMBRANE-MODULATED ALKALINE HYDROLYSIS OF A SPIN-LABELED BENZOIC ACID ESTER. (1991) *J. Phys. Chem.* 95, 2483-2486.
- Bozelli Jr., J.C., Sasahara, E.T., Pinto, M.R.S., Nakaie, C.R., Schreier, S. EFFECT OF HEAD GROUP AND CURVATURE ON BINDING OF THE ANTIMICROBIAL PEPTIDE TRITRPTICIN TO LIPID MEMBRANES, (2012) *Chem. Phys. Lipids* 165, 365-373.
- Brière, R., Lemaire, H., Rassat, A. NITROXYDES XV: SYNTHÈSE ET ÉTUDE DE RADICAUX LIBRES STABLES PIPÉRIDINIQUES ET PYRROLIDINIQUES. (1965) *Bull. Soc. Chim. France* 3271 - 3283.
- Casallanovo, F., Oliveira, F.J.F., Souza, F.C., Ros, U., Martínez, Y., Pentón, D., Tejuca, M., Martínez, D., Pazos, F., Pertinhez, T. A., Spisni, A., Cilli, E.M., Lanio, M.E., Alvarez C., Schreier, S. MODEL PEPTIDES MIMIC THE STRUCTURE AND FUNCTION OF THE N-TERMINUS OF THE PORE-FORMING TOXIN STICHOLYSIN II. (2006) *Biopolymers* 84, 169-180.

- Castrillo, I., Araujo, N.A., Alegre-Cebollada, J., Gavilanes, J.G., Martínez-del-Pozo, A., Bruix, M. SPECIFIC INTERACTIONS OF STICHOLYSIN I WITH MODEL MEMBRANES: AN NMR STUDY. (2010) *Proteins* 78, 1959-1970.
- Chen, R.F., Knutson, J.R. MECHANISM OF FLUORESCENCE CONCENTRATION QUENCHING OF CARBOXYFLUORESCEIN IN LIPOSOMES: ENERGY TRANSFER TO NONFLUORESCENT DIMERS. (1988) *Anal. Biochem.* 172, 61-77.
- Cilli, E.M., Pigossi, F.T., Crusca Jr., E., Ros, U., Martinez, D., Lanio, M.E., Alvarez, C., Schreier, S. CORRELATION BETWEEN DIFFERENCES IN AMINO-TERMINAL SEQUENCES AND DIFFERENT HEMOLYTIC ACTIVITY OS STICHOLYSINS. (2007) *Toxicon* 50, 1201-1204.
- de los Ríos, V., Mancheño, J.M., Lanio, M.E., Onaderra, M., Gavilanes, J.G. MECHANISM OF THE LEAKAGE INDUCED ON LIPID MODEL MEMBRANES BY THE HEMOLYTIC PROTEIN STICHOLYSIN II FROM THE SEA ANEMONE *STICHODACTYLA HELIANTHUS*. (1998) *Eur. J. Biochem.* 252, 284-289.
- de los Ríos, V., Mancheño, J.M., Martinez Del Pozo, A., Alfonso, C., Rivas, G., Oñaderra, M., Gavilanes, J.G. STICHOLYSIN II, A CYTOLYSIN FROM THE SEA ANEMONE *STICHODACTYLA HELIANTHUS*, IS A MONOMER-TETRAMER ASSOCIATING PROTEIN. (1999) *FEBS Lett.* 455, 27-30.
- Demchenko, A.P. THE RED-EDGE EFFECT: 30 YEARS OF EXPLORATION. (2002) *Luminescence* 17, 19-42.
- Drechsler, A., Potrich, C., Sabo, J.K., Frisanco, M., Guella, G., Dalla Serra, M., Anderluh, G., Separovic, F., Norton, R.S. STRUCTURE AND ACTIVITY OF THE N-TERMINAL REGION OF THE EUKARYOTIC CYTOLYSIN EQUINATOXIN II. (2006) *Biochemistry* 45, 1818-1828.
- Drechsler, A., Miles, A.J., Norton, R.S., Wallace, B.A., Separovic, F. EFFECT OF LIPID ON THE CONFORMATION OF THE N-TERMINAL REGION OF EQUINATOXIN II: A SYNCHROTRON RADIATION CIRCULAR DICHROISM SPECTROSCOPIC STUDY. (2009) *Eur Biophys J.* 39, 121-127.
- Dyson, H.J., Cross, K.J., Houghten, R.A., Wilson, I.A., Wright, P.E., Lerner, R.A. THE IMMUNODOMINANT SITE OF A SYNTHETIC IMMUNOGEN HAS A CONFORMATIONAL PREFERENCE IN WATER FOR A TYPE-II REVERSE TURN. (1985) *Nature* 318, 480-483.
- Dyson, H.J., Wright, P.E. ANTIGENIC PEPTIDES. (1995) *FASEB J.* 9, 37-42.
- Eisenberg, D., Weiss, R.M., Terwilliger, T.C. THE HELICAL HYDROPHOBIC MOMENT: A MEASURE OF THE AMPHIPHILICITY OF A HELIX. (1982) *Nature* 299, 371-374.
- Eisenberg, D., Schwarz, E., Komaromy, M., Wall, R. ANALYSIS OF MEMBRANE AND SURFACE PROTEIN SEQUENCES WITH THE HYDROPHOBIC MOMENT PLOT. (1984) *J. Mol. Biol.* 15, 125-142.
- Ernandes, J.R., Schreier, S., Chaimovich, H. SPIN LABEL STUDIES OF MICELLAR AND PRE-MICELLAR AGGREGATES. (1976) *Chem. Phys. Lipids*, 16, 19-30.
- Flack, H.D. LOUIS PASTEUR'S DISCOVERY OF MOLECULAR CHIRALITY AND SPONTANEOUS RESOLUTION IN 1848, TOGETHER WITH A COMPLETE

