

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

Ueiler Lisoski Duarte

Estudo computacional da agregação de polipeptídios AgB8/1, AgB8/2,
e AgB8/3.

Porto Alegre, 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

Ueiler Lisoski Duarte

Estudo computacional da agregação de polipeptídios AgB8/1, AgB8/2,
e AgB8/3.

Trabalho de conclusão de curso apresentado
junto à atividade de ensino “Trabalho de Conclusão
de Curso – QUI” do Curso de Química, como
requisito parcial para a obtenção do grau de
Bacharel em Química

Prof. Dr. Hubert Stassen
Orientador

Porto Alegre, 2011

Agradecimentos

* Agradeço a minha família e a futura mãe dos meus filhos Sílvia por todo amor e compreensão desses longos anos juntos.

* Agradeço também aos colegas e Professores da Química que contribuíram muito na minha formação.

* Agradeço aos meu tios que me acolheram em momentos decisivos e a família de minha esposa por terem me adotado com um verdadeiro filho.

SUMÁRIO

Agradecimentos	iv
SUMÁRIO	v
Lista de figuras.....	vi
Lista de tabelas.....	ix
RESUMO	x
ABSTRACT.....	xi
1. Introdução.....	1
1.1 Cisto Hidático	1
1.2 Echinococcus granulosus.....	2
1.3 AgB.....	3
2. Objetivos.....	5
3. Materiais e Fundamentação Teórica	6
3.1 Obtenção dos Polipeptídios AgB8/1, AgB8/2, AgB8/3.....	6
3.2 Dinâmica Molecular	6
3.3 “Coarse Graining” e o campos de Força MARTINI	9
3.4 Análises.....	12
3.5 Aminoácidos e Código FASTA	12
4. Protocolo de Simulação.....	16
5. Resultados e Discussões.....	18
5.1 Sistema AgB83.....	18
5.2 Sistema AgB82.....	21
5.3 Sistema AgB81.....	26
5.4 Sistema de Heteroligomeros	32
6. Conclusões	38
Referências.....	40

Lista de figuras

Figura 1: Ciclo da doença hidatidose.....	2
Figura 2: Echinococcus Granulosus	3
Figura 3: Energia em função da distância de ligação descrita pelo modelo da mecânica molecular em comparação com o comportamento real.	7
Figura 4: Representação do Aminoácidos em coarse-grained.	10
Figura 5: Estrutura básica de aminoácidos, as variações dos Radicais (R) dão origens a vários aminoácidos encontrados no seres vivos que originam as proteínas.....	12
Figura 6: Aminoácidos de cadeia Alifática.	13
Figura 7: Aminoácidos de cadeia Aromáticas e Alifáticas contendo Enxofre (S).....	13
Figura 8: Aminoácidos de cadeia laterais alifáticas hidroxiladas e cadeias laterais	14
Figura 9: Aminoácidos Ácidos e cadeias laterais derivadas de amidas.....	14
Figura 10: Código FASTA usado para montagem dos polipeptídios, o colorido identifica as partes N-iniciais e C-Iniciais dos polipeptídios para diferenciações posteriores.	15
Figura 11: Polipeptídios e seus aminoácidos componentes e o número de vezes que eles aparecem em cada polipeptídio.	15
Figura 12: O gráfico (A) Energia de Coulomb do sistema AgB83 entre polipeptídios, o gráfico (B) Energia de Coulomb do sistema AgB83 entre polipeptídios e águas do sistema, gráfico (C) Energia Lennard-Jones do sistemas AgB83 entre polipeptídios e o gráfico (D) Energia Lennard-Jones do Grupo AgB83 entre polipeptídios e águas do sistemas.	18
Figura 13: O gráfico (A) mostra aproximação de dois polipeptídios do sistema AgB83 são eles AgB83_1 e AgB83_7 e gráfico (B) mostra aproximação dos polipeptídios AgB83_6 e AgB83_8.	19
Figura 14: Mapa de contato, mostra locais aonde existe contato entre resíduos constituintes do polipeptídios do sistema AgB83. Os números verdes	

