



# Estudo computacional da estabilidade da estrutura secundária de peptídeos em misturas de solventes

Palavras-Chave: BIOFÍSICA, DINÂMICA MOLECULAR, PEPTÍDEOS.

Autores:

LUCAS VERONA DE ARAUJO, IQ – UNICAMP

Prof. Dr. LEANDRO MARTÍNEZ (orientador), IQ – UNICAMP

## INTRODUÇÃO:

A estrutura de proteínas e seus mecanismos de enovelamento dependem do ambiente molecular e são sensíveis a pequenas variações de temperatura, pressão e presença de moléculas orgânicas, conhecidas como cossolventes [1]. O TMAO e a ureia são dois cossolventes cujos efeitos sobre a estabilidade das estruturas das proteínas são bastante conhecidos, mas os mecanismos moleculares subjacentes ainda não são completamente compreendidos [2-4]. Neste projeto, estão sendo utilizadas simulações de dinâmica molecular com técnicas de amostragem ampliada para estudar o enovelamento de peptídeos com diferentes elementos de estruturas secundárias (alfa-hélices e folhas-beta) em soluções aquosas com cossolventes. Os efeitos dos solventes serão analisados utilizando as funções de distribuição de mínima-distância (MDDF) [5] e a teoria de Kirkwood-Buff [6], buscando comparar os resultados obtidos com os parâmetros experimentais e obter uma visão molecular detalhada acerca dos efeitos de cada cossolvente.

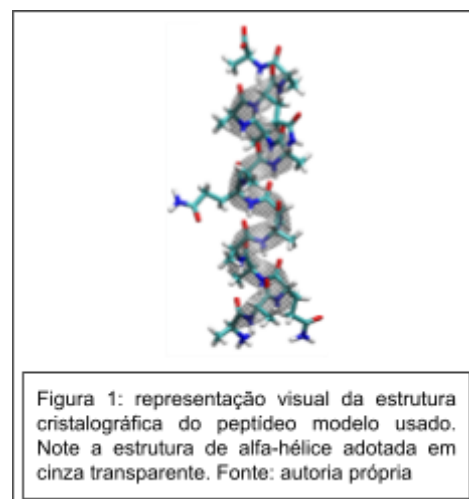
## METODOLOGIA:

### Simulações de dinâmica molecular

No projeto, foram usadas simulações de dinâmica molecular com amostragem ampliada, mais especificamente, com troca de réplicas de Hamiltoniano (H-REMD) [7] de soluções aquosas contendo um peptídeo que adota a estrutura secundária de alfa-hélice, como visto na figura 1.

Tal modelo foi empregado por conter dados experimentais que puderam ser utilizados para comparação com os resultados das simulações [8]. Ao todo, seis simulações foram realizadas: TMAO em três concentrações: 0,5mol/L, 1,0mol/L, 1,5mol/L, com o peptídeo e água, e ureia nas mesmas três concentrações anteriores, com o peptídeo e água; todas com temperatura da réplica original a 300K e uma caixa cúbica de 70Å. Além disso, utilizou-se uma simulação do peptídeo em água pura em uma caixa cúbica de 56Å a 300K de trabalhos anteriores do grupo para uma análise preliminar dos resultados [9].

A técnica de H-REMD foi escolhida pois, em relação às simulações convencionais, possui uma melhor amostragem da dinâmica da espécie estudada, no caso, das estruturas do peptídeo na solução ao longo da trajetória [8,10]. Dessa forma, o



conteúdo de estrutura secundária do soluto no sistema pode ser mais compatível com os resultados experimentais.

#### Recursos computacionais e as funções de distribuição de mínima-distância

As posições iniciais dos átomos foram obtidas pelo programa Packmol [11]. Utilizando as integrais de Kirkwood-Buff [6], computadas a partir das funções de distribuição de mínima-distância (MDDFs) [5], ambas calculadas usando o pacote ComplexMixtures.jl [12], obtivemos os parâmetros de solvatação preferencial dos cossolventes com os peptídeos [5]. O espectro de dicroísmo circular para cada simulação foi obtido pelo programa SESCA [13] usando a base de cálculo HBSS-3SC1 e o conteúdo de alfa-hélice usando o pacote ProteinSecondaryStructures.jl empregando o método de cálculo DSSP [14].