- REVIEW OF HIS CRYSTALLOGRAPHIC AND CHEMICAL WORK. (2009) *Acta Cryst.*, A65, 371-389.
- Franzoni, L., Nicastro, G., Pertinhez, T.A., Tatò, M., Nakaie, C.R., Paiva, A.C., Schreier, S., Spisni, A. STRUCTURE OF C-TERMINAL FRAGMENT 300-320 OF THE RAT ANGIOTENSIN II AT_{1A} RECEPTOR AND ITS RELEVANCE WITH RESPECT TO G-PROTEIN COUPLING. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 9734-9741.
- Franzoni, L., Nicastro, G., Pertinhez, T.A., Oliveira, E., Nakaie, C.R., Paiva, A.C., Schreier, S., Spisni, A. STRUCTURE OF TWO FRAGMENTS OF THE THIRD CYTOPLASMIC LOOP OF THE RAT ANGIOTENSIN II AT_{1A} RECEPTOR. IMPLICATIONS WITH RESPECT TO RECEPTOR ACTIVATION AND G-PROTEIN SELECTION AND COUPLING. (1999) *J Biol Chem.* 274, 227-35
- Frazão, B., Vasconcelos, V., Antunes, A. SEA ANEMONE (CNIDARIA, ANTHOZOA, ACTINIARIA) TOXINS: AN OVERVIEW. (2012) *Mar. Drugs*, 10, 1812-1851.
- Freed, J.H., Fraenkel, G.K. THEORY OF LINEWIDTHS IN ELECTRON SPIN RESONANCE SPECTRA. (1963) *J. Chem. Phys.* 39, 326-348.
- García-Ortega, L., Alegre-Cebollada, J., García-Linares, S., Bruix, M., Martínez-Del-Pozo, A., Gavilanes, J.G. THE BEHAVIOR OF SEA ANEMONE ACTINOPORINS AT THE WATER-MEMBRANE INTERFACE. (2011) *Biochim Biophys Acta*, 1808, 2275-2288.
- Garidel, P., Johann, C., Blume, A. NONIDEAL MIXING AND PHASE SEPARATION IN PHOSPHATIDYLCHOLINE:PHOSPHATIDIC ACID MIXTURES AS A FUNCTION OF ACYL CHAIN LENGTH AND PH. (1997) *Biophys. J.* 72, 2196-2210.
- Gautier, R., Douguet, D., Antony, B., Drin, G. HELIQUEST: A WEB SERVER TO SCREEN SEQUENCES WITH SPECIFIC A-HELICAL PROPERTIES. (2008) *Bioinformatics* 24, 2101-2102.
- Ghimire, H., Hustedt, E.J., Sahu, I.D., Inbaraj, J.J., McCarrick, R., Mayo, D.J., Benedikt, M.R., Lee, R.T., Grosser, S.M., Lorigan, G.A. DISTANCE MEASUREMENTS ON A DUAL-LABELED TOAC ACHR M2δ PEPTIDE IN MECHANICALLY ALIGNED DMPC BILAYERS VIA DIPOLAR BROADENING CW-EPR SPECTROSCOPY. (2012) *J. of Phys. Chem. B.* 116, 3866-3873.
- Greenfield, N., Fasman, G.D. COMPUTED CIRCULAR DICHROISM SPECTRA FOR THE EVALUATION OF PROTEIN CONFORMATION. (1969) *Biochemistry* 8, 4108-16.
- Griffith, O.H., Cornell, D.W., McConnell, H.M. NITROGEN HYPERFINE TENSOR AND G TENSOR OF NITROXIDE RADICALS. (1965) *J. Chem. Phys.* 43, 2909-2910.
- Griffith, O.H., Dehlinger, P.J., Van, S.P. SHAPE OF THE HYDROPHOBIC BARRIER OF PHOSPHOLIPID BILAYERS. EVIDENCE FOR WATER PENETRATION IN BIOLOGICAL MEMBRANES. (1974) *J. Membr. Biol.* 15, 159-192.
- Gutierrez-Aguirre, I., Podlesek, Z., Barlic, A., Macek, P., Anderluh, G., Gonzalez-Manas, J.M. MEMBRANE INSERTION OF THE N-TERMINAL ALPHA-HELIX