mostram a seqüência de análises feita para determinar os contatos entre resíduos do sistema AgB83.	20
Figura 15: O gráfico (A) Energia de Coulomb do sistema AgB82 entre polipeptídios, o gráfico (B) Energia de Coulomb do sistema AgB82 entre as polipeptídios e águas do sistema, gráfico (C) Energia Lennard-Jones do sistemas AgB82 entre polipeptídios e o gráfico (D) Energia Lennard-Jones do Grupo AgB83 entre polipeptídios e águas do sistemas.	22
Figura 16: O gráfico (A) mostra a distâncias entre AgB82_1 e AgB82_2, AgB82_5 e AgB82_6, o gráfico (B) mostra a distâncias entre o AgB82_2 e AgB82_5 e AgB82_6	22
Figura 17: O gráfico (C) mostra as distâncias entre AgB82_3 e AgB82_4 e AgB82_7, o gráfico (D) mostra as distâncias entre AgB82_4 e AgB82_8.	23
Figura 18: O gráfico (E) mostra as distâncias entre AgB82_5 e AgB82_6.	23
Figura 19: Mapa de contato, mostra locais aonde existe contato entre resíduos constituintes do polipeptídios do sistema AgB82. Os números verdes mostram a seqüência de análises feita para determinar os contatos entre resíduos do sistema AgB82.	24
Figura 20: O gráfico (A) Energia de Coulomb do sistema AgB81 entre polipeptídios, o gráfico (B) Energia de Coulomb do sistema AgB82 entre os polipeptídios e águas do sistema, O gráfico (C) Energia Lennard-Jones do sistema AgB81 entre polipeptídios e o gráfico (D) Energia Lennard-Jones do Grupo AgB81 entre polipeptídios e águas do sistema.	26
Figura 21: O gráfico (A) mostra distâncias entre os polipeptídios do sistema AgB81 e o polipeptídio AgB81_1, o gráfico (B) mostram as distâncias entre os polipeptídios do sistema AgB81 e o polipeptídio AgB81_2.	27
Figura 22: O gráfico (C) mostra distâncias entre os polipeptídios do sistema AgB81 e o polipeptídio AgB81_3, o gráfico (D) mostra a distâncias entre os polipeptídios do sistema AgB81 e o polipeptídio AgB81_4.	28
Figura 23: O gráfico (E) mostra distâncias entre os polipeptídios do sistema AgB81 e o polipeptídio AgB81_6, o gráfico (F) mostra a distâncias entre os polipeptídios do sistema AgB81 e o polipeptídio AgB81_7.	28
Figura 24: Mapa de contato mostra locais aonde existe contato entre resíduos constituintes dos polipeptídios do sistema AgB81. Os números mostram a	

seqüência de análises feita para determinar os contatos entre resíduos do sistema AgB81	29
Figura 25: O gráfico (A) mostra energias de Coulumbic associada a cada um dos sistemas dos sistema e o gráfico (B) mostra as energias de Coulumbic do sistema com a água.....	32
Figura 26: O Gráfico (C), Mostra as Energias de Leonard Jones de cada sistema do sistema e o gráfico (D) mostra a Energia de Lennard-Jones dos sistema com água.....	32
Figura 27: O gráfico (A) mostra a aproximação entre os polipeptídios AgB83_2 e AgB83_4 pertencentes ao mesmo sistema, o gráfico (B) mostra a aproximação dos polipeptídios AgB82_2 e AgB83_1 sendo esses de sistemas diferentes.	34
Figura 28: O gráfico (C) mostra a aproximação entre os polipeptídios AgB82_1 e AgB83_1 pertencentes aos sistemas AgB82 e AgB83, o gráfico (D) mostra a aproximação dos polipeptídios AgB82_1 e AgB82_2 sendo esses do mesmo sistema AgB82.....	34
Figura 29: O gráfico (E) mostra a aproximação entre polipeptídios AgB81_2 e AgB81_3 pertercentes ao mesmo sistema AgB81.....	35
Figura 30: Mapa de contato entre resíduos do sistema de Heteroligomeros..	36