A partir das funções de distribuição de mínima-distância ( $g_{md}(r)$ ), pode-se obter a variação da densidade do solvente ou cossolvente a uma distância “r” do soluto. A variação é dada pela razão entre a densidade de distâncias mínimas dos átomos de uma das espécies citadas ( $n(r)$ ) na posição “r” e a densidade de distâncias mínimas dos mesmos átomos, da mesma espécie estudada, na mesma posição, mas agora sem haver interações soluto-espécie ( $n^*(r)$ ), como descrito na equação (1). Com isso, é possível compreender as interações estabelecidas entre cossolventes e o soluto, caracterizando a estrutura de solvatação dos peptídeos pelos cossolventes [5].

$$g_{md}(r) = \frac{n(r)}{n^*(r)} \quad (1)$$

#### Análise dos resultados

Inicialmente, para comparar os resultados das simulações com os dados experimentais, obtiveram-se os espectros de dicroísmo circular (CD) do peptídeo em cada sistema e o conteúdo de alfa-hélice média do peptídeo e de cada resíduo ao longo da trajetória. O espectro mede a absorvidade da luz circularmente polarizada (expresso neste trabalho pela elipticidade molar da proteína,  $\theta$ ) em função do comprimento de onda da radiação incidente sobre a amostra [15]. O gráfico obtido junto aos valores de conteúdo pode ser usado para confirmar o fenômeno de estabilização ou desestabilização da estrutura do peptídeo, bem como a coerência entre os resultados da simulação com os experimentais.

Após isso, as trajetórias provenientes da dinâmica molecular foram utilizadas para o cálculo das funções de distribuição de distância-mínima (MDDFs) e das integrais de Kirkwood-Buff (KBIs). Quando as duas são analisadas em conjunto, tem-se uma melhor compreensão molecular da acumulação ou exclusão do solvente ou cossolvente ao redor do soluto. Com ela, calcularam-se os parâmetros de interação preferencial ( $\Gamma$ ) de cada simulação que medem a variação no número de moléculas de solvente ou cossolvente na mudança da concentração da proteína dentro do domínio do soluto, ou seja, a região no espaço onde as interações entre ele e as demais espécies do sistema não são desprezíveis [5]. Em particular, para o cossolvente ( $\Gamma_{uc}$ ), os parâmetros podem ser estimados pela equação (2):

$$\Gamma_{uc} \approx \rho_c \times [G_{uc}(R) - G_{uw}(R)] \quad (2)$$

onde  $\rho_c$  é a densidade do cossolvente no “bulk” da solução, ou seja, onde as interações entre soluto e cossolvente são desprezíveis,  $G_{uc}(R)$  e  $G_{uw}(R)$  são as integrais de Kirkwood-Buff para o solvente e água, respectivamente.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os espectros de CD com os valores de conteúdo de alfa-hélice médio no peptídeo (em porcentagem) para cada simulação podem ser vistos na figura 2:

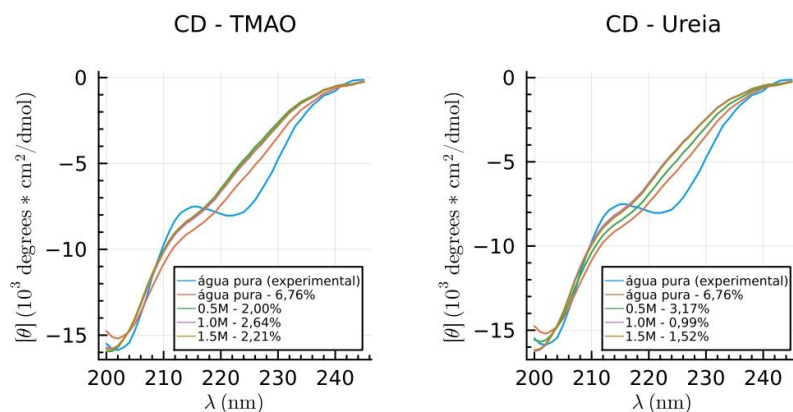


Figura 2: espectros de dicroísmo circular obtidos com o programa SESA [13] para sistemas com água pura, TMAO e ureia e o conteúdo médio de hélice. A curva experimental foi obtida a uma temperatura de 30°C (temperatura mais próxima a dos sistemas simulados) [8].

Apesar dos espectros calculados não se ajustarem perfeitamente ao resultado experimental, é notório o aumento de  $\theta$  com o aumento da concentração do cossolvente para a ureia em 222nm [16]. Com isso, pode-se ter ao menos uma análise qualitativa do efeito da desnaturação da hélice pela presença de ureia que se confirma pela diminuição do conteúdo de estrutura secundária calculado, como visto na figura 2. Já para o TMAO, a desnaturação da estrutura secundária, vista na figura 2, contradiz resultados de trabalhos com outros cossolventes estabilizadores [8, 9, 16] e a proximidade das curvas obtidas levam a duas interpretações: (1) no tempo de simulação, a propriedade analisada não convergiu para o valor médio esperado ou (2) os parâmetros envolvidos na construção da trajetória não conseguem reproduzir bem a propriedade da maneira esperada. Isso também pode ser observado entre as simulações de 1,0M e 1,5M de ureia que aparentam representar conteúdos de hélice similares, como evidenciado pelas porcentagens na figura, enquanto espera-se que o conteúdo aumente com o aumento da concentração do estabilizante.