- OF EQUINATOXIN II, A SEA ANEMONE CYTOLYTIC TOXIN. (2004) *Biochem. J.* 384, 421-428.
- Haldar S, Chaudhuri A, Chattopadhyay A. ORGANIZATION AND DYNAMICS OF MEMBRANE PROBES AND PROTEINS UTILIZING THE RED EDGE EXCITATION SHIFT. (2011) *J Phys Chem B.* 115, 5693-5706.
- Hinds, M.G., Zang, W., Anderluh, G. Hansen, P.E., Norton, R.S. SOLUTION STRUCTURE OF THE EUKARYOTIC PORE-FORMING CYTOLYSIN EQUINATOXIN II: IMPLICATIONS FOR PORE FORMATION. (2002) *J. Mol. Biol.* 315, 1219-1229.
- Holtzer, M.E., Holtzer, A. ALPHA-HELIX TO RANDOM COIL TRANSITIONS: DETERMINATION OF PEPTIDE CONCENTRATION FROM THE CD AT THE ISODICHROIC POINT. (1992) *Biopolymers* 32, 1675-1677.
- 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. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 41916-41924.
- Hubbell, W.L., McConnell, H.M. MOLECULAR MOTION IN SPIN-LABELED PHOSPHOLIPIDS AND MEMBRANES. (1971) *J. Am. Chem. Soc.* 93, 314-326.
- Huerta, V., Morera, V., Guanche, Y., China, G., Gonzalez, L.J., Betancourt, L., Martinez, D., Alvarez, C., Lanio, M.E., Besada, V. PRIMARY STRUCTURE OF TWO CYTOLYSIN ISOFORMS FROM *STICHODACTYLA HELIANTHUS* DIFFERING IN THEIR HEMOLYTIC ACTIVITY. (2001) *Toxicon* 39, 1253-1256.
- Inbaraj, J.J., Cardon, T.B., Laryukhin, M., Grosser, S.M., Lorigan, G.A. DETERMINING THE TOPOLOGY OF INTEGRAL MEMBRANE PEPTIDES USING EPR SPECTROSCOPY. (2006) *J. Am. Chem. Soc.* 128, 9549–9554.
- Inbaraj, J.J., Laryukhin, M., Lorigan, G.A. DETERMINING THE HELICAL TILT ANGLE OF A TRANSMEMBRANE HELIX IN MECHANICALLY ALIGNED LIPID BILAYERS USING EPR SPECTROSCOPY. (2007) *J. Am. Chem. Soc.* 129, 7710–7711.
- Israelachvili, J.N., Mitchell, J.D., Ninham, B.W., Theory of Self-Assembly of Hydrocarbon Amphiphiles into Micelles and Bilayers (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 389, 13-19.
- James, Z.M., McCaffrey, J., Torgersen, K.D., Karim, C.B., Thomas, D.D. PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS IN CALCIUM TRANSPORT REGULATION PROBED BY SATURATION TRANSFER EPR. (2012) *Biophys. J.* 103, 1370–1378.
- Jost, P., Libertini, L.J., Hebert, V.C., Griffith, O.H. LIPID SPIN LABELS IN LECITHIN MULTILAYERS. A STUDY OF MOTION ALONG FATTY ACID CHAINS. (1971) *J. Mol. Biol.* 59, 77-98.
- Jost, P., Waggoner A.S., Griffith, O.H. STRUCTURE AND FUNCTION OF BIOLOGICAL MEMBRANES. (Rothfield, L.I. Ed) (1971) Academic Press, 84–144.

- Karim, C.B., Kirby, T.L., Zhang, Z., Nesmelov, Y., Thomas, D.D. PHOSPHOLAMBAN STRUCTURAL DYNAMICS IN LIPID BILAYERS PROBED BY A SPIN LABEL RIGIDLY COUPLED TO THE PEPTIDE BACKBONE. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 14437–14442.
- Karim, C.B., Zhang, Z., Howard, E.C., Torgersen, K.D., Thomas, D.D. PHOSPHORYLATION-DEPENDENT CONFORMATIONAL SWITCH IN SPIN-LABELED PHOSPHOLAMBAN BOUND TO SERCA. (2006) J. Mol. Biol. 358, 1032–1040.
- Keller, R.C.A. NEW USER-FRIENDLY APPROACH TO OBTAIN AN EISENBERG PLOT AND ITS USE AS A PRACTICAL TOOL IN PROTEIN SEQUENCE ANALYSIS. (2011) Int J Mol Sci. 12, 5577–5591.
- Kelly, S.M., Jess, T.J., Price, N.C. HOW TO STUDY PROTEINS BY CIRCULAR DICHROISM. (2005) Biochim. Biophys. Acta 751, 119-139.
- Killian, J.A., von Heijne, G. HOW PROTEINS ADAPT TO A MEMBRANE-WATER INTERFACE. (2000) Trends Biochem Sci., 25, 429-434.
- Kivelson, D. THEORY OF ESR LINEWIDTHS OF FREE RADICALS. (1960) J. Chem. Phys. 33, 1094-1106.
- Knowles, P.F., Marsh, D., Rattle, H.W.E. MAGNETIC RESONANCE OF BIOMOLECULES. AN INTRODUCTION TO THE THEORY AND PRACTICE OF NMR AND ESR IN BIOLOGICAL SYSTEMS. (1976) Wiley-Interscience, London.
- Kooijmann, E.E., Carter, K.M., van Laar, E.G., Chupin, V., Burger, K.N., de Kruijff, B. WHAT MAKES THE BIOACTIVE LIPIDS PHOSPHATIDIC ACID AND LYSOPHOSPHATIDIC ACID SO SPECIAL? (2005) Biochemistry 44, 17007-17015.
- 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. (2007) FEBS J., 274, 539-550.
- Lakowicz, J.R. PRINCIPLES OF FLUORESCENCE SPECTROSCOPY. (2006) Springer Science, New York, NY.
- Lam, Y.H., Hung, A., Norton, R.S., Separovic, F., Watts, A.. SOLID-STATE NMR AND SIMULATION STUDIES OF EQUINATOXIN II N-TERMINUS INTERACTION WITH LIPID BILAYERS. (2010) Proteins 78, 858-872.
- Lanio, M.E., Morera, V., Alvarez, C., Tejuca, M., Gomez, T., Pazos, F., Besada, V., Martinez, D., Huerta, V., Padron, G., Chavez, M.A. PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF TWO HEMOLYSINS FROM *STICHODACTYLA HELIANTHUS*. (2001) Toxicon 39, 187-194.
- López-Castilla, A., Pazos, F., Schreier, S., Pires, J.R. SOLUTION NMR ANALYSIS OF THE INTERACTION BETWEEN THE ACTINOPORIN STICHOLYSIN I AND DHPC MICELLES--CORRELATION WITH BACKBONE DYNAMICS. (2014) Proteins, 82, 1022-1034.
- Malavolta, L., Oliveira, E., Cilli, E.M., Nakaie, C.R. SOLVATION OF POLYMERS AS MODELS FOR SOLVENT EFFECT INVESTIGATION: PROPOSITION OF A NOVEL POLARITY SCALE. (2002) Tetrahedron 58, 4383–4394.