Lista de tabelas

Tabela 1: Principais órgãos afetados pelo cisto nos hospedeiros intermediários.	1
Tabela 2: classificação do Echinococcus Granulosus	3
Tabela 3: Abreviaturas, Nomes e código FASTA dos aminoácidos.....	10
Tabela 4: Tamanho dos resíduos com CG e como ficam nas simulações atomísticas.....	16
Tabela 5: Dimensões das caixas e quantidades de estruturas componentes, diferenciando o sistema de Heteroligomeros por ter 4 componentes de cada sistema de polipeptídios.	17
Tabela 6: Patamares energéticos dos gráficos apresentados.	19
Tabela 7: Aminoácidos que interagem a partir do mapa de contato.....	21
Tabela 8: Patamares energéticos do sistema AgB82 apresentados nos gráficos da figura 15 (A, B, C e D).	22
Tabela 9: Mostra os resíduos que aparecem próximos a partir da análise do mapa de contato do sistema AgB82 e mostra a orientação no mapa de contato.	24
Tabela 10: Patamares energéticos do sistema AgB81.	26
Tabela 11: Mostra os resíduos que estão próximos a partir da análise do mapa de contato do sistema AgB81.	29
Tabela 12: Patamares energéticos do sistema de Heteroligomeros de todos os sistemas presentes.	33
Tabela 13: Encontro para o sistema Heteroligomeros e tempos de encontros... ..	35
Tabela 14: Resíduos mais próximos de acordo com o mapa de contato.....	36

RESUMO

Neste trabalho investigou-se a agregação de três subunidades do Antígeno B que é um polipeptídeo lipoproteico que é liberado no ciclo do parasita da doença conhecida como Hidatidose são elas: AgB8/1, AgB8/2, AgB8/3. O AgB interfere diretamente nas funções de sobrevivência hospedeiro-parasita e é produzido com frequência durante o ciclo da doença. Não se sabe detalhes da sua função e estruturação, mas observou-se experimentalmente uma tendência muito forte de agregação das suas subunidades. Nesse trabalho, desenvolve-se um protocolo computacional com o intuito de observar a agregação dos AgB8/1, AgB8/2, e AgB8/3 formando homo e hetero-oligômeros. A análise desses agregados fornece dados esclarecendo como esses polipeptídios interagem. A agregação das subunidades representa um processo que envolve tempos longos quando comparado com eixos temporais característicos na fase condensada de poucos picosegundos. Para prolongar o eixo temporal no tratamento computacional, aplica-se a simulação por dinâmica molecular em nível de “coarse-graining”.

Palavras Chave: Peptídeos, Dinâmica Molecular, AgB8/1, AgB8/2, AgB8/3, Cisto Hidático.

ABSTRACT

In this work we investigated the aggregation of three subunits of the Antigen B which is a lipoprotein that is released in the disease cycle of the parasite known as Hydatidosis. They are: AgB8 / 1, AgB8 / 2, AgB8 / 3. The AgB interferes directly in the functions of host-parasite survival and is often produced during the course of the disease. Its function and structure are unknown, but it has been observed experimentally a very strong tendency of aggregation between its subunits. In this work, we develop a computational protocol to observe the aggregation of AgB8 / 1, AgB8 / 2, and AgB8 / 3 forming homo- and hetero-oligomers. The analysis of these aggregates provides data clarifying how these polypeptides interact. The aggregation of subunits represents a process that involves long times compared with typical temporal axis in the condensed phase of a few picoseconds. To extend the time axis in the computational treatment, we applied in molecular dynamics simulation at the level of "coarse-graining".

Key Words: Peptides, Molecular Dynamics, AgB8 / 1, AgB8 / 2, AgB8 / 3, hydatid cyst.