As MDDFs e KBIs dos cossolventes (ureia ou TMAO) podem ser vistas na figura 3. Os parâmetros de solvatação preferencial dos cossolventes estão apresentados na tabela 1 :

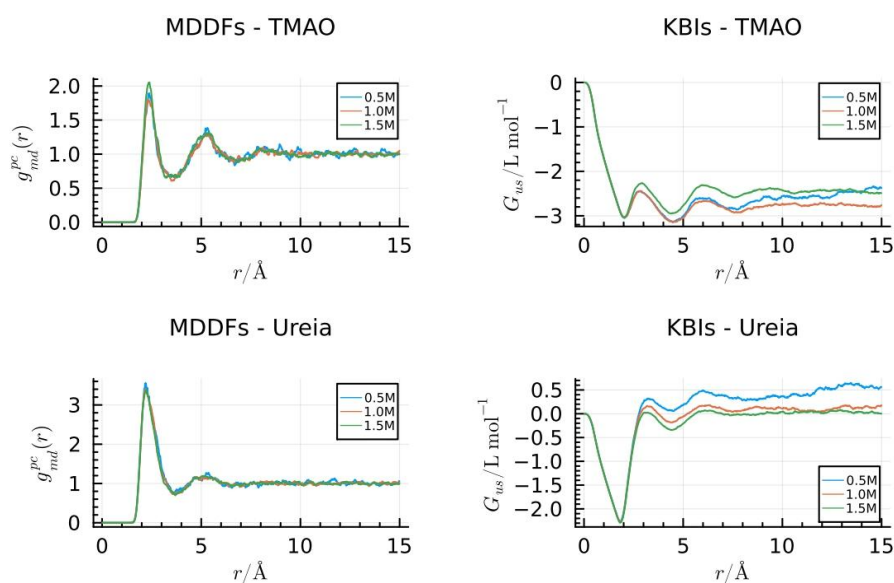


Figura 3: MDDFs e KBIs obtidas para cada sistema usando o pacote ComplexMixtures.jl [12].

concentração (mol/L)	0,5mol/L	1,0mol/L	1,5mol/L
$\Gamma_{\text{TM-ÁGUA}}$	-0,79436	-2,0502	-2,7628
$\Gamma_{\text{UR-ÁGUA}}$	0,73122	1,0850	1,4332

Tabela 1: parâmetros de solvatação preferencial de cada simulação entre TMAO e solvente (TM-ÁGUA) e ureia e solvente (UR-ÁGUA) computados a partir dos valores das integrais da figura 3 na distância máxima do domínio proteico (15Å).

As MDDFs tanto para o TMAO quanto para a ureia, mostram que a uma distância mínima do peptídeo de aproximadamente 2,8Å existe um aumento na densidade de moléculas dos cossolventes. Nota-se, ainda, que os picos dessa primeira camada de solvatação para os sistemas com ureia são maiores que no caso do TMAO, indicando que o primeiro cossolvente tem maior afinidade por interagir com a proteína que o segundo, fato reforçado pelas KBIs correspondentes. Para o TMAO, todas as integrais convergem para valores negativos, indicando que o volume que as suas moléculas ocupam no domínio é menor que no caso da ausência do soluto na mistura. Porém, o efeito da variação da concentração do cossolvente não é claro uma vez que a convergência da integral para a concentração de 0,5M não foi adequada (a curva aumenta progressivamente com o aumento da distância).

Já para a ureia, dentro do domínio proteico (aqui considerado até uma distância mínima de 15Å), o volume que suas moléculas ocupam para a concentração de 0,5M é maior que no caso da ausência do soluto na mistura (a integral converge para valores positivos) e, para as demais concentrações, compensa o volume de exclusão do peptídeo (valores convergem para zero) [1,5].

Por fim, pela análise dos parâmetros de solvatação preferencial, para misturas com aumento na concentração de TMAO, os valores progressivamente mais negativos indicam que o soluto exclui cada vez mais o estabilizante do domínio, sendo, portanto, preferencialmente hidratado. Com relação às misturas com ureia, o inverso acontece, ou seja, ureia se acumula cada vez mais no domínio e solvata preferencialmente o peptídeo. Qualitativamente, os parâmetros refletem o resultado esperado de solvatação de estabilizantes e desestabilizantes de proteínas [1].