- Malavolta, L., Poletti, E.F., Silva, E.H., Schreier, S., Nakaie, C.R. APPLICATION OF ELECTRON PARAMAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY FOR VALIDATION OF THE NOVEL (AN PLUS DN) SOLVENT POLARITY SCALE. (2008) *Int. J. Mol. Sci.* 9, 1321–1332.
- Malovrh, P., Viero, G., Serra, M.D., Podlesek, Z., Lakey, J.H., Macek, P., Menestrina, G., Anderluh, G. A NOVEL MECHANISM OF PORE FORMATION: MEMBRANE PENETRATION BY THE N-TERMINAL AMPHIPATHIC REGION OF EQUINATOXIN. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 22678-22685.
- Mancheño, J.M., de los Ríos, V., Martínez del Pozzo, A., Lanio, M.E., Onaderra, M., Gavilanes, J.G., PARTIALLY FOLDED STATES OF THE CYTOLYTIC PROTEIN STICHOLYSIN II. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* 1545, 122-131.
- Mancheño, J.M., Benito, J.M., Martínez-Ripoll, M., Gavilanes, J.G., Hermoso, J.A. CRYSTAL AND ELECTRON MICROSCOPY STRUCTURES OF STICHOLYSIN II ACTINOPORIN REVEAL INSIGHTS INTO THE MECHANISM OF MEMBRANE PORE FORMATION. (2003) *Structure* 11, 1319-1328.
- Marchetto, R., Schreier, S., Nakaie, C.R. A NOVEL SPIN-LABELED AMINO ACID DERIVATIVE FOR USE IN PEPTIDE SYNTHESIS - (9-FLUORENYLMETHYLOXY CARBONYL) -2,2,6,6-TETRAMETHYLPYPERIDINE-N-OXYL-4-AMINO-4-CARBOXYLIC ACID. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* 115, 11042–11043.
- Marsh, D. ORIENTATION OF TOAC AMINO-ACID SPIN LABELS IN A-HELICES AND B-STRANDS. (2006) *J. Magn. Reson.* 180, 305-310.
- Marsh, D., Jost, M., Peggion, C., Toniolo, C. TOAC SPIN LABELS IN THE BACKBONE OF ALAMETHICIN: EPR STUDIES IN LIPID MEMBRANES. (2007) *Biophys. J.* 92, 473–481.
- Marsh, D., Toniolo, C. POLARITY DEPENDENCE OF EPR PARAMETERS FOR TOAC AND MTSSL SPIN LABELS: CORRELATION WITH DOXYL SPIN LABELS FOR MEMBRANE STUDIES. (2008) *J Magn Reson.* 190, 211-221.
- Marsh, D. SPIN-LABEL EPR FOR DETERMINING POLARITY AND PROTICITY IN BIOMOLECULAR ASSEMBLIES: TRANSMEMBRANE PROFILES. (2009) *Appl. Magn. Reson.* 37, 435-454.
- Mason, J.T., Huang, C. HYDRODYNAMIC ANALYSIS OF EGG PHOSPHATIDYLCHOLINE VESICLES. (1978) *Ann. NY Acad. Sci.* 308, 29-48.
- Maupetit, J., Derremaux, P., Tufféry, P. PEP-FOLD: AN ONLINE RESOURCE FOR DE NOVO PEPTIDE STRUCTURE PREDICTION. (2009) *Nucleic Acids Res.* 37, 498-503.
- Maupetit, J., Derremaux, P., Tufféry, P. A FAST METHOD FOR LARGE-SCALE DE NOVO PEPTIDE AND MINIPROTEIN STRUCTURE PREDICTION. (2010) *J. Comput. Chem.* 31, 726-738.
- Mechaly, A.E., Bellomio, A., Gil-Cartón, D., Morante, K., Valle, M., González-Mañas, J.M., Guérin, D.M. STRUCTURAL INSIGHTS INTO THE OLIGOMERIZATION AND ARCHITECTURE OF EUKARYOTIC MEMBRANE PORE-FORMING TOXINS. (2011) *Structure* 19, 181-191.
- Menestrina, G., Cabiliaux, V., Tejuca, M. SECONDARY STRUCTURE OF SEA ANEMONE CYTOLYSINS IN SOLUBLE AND MEMBRANE BOUND FORM BY