1. Introdução

1.1 Cisto Hidático

A hidatidose é uma zoonose cujo agente etimológico é o helminto da classe Cestoda *Echinococcus Granulosus*. A infecção é formação do cisto e decorrente da ingestão dos ovos do parasita originados nos cachorros ou em raposas (hospedeiros principais) e o desenvolvimento ocorre nas vísceras do hospedeiro intermediário ovinos, bovinos e suínos e no homem. O ciclo da doença após ingestão dos ovos larvais está descrita na (figura1) e principais locais afetados estão na tabela1[1].

Tabela 1: Principais órgãos afetados pelo cisto nos hospedeiros intermediários.

Locais afetados pelos Cistos	
local	%
Figado	74,5
Pulmões	10,1
musculo e Tecidos conjuntivos	4,7
Baço	2,3
Rim	2,1
Cérebro	1,4

A infecção e a resistência da doença não estão bem definidas variando de diversas formas a possibilidade de adquirir a doença, como por exemplo, sexo, idade, forma imunológica, variam as possibilidades de contágio.

A doença tem casos registrados em todo mundo principalmente em continentes subdesenvolvidos como, por exemplo, Ásia, África, America do Sul e central, Mediterrâneo, na Europa, parte do leste Europeu e alguns focos no Reino Unido, Oceania entre outros locais considerados de media a baixa endemicidade.

A doença pode ser prevenida evitando contanto direto com animais contaminados, lavando bem as mãos caso ocorra algum contato com cachorros contaminados, evitando que cachorros se aproximem de matadouros ou se

alimentem de carne de ovinos ou bovinos contaminados, mas ainda assim a doença tem espalhado principalmente em países subdesenvolvidos aonde a fiscalização é frágil e mal feita. No Rio Grande do Sul a contaminação ocorre com maior freqüência na parte sul do estado, o ser humano ao ser contaminado dificilmente sofre efeitos imediatos dificultando a detecção[2]

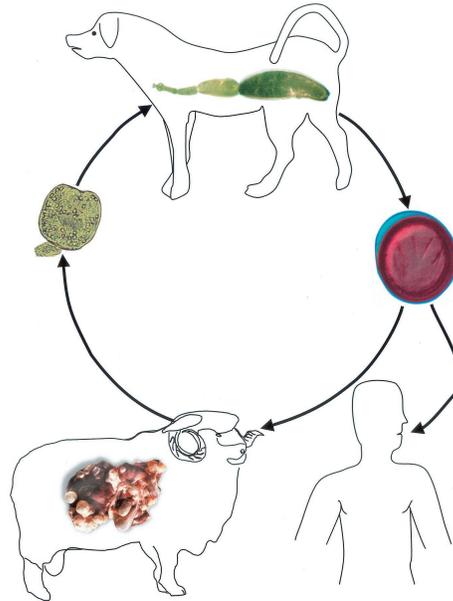


Figura 1: Ciclo da doença hidatidose.

1.2 *Echinococcus granulosus*

A equinococose é uma doença encontrada em canídeos, produzido pelo verme adulto (figura 2) *E. granulosus*, o verme é adquirido pelo cão ao ingerir vísceras contaminadas pelas hidátides. O tempo para atingir tamanho adulto pode variar entre 4 a 10 semanas e possui uma vida media de 20 meses. A tabela 2 mostra a classificação taxonômica do *Echinococcus Granulosus* e a figura 2 um platelminto adulto como deve se apresentar no organismo de cachorros ou raposas infectados.

Tabela 2: classificação do Echinococcus Granulosus

Echinococcus Granulosus	
Filo	Platyhelminthes
Classe	Cestoda
Familia	Taeniidae
Gênero	Echinococcus
Espécime	Echinococcus Granulosus

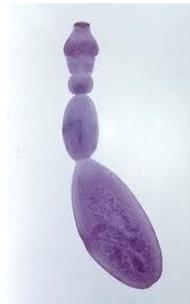


Figura 2: Echinococcus Granulosus

O tamanho comum do verme é entre 3-6 mm, possui cor esbranquiçada e é dividido entre cabeça ou escólex (Globoso), ventosas, dupla coluna de acúleos na porção anterior do escólex, colo ou pescoço curto e porção posterior formado por três ou quatro proglotes, sendo uma ou duas jovens imaturas e uma delas contendo ovos que podem ser expelidos.