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS:

Até o presente momento, foi possível observar que as simulações reproduziram, da forma esperada, aspectos da solvatação dos cossolventes para cada sistema. Com isso, pôde-se observar uma primeira camada de solvatação em cada mistura que pode ser investigada a fim de estudar mais profundamente as interações entre o cossolvente e peptídeo. Além disso, foram capazes de amostrar o fenômeno de desnaturação da estrutura de alfa-hélice do peptídeo para os sistemas com ureia, porém, não reproduziram bem a estabilização da estrutura secundária para os sistemas com TMAO, nem mudanças esperadas com o aumento das concentrações dos cossolventes.

Com isso, pretende-se investigar o problema simulando, nas mesmas condições e empregando as mesmas técnicas, sistemas com concentrações ainda maiores dos cossolventes (por exemplo: 2,0M e 3,0M) e aumentando o tempo simulado de cada simulação já feita, estudando possíveis mudanças nos resultados de cada cálculo feito anteriormente.

Para as MDDFs já obtidas, serão feitas as suas decomposições nas contribuições atômicas dos cossolventes para estudar as interações que originam os picos observados.

Finalmente, serão propostas mudanças nos parâmetros que descrevem as interações entre os átomos de cada espécie das misturas (campos de força), avaliando os impactos dessas alterações nos novos resultados obtidos, evitando que suas melhorias levem a uma piora daqueles já considerados adequadamente reproduzidos.

## BIBLIOGRAFIA

1. Canchi DR, García AE. Cosolvent effects on protein stability. *Annu Rev Phys Chem.* 2013;64: 273–293.
2. Yancey PH, Somero GN. Counteraction of urea destabilization of protein structure by methylamine osmoregulatory compounds of elasmobranch fishes. *Biochem J.* 1979;183: 317–323.
3. Zou Q, Bennion BJ, Daggett V, Murphy KP. The molecular mechanism of stabilization of proteins by TMAO and its ability to counteract the effects of urea. *J Am Chem Soc.* 2002;124: 1192–1202.
4. Meersman F, Bowron D, Soper AK, Koch MHJ. Counteraction of urea by trimethylamine N-oxide is due to direct interaction. *Biophys J.* 2009;97: 2559–2566.
5. Martínez L, Shimizu S. Molecular Interpretation of Preferential Interactions in Protein Solvation: A Solvent-Shell Perspective by Means of Minimum-Distance Distribution Functions. *J Chem Theory Comput.* 2017;13: 6358–6372.
6. Kirkwood JG, Buff FP. The Statistical Mechanical Theory of Solutions. I. *J Chem Phys.* 1951;19: 774–777.
7. Meli M, Colombo G. A Hamiltonian replica exchange molecular dynamics (MD) method for the study of folding, based on the analysis of the stabilization determinants of proteins. *Int J Mol Sci.* 2013;14: 12157–12169.
8. Shalongo W, Dugad L, Stellwagen E. Distribution of Helicity within the Model Peptide Acetyl(AAQAA)3amide. 2002. doi:10.1021/ja00097a039
9. Trifluoroethanol direct interactions with protein backbones destabilize  $\alpha$ -helices. *J Mol Liq.* 2022;365: 120209.
10. Bernardi RC, Melo MCR, Schulten K. Enhanced sampling techniques in molecular dynamics simulations of biological systems. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1850: 872–877
11. Martínez L, Andrade R, Birgin EG, Martínez JM. PACKMOL: a package for building initial configurations for molecular dynamics simulations. *J Comput Chem.* 2009;30: 2157–2164.
12. Martínez L. ComplexMixtures.jl: Investigating the structure of solutions of complex-shaped molecules from a solvent-shell perspective. *J Mol Liq.* 2022;347: 117945.
13. Nagy G, Igaev M, Jones NC, Hoffmann SV, Grubmüller H. SESCA: Predicting Circular Dichroism Spectra from Protein Molecular Structures. *J Chem Theory Comput.* 2019.
14. Joosten RP, te Beek TAH, Krieger E, Hekkelman ML, Hooft RWW, Schneider R, et al. A series of PDB related databases for everyday needs. *Nucleic Acids Res.* 2010;39: D411–D419.
15. Chaves O. Estudo da interação entre Albuminas Séricas e moléculas biologicamente ativas. Tese de mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2016.
16. Celinski SA, Scholtz JM. Osmolyte effects on helix formation in peptides and the stability of coiled-coils. *Protein Sci.* 2002;11: 2048–2051.