- INFRARED SPECTROSCOPY. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254, 174-180.
- Merrifield, R. B. SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS. I. THE SYNTHESIS OF A TETRAPEPTIDE. (1963) *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149-2154.
- Monaco, V., Formaggio, F., Crisma, M., Toniolo, C., Hanson, P., Millhauser, G.L. ORIENTATION AND IMMERSION DEPTH OF A HELICAL LIPOPEPTAIBOL IN MEMBRANES USING TOAC AS AN ESR PROBE. (1999) *Biopolymers* 50, 239-253.
- Morante, K., Caaveiro, J.M., Tanaka, K., González-Mañas, J.M., Tsumoto, K. A PORE-FORMING TOXIN REQUIRES A SPECIFIC RESIDUE FOR ITS ACTIVITY IN MEMBRANES WITH PARTICULAR PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES. (2015) *J. Biol. Chem.*, 290, 10850-10861.
- Morante, K., Caaveiro, J.M., Viguera, A.R., Tsumoto, K., González-Mañas, J.M. FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF VAL60, A KEY RESIDUE INVOLVED IN THE MEMBRANE-OLIGOMERIZATION OF FRAGACEA-TOXIN C, AN ACTINOPORIN FROM ACTINIA FRAGACEA. (2015) *FEBS Lett.* 589, 1840-1846.
- Müller, P., Schiller, S., Wieprecht, T., Dathe, M., Herrmann, A. CONTINUOUS MEASUREMENT OF RAPID TRANSBILAYER MOVEMENT OF A PYRENE-LABELED PHOSPHOLIPID ANALOGUE. (2000) *Chem. Phys. Lipids* 106, 89-99.
- Nakaie, C.R., Goissis, G., Schreier, S. Paiva, A.C.M. pH-DEPENDENCE OF ELECTRON PARAMAGNETIC RESONANCE SPECTRA OF NITROXIDES CONTAINING IONIZABLE GROUPS. (1981) *Braz. J. Med. Biol. Res.* 14, 173-180.
- Nakaie, C.R., Schreier, S., Paiva, A.C.M. SYNTHESIS AND PROPERTIES OF SPIN-LABELED ANGIOTENSIN DERIVATIVES. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 742, 63-71.
- Ohnishi, S., McConnell, H.M. INTERACTION OF THE RADICAL ION OF CHLORPROMAZINE WITH DEOXYRIBONUCLEIC ACID. (1965) *J. Am. Chem. Soc.* 87, 2293.
- Paulino, J. ESTUDOS CONFORMACIONAIS DE PEPTÍDEOS CORRESPONDENTES À REGIÃO N-TERMINAL DAS TOXINAS PROTEÍCAS ESTICOLISINAS I E II. (2010) *Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas, Instituto de Química-USP, São Paulo.*
- 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, M.E., Lissi, E. STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF A RECOMBINANT STICHOLYSIN I (rSt I) FROM THE SEA ANEMONE *Stichodactyla helianthus*. (2006) *Toxicon* 48, 1083-94.
- Pertinhez, T.A., Nakaie, C.R., Carvalho, R.S., Paiva, A.C., Tabak, M., Toma, F., Schreier, S. CONFORMATIONAL CHANGES UPON BINDING OF A RECEPTOR LOOP TO LIPID STRUCTURES: POSSIBLE ROLE IN SIGNAL TRANSDUCTION. (1995) *FEBS Lett.* 375, 239-242.