A proglote grávida possui entre 500 a 800 ovos, estes ovos são veiculados nas fezes dos canídeos, porque o verme adulto tem como hábitat o intestino delgado desses animais.

Os ovos contaminam as pastagens e podem persistir por até 12 meses e por fim contaminar os hospedeiros intermediários[3].

1.3 AgB

Dentre as proteínas presentes no fluido do cisto hidático destaca-se pela sua abundância e imunogenicidade, o antígeno B (AgB) [4].

O AgB é uma lipoproteína polimérica com uma massa molecular que varia de 120-160 kDa. As subunidades multigênicas que compõem o Antígeno B possuem tamanhos aproximados de 8 kDa e se agregam formando múltiplos de 16Kda, 24Kda, 32Kda até atingirem o tamanho mencionado, foram até momento identificados cinco subunidades: AgB8/1, AgB8/2, AgB8/3, AgB8/4 e AgB8/5. Focamos principalmente nos primeiros três componentes identificados AgB8/1, AgB8/2, AgB8/3. Os estudos mais recentes comprovaram que os três polipeptídios que iremos focar no trabalho possuem alta capacidade de agregações constituindo longas cadeias[5].

O papel do AgB ainda não está bem esclarecido, mas sabe-se que assume papel chave na interação parasita-hospedeiro, este pressuposto é baseado nas seguintes comprovações observadas ao longo dos estudos da zoonose: efeito inibidor de proteases, capacidade imunomoduladora e ter ainda apresentando uma influência nas ligações dos lipídios do cisto e parasitas.[6]

Existe ainda outro antígeno igualmente importante chamado de IG5 ou caracterizado como IgA[7]. Este Antígeno foi encontrado na mesma época que o Antígeno B e caracterizado com mais detalhes em 2003[8].

2. Objetivos

O objetivo geral é comprovar que as agregações dos polipeptídios mencionados estão de acordo com os estudos realizados até momento.

Os objetivos específicos deste trabalho são: avaliar a agregação dos polipeptídios AgB8/1, AgB8/2, e AgB8/3 e procurar explicar como essas subunidades se relacionam.

Os nossos estudos tentarão esclarecer um pouco mais sobre a agregação das três subunidades citadas, permitindo talvez um melhor entendimento do mecanismo de formação dos Antígenos. Para isso usamos as simulações computacionais para realizar estes estudos.

3. Materiais e Fundamentação Teórica

3.1 Obtenção dos Polipeptídios AgB8/1, AgB8/2, AgB8/3

O ponto de partida de nosso estudo foram estruturas terciárias a partir de análises feitas pelo sistema ROSSETA[9]. Este sistema realiza por meio de uma análise por homologia a partir da seqüência primária de aminoácidos é obtém uma estrutura secundária e terciária para estes polipeptídios. A partir da obtenção desse conjunto de estruturas construímos uma topologia permitindo a simulação por “coarse-graining” ou CG[10].

O sistema pode ser acessado no sítio do programa pela internet e para uma melhor compreensão do sistema citamos um pedaço do site abaixo.

Citando o site:

“Um dos principais objetivos de Rosetta é predizer as formas em que as proteínas se enovelam na natureza. Proteínas são moléculas de polímeros lineares compostas de monômeros de aminoácidos e são freqüentemente chamadas de "cadeias." Aminoácidos podem ser considerados como os "elos" de uma "cadeia" de proteínas. Aqui está uma analogia simples com uma corrente de metal: ela pode ter muitas formas diferentes, dependendo das forças exercidas sobre ela. Por exemplo, se você puxar suas extremidades, a cadeia irá estender-se formando uma linha reta. E se você a deixar cair no chão, ela assumirá uma forma única a cada vez que for jogada. Ao contrário das correntes de metal, que são feitas de elos idênticos, as proteínas são formadas por 20 aminoácidos diferentes que possuem, cada um, propriedades únicas (diferentes formas, e forças atrativas e repulsivas, por exemplo), e combinados, os aminoácidos exercem forças sobre a cadeia para que assuma uma forma específica, que chamamos de "dobramento." A ordem em que os aminoácidos estão interligados determina o dobramento da proteína. Há muitos tipos de proteínas, que variam no número e ordem de seus aminoácidos.