- Pertinhez, T.A., Nakaie, C.R., Paiva, A.C., Schreier, S. SPIN-LABELED EXTRACELLULAR LOOP FROM A SEVEN-TRANSMEMBRANE HELIX RECEPTOR: STUDIES IN SOLUTION AND INTERACTION WITH MODEL MEMBRANES. (1997) *Biopolymers* 42, 821-829.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E. UCSF CHIMERA - A VISUALIZATION SYSTEM FOR EXPLORATORY RESEARCH AND ANALYSIS. (2004) *J. Comput Chem.* 25, 1605-1612.
- Raghuraman, H., Shrivastava, S., Chattopadhyay, A. MONITORING THE LOOPING UP OF ACYL CHAIN LABELED NBD LIPIDS IN MEMBRANES IN FUNCTION OF MEMBRANES PHASE STATE. (2007) *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 1258-67.
- Rassat, A., Rey, P. NITROXIDES XXII PREPARATION OF AMINO ACID FREE RADICALS AND THEIR COMPLEX SALTS. (1967) *Bull. Soc. Chim. France*, 3, 815-817.
- Reed, J., Reed, T.A. A SET OF CONSTRUCTED TYPE SPECTRA FOR THE PRACTICAL ESTIMATION OF PEPTIDE SECONDARY STRUCTURE FROM CIRCULAR DICHROISM. (1997) *Anal Biochem.* 254, 36-40.
- Reid, A., McCaffrey, J., Karim, C., Svensson, B. TOAC SPIN LABEL CONFORMATION RESOLVED BY MD SIMULATION OF MEMBRANE-BOUND PHOSPHOLAMBAN. (2015) *Biophys. J.* 108, 131A.
- Rojko, N., Kristan, K.Č., Viero, G., Žerovnik, E., Maček, P., Dalla Serra, M., Anderluh, G. MEMBRANE DAMAGE BY AN A-HELICAL PORE-FORMING PROTEIN, EQUINATOXIN II, PROCEEDS THROUGH A SUCCESSION OF ORDERED STEPS. (2013) *J. Biol. Chem.*, 288, 23704-23715.
- Rojko, N., Dalla Serra, M., Maček, P., Anderluh, G. PORE FORMATION BY ACTINOPORINS, CYTOLYSINS FROM SEA ANEMONES. (2015) *Biochim Biophys Acta*, pii: S0005-2736(15)00292-8.
- Ros, U., Pedrera, L., Diaz, D., Karam, J.C., Sudbrack, T.P., Valiente, P.A., Martínez, D., Cilli, E.M., Pazos, F., Itri, R., Lanio, M.E., Schreier, S., Álvarez, C. THE MEMBRANOTROPIC ACTIVITY OF N-TERMINAL PEPTIDES FROM THE PORE-FORMING PROTEINS STICHOLYSIN I AND II IS MODULATED BY HYDROPHOBIC AND ELECTROSTATIC INTERACTIONS AS WELL AS LIPID COMPOSITION. (2011) *J. Biosci.* 36, 781-91.
- Ros, U., Souto, A.L., Oliveira, F.J., Crusca Jr., E., Pazos, F., Cilli, E.M., Lanio, M.E., Schreier, S., Alvarez, C. FUNCTIONAL AND TOPOLOGICAL STUDIES WITH TRP-CONTAINING ANALOGS OF THE PEPTIDE StII1-30 DERIVED FROM THE N-TERMINUS OF THE PORE FORMING TOXIN STICHOLYSIN II: CONTRIBUTION TO UNDERSTAND ITS ORIENTATION IN THE MEMBRANE. (2013) *Biopolymers* 100, 334-346.
- Ros, U., Rodríguez-Vera, W., Pedrera, L., Valiente, P.A., Cabezas, S., Lanio, M.E., García-Sáez, A.J., Alvarez, C. DIFFERENCES IN ACTIVITY OF ACTINOPORINS ARE RELATED WITH THE HYDROPHOBICITY OF THEIR N-TERMINUS. (2015) *Biochimie.* 116, 70-78.

- Rouser, G., Fleicher, S. Yamamoto, A. TWO DIMENSIONAL THEN LAYER CHROMATOGRAPHIC SEPARATION OF POLAR LIPIDS AND DETERMINATION OF PHOSPHOLIPIDS BY PHOSPHORUS ANALYSIS OF SPOTS. (1970) *Lipids* 5, 494-496.
- Sahu, I.D., Hustedt, E.J., Ghimire, H., Inbaraj, J.J., McCarrick, R.M., Lorigan, G.A. CW DIPOLAR BROADENING EPR SPECTROSCOPY AND MECHANICALLY ALIGNED BILAYERS USED TO MEASURE DISTANCE AND RELATIVE ORIENTATION BETWEEN TWO TOAC SPIN LABELS ON AN ANTIMICROBIAL PEPTIDE. (2014) *J. Magn. Reson.* 249C, 72-79.
- Salay, L.C., Procopio, J., Oliveira, E., Nakaie, C.R., Schreier, S. ION CHANNEL-LIKE ACTIVITY OF THE ANTIMICROBIAL PEPTIDE TRITRPTICIN IN PLANAR LIPID BILAYERS. (2004) *FEBS Lett.* 565, 171-175.
- 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 EXTRACELLULAR LOOP OF THE ANGIOTENSIN II AT(1A) RECEPTOR. (2002) *Biopolymers* 65, 21-31.
- Schreier, S., Polnaszek, C.F., Smith, I.C.P. SPIN LABELS IN MEMBRANES. PROBLEMS IN PRACTICE. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 515, 395-436.
- Schreier, S. ESTUDOS ESTRUTURAIS E DINÂMICOS DE MEMBRANAS PELO MÉTODO DO MARCADOR DE SPIN. (1979) Tese de Livre Docência, Instituto de Química-USP, São Paulo.
- Schreier, S., Shida, C.S., Salinas, R.K., Grijalba, M.T., Pertinhez, T.A., Oliveira, E., Paiva, A.C., and Nakaie, C.R. ORIENTATION OF GPCR FRAGMENTS (LOOPS AND TRANSMEMBRANE HELICES) IN LIPID MEMBRANES. (2002) In *PEPTIDES 2002* (Benedetti, E. and Pedone, C., Eds.) EdizioniZino, Napoli, Italy, pp. 884-885.
- Schreier, S., Barbosa, S.R., Casallanovo, F., Vieira, R.F., Cilli, E.M., Paiva, A.C., Nakaie, C.R. CONFORMATIONAL BASIS FOR THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF TOAC-LABELED ANGIOTENSIN II AND BRADYKININ: ELECTRON PARAMAGNETIC RESONANCE, CIRCULAR DICHROISM, AND FLUORESCENCE STUDIES. (2004) *Biopolymers* 74, 389-402.
- Schreier, S., Bozelli, J.C. Jr., Marín, N., Vieira, R.F., Nakaie C.R. THE SPIN LABEL AMINO ACID TOAC AND ITS USES IN STUDIES OF PEPTIDES: CHEMICAL, PHYSICO-CHEMICAL, SPECTROSCOPIC AND CONFORMATIONAL ASPECTS. (2012) *Biophys. Rev.* 4, 45-66.
- Seelig, J. SPIN LABEL STUDIES OF ORIENTED SMECTIC LIQUID CRYSTALS (A MODEL SYSTEM FOR BILAYER MEMBRANES). (1970) *J. Am. Chem. Soc.* 92, 3881-3887.
- Shen, Y., Maupetit, J., Derremaux, P., Tufféry, P. IMPROVED PEP-FOLD APPROACH FOR PEPTIDE AND MINIPROTEIN STRUCTURE PREDICTION (2014) *J. Chem. Theory Comput.* 10, 4745-4758.
- Shinagawa, K. Ohya,M., Higashijima, T., Wakamatsu, K. CIRCULAR DICHROISM STUDIES OF THE INTERACTION BETWEEN SYNTHETIC PEPTIDES

- CORRESPONDING TO INTRACELLULAR LOOPS OF BETA-ADRENERGIC RECEPTORS AND PHOSPHOLIPID VESICLES. (1994) *J. Biochem.* 115 463-468.
- Smythe, M.L., Nakaie, C.R., Marshall, G.R. α -HELICAL VERSUS 3_{10} -HELICAL CONFORMATION OF ALANINE-BASED PEPTIDES IN AQUEOUS SOLUTION: AN ELECTRON SPINRESONANCE INVESTIGATION. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* 117, 10555–10562.
- Spisni, A., Franzoni, L., Sartor, G., Nakaie, C.R., Carvalho, R.S., Paiva, A.C., Salinas, R.K., Pertinhez, T.A., Schreier, S. NMR, CD AND MOLECULAR MODELING STUDIES ON THE SOLUTION CONFORMATION OF A MODIFIED FRAGMENT OF THE FIRST EXTRA-CELLULAR LOOP OF ANGIOTENSIN II AT₁ RECEPTOR. (1996) *Bull. Magn. Res.* 17, 151-153.
- Stewart, J. M., Young, J. D. SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS. (1984) Pierce Chemical Co., Rockford.
- Tanaka, K., Caaveiro, J.M., Morante, K., González-Mañas, J.M., Tsumoto, K. STRUCTURAL BASIS FOR SELF-ASSEMBLY OF A CYTOLYTIC PORE LINED BY PROTEIN AND LIPID. (2015) *Nat Commun.* 6:6337.
- Tejuca, M., Dalla Serra, M., Ferreras, M., Lanio, M.E., Menestrina, G. MECHANISM OF MEMBRANE PERMEABILIZATION BY STICHOLYSIN I, A CYTOLYSIN ISOLATED FROM THE VENOM OF THE SEA ANEMONE *STICHODACTYLA HELIANTHUS*. (1996) *Biochemistry* 35, 14947-14957.
- Tejuca, M., Anderluh, G., Macek, P., Alvarez, C., Lanio, M.E., Marcet, R., Torres, D., Sarracent, J., Dalla Serra, M., Menestrina, G. ANTIPARASITE ACTIVITY OF SEA ANEMONE CYTOLYSINS ON GIARDIA DUODENALIS AND SPECIFIC TARGETING WITH ANTI-GIARDIA ANTIBODIES. (1999) *Intl. J. of Parasitology* 29, 489–498.
- Tejuca, M., Dalla Serra, M., Potrich, C., Álvarez, 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* (2001) *J. Membr. Biol.* 183 125–135.
- Tejuca, M., Diaz, I., Figueredo, R., Roque, L., Pazos, F., Martinez, D., Iznaga-Escobar, N., Perez, R., Alvarez, C., Lanio, M.E. CONSTRUCTION OF AN IMMUNOTOXIN WITH THE PORE FORMING PROTEIN STI AND IOR C5, A MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST A COLON CANCER CELL LINE. (2004) *Intl. Immunopharmacology* 4, 731–744.
- Tejuca, M., Anderluh, G., Dalla-Serra, M. SEA ANEMONE CYTOLYSINS AS TOXIC COMPONENTS OF IMMUNOTOXINS. (2009) *Toxicon*, 54, 1206-1214.
- Toniolo, C., Crisma, M., Formaggio, F. TOAC, A NITROXIDE SPIN-LABELED, ACHIRAL CA-TETRASUBSTITUTED α -AMINO ACID, IS AN EXCELLENT TOOL IN MATERIAL SCIENCE AND BIOCHEMISTRY. (1998) *Biopolymers* 47, 153–158.
- Valeur, B. MOLECULAR FLUORESCENCE PRINCIPLES AND APPLICATIONS. (2001) Wiley-VCH, Weinheim, BW.

- Valle, A., López-Castilla, A., Pedrera, L., Martínez, D., Tejuca, M., Campos, J., Fando, R., Lissi, E., Álvarez, C., Lanioa, M.E., Pazos, F., Schreier, S. CYS MUTANTS IN FUNCTIONAL REGIONS OF STICHOLYSIN I CLARIFY THE PARTICIPATION OF THESE RESIDUES IN PORE FORMATION. (2011) *Toxicon* 58, 8-17.
- Vieira, R.F.F., Casallanovo, F., Cilli, E.M., Paiva, A.C.M., Schreier, S., Nakaie, C.R. CONFORMATIONAL STUDIES OF TOAC-LABELED BRADYKININ ANALOGUES IN MODEL MEMBRANES. (2002) *Lett. Pept. Sci.* 9, 83–89.
- Vieira, R.F.F., Casallanovo, F., Marín, N., Paiva, A.C., Schreier, S., Nakaie, C.R. CONFORMATIONAL PROPERTIES OF ANGIOTENSIN II AND ITS ACTIVE AND INACTIVE TOAC-LABELED ANALOGS IN THE PRESENCE OF MICELLES. ELECTRON PARAMAGNETIC RESONANCE, FLUORESCENCE, AND CIRCULAR DICHROISM STUDIES. (2009) *Biopolymers* 92, 525–537.
- Virtanen, J.A., Cheng, K.H., Somerharjus, P. PHOSPHOLIPID COMPOSITION OF THE MAMMALIAN RED CELL MEMBRANE CAN BE RATIONALIZED BY A SUPERLATTICE MODEL. (1998) *PNAS* 95, 4964-4969.
- Voet, D., Voet, G. *BIOCHEMISTRY* 3rd ED. (2004) John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ.
- Yamaji-Hasegawa, A., Hullin-Matsuda, F., Greimel, P., Kobayashi, T. PORE-FORMING TOXINS: PROPERTIES, DIVERSITY, AND USES AS TOOLS TO IMAGE SPHINGOMYELIN AND CERAMIDE PHOSPHOETHANOLAMINE. (2015) *Biochim Biophys Acta.*, pii: S0005-2736(15)00344-2.
- Yeagle, P.L., Albert, A.D. G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR STRUCTURE. (2007) *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 808-824.
- Wertz, J., Bolton, J.R. *ELECTRON SPIN RESONANCE. ELEMENTARY THEORY AND PRACTICAL APPLICATIONS.* (1972) McGraw-Hill Book Company, New York.
- Wiegand, I., Hilpert, K., Hancock, R.E. AGAR AND BROTH DILUTION METHODS TO DETERMINE THE MINIMAL INHIBITORY CONCENTRATION (MIC) OF ANTIMICROBIAL SUBSTANCES. (2008) *Nat Protoc.* 2, 163-75.
- Woody, R.W. THEORY OF CIRCULAR DICHROISM OF PROTEINS. (1996) IN *CIRCULAR DICHROISM AND THE CONFORMATIONAL ANALYSIS OF BIOMOLECULES.* (Fasman, G.D., Ed.), Plenum Press, 25-67.

SÚMULA CURRICULAR

1. Dados pessoais

Gustavo Penteado Battesini Carretero

Local e data de nascimento: São Paulo – SP – Brasil – 11/09/1985

2. Formação acadêmica

Março 2010 – Atualmente

Aluno de doutorado em Bioquímica
Instituto de Química, Universidade de São Paulo
Título: Estudos biofísicos e de atividade de peptídeos correspondentes ao N-terminal das toxinas Esticolisinas I e II – contribuição para a elucidação do mecanismo de ação.
Orientadora: Shirley Schreier
Bolsista CNPq (141449-2010/1)

Outubro 2013 – Outubro 2014

Estágio de pesquisa no exterior
Departamento de Ciências, Sistemas e Modelos
Roskilde Universitet
Título: Síntese de peptídeos correspondentes ao N-terminal de esticolisinas I e II e estudos de atividade dos peptídeos em sistemas modelo e biológicos.
Orientador: Håvard Jenssen
Bolsista CAPES/CsF (2035-13-8)

Fevereiro 2005 –
Dezembro 2009

Bacharelado em Química
Instituto de Química, Universidade de São Paulo
Título: Estudos conformacionais de peptídeos correspondentes à região N-terminal das citolisinas Esticolisinas I e II em Solução e em presença de membranas modelo.
Orientador: Shirley Schreier
Bolsista FAPESP (2007/59741-9)

3. Áreas de especialização

1. Biofísica
2. Bioquímica
3. Química de biomoléculas

4. Publicações

- 1 – Paschoal, J.F., Yamaguchi, J., Miranda, J.R., Carretero, G., Melo, R.L., Santos, R.A., Xavier, C.H., Schreier, S., Camargo, A.C., Ianzer, D. INSIGHTS INTO CARDIOVASCULAR EFFECTS OF PROLINE-RICH OLIGOPEPTIDE (BJ-PRO-10C) REVEALED BY STRUCTURE-ACTIVITY ANALYSES: DISSOCIATION OF ANTIHYPERTENSIVE AND BRADYCARDIC EFFECTS. (2014) *Amino acids* 46, 401-413.
- 2 – Mojsoska, B., Carretero, G., Mateiu, R.V., Jenssen, H. DISSECTING THE MECHANISM OF ACTION OF CATIONIC PEPTOIDS AGAINST GRAM-NEGATIVE E. COLI. (2016) Submetido para *Infectious Diseases* (ACS).

5. Experiência didática

Fevereiro 2012 – Julho 2012	<p>Monitoria Disciplina: Tecnologia do DNA Recombinante Instituto de Química, Universidade de São Paulo Supervisora: Daniela Basseres Programa de aperfeiçoamento de ensino.</p>
Fevereiro 2009 – Julho 2009	<p>Monitoria Disciplina: Tecnologia do DNA Recombinante Instituto de Química, Universidade de São Paulo Supervisora: Bettina Malnic Programa de monitoria para alunos de graduação</p>
Fevereiro 2008 – Julho 2008	<p>Monitoria Disciplina: Tecnologia do DNA Recombinante Instituto de Química, Universidade de São Paulo Supervisora: Bettina Malnic Programa de monitoria para alunos de graduação</p>

6. Idiomas

1. Português: língua nativa
2. Inglês: fluente
3. Espanhol: básico