Ao predizer a forma que uma determinada proteína adota na natureza, o que realmente estamos tentando fazer é encontrar o dobramento com menor energia. A energia é determinada por um número de fatores. Por exemplo, alguns aminoácidos são atraídos um ao outro de forma que, quanto estão próximos no espaço, a sua interação proporciona uma contribuição favorável à energia...”

3.2 Dinâmica Molecular

Na Mecânica Molecular as moléculas são descritas como um conjunto de átomos conectados, diferentemente que na Mecânica Quântica aonde são considerando elétrons e núcleos.

Como na literatura temos dados experimentais que comprovam os diversos parâmetros que são considerados como os “ideais” para o comportamento dos átomos o que se faz em Mecânica Molecular é utilizar campos de força, que são representados por um conjunto de funções de energia. [11].

Existem diversos campos de força atualmente em uso como, por exemplo: MM2[12], AMBER[13] entre outros que possuem diversas equações de energia para descrever os sistemas.

Um exemplo de função do campo de força é o termo V que é a energia para o estiramento de ligações químicas; na região de mínimo de energia uma equação quadrática como a abaixo descreve bem a energia do sistema (equação 1);

$$V = \sum k_b (r - r_0)^2 \quad (1)$$

onde k_b é a constante de força associada a uma “mola” que representa a ligação química entre dois átomos e r_0 é a distância padrão para essa ligação química enquanto que r é o afastamento da distância padrão considerada. O somatório inclui todos os pares de átomos quimicamente ligados do sistema molecular. A figura 3 demonstra a energia em função da distância de ligação descrita pelo modelo da mecânica molecular em comparação com comportamento real.

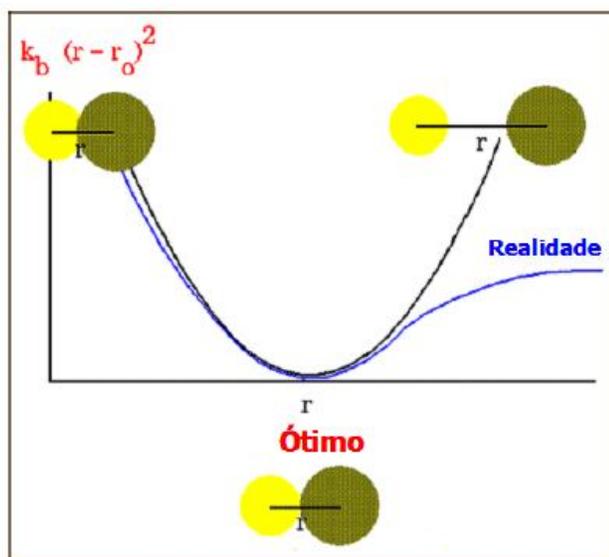


Figura 3: Energia em função da distância de ligação descrita pelo modelo da mecânica molecular em comparação com o comportamento real.

A Dinâmica Molecular resolve as equações de movimento ao longo de tempo das moléculas que permite então o estudo de fenômenos que dependem do tempo como difusão, o dobramento de cadeias moleculares, a distribuição de moléculas de solventes ao redor de moléculas entre outros.

Em Dinâmica Molecular as moléculas que tem energias cinéticas elevadas podem superar as barreiras de energia potencial e com isso literalmente buscarem novas conformações para o sistema.

Os cálculos usados na Dinâmica Molecular baseiam na resolução da equação de Newton para cada átomo i do sistema (Equação 2);

$$F_i = m_i a_i \quad (2)$$

onde F_i é a força que causa a aceleração a_i em um átomo de massa m_i . A força pode ser obtida diretamente da derivada da energia potencial com relação às coordenadas r_i dos átomos[14].

A resolução do sistema pelo método analítico só é possível para sistemas com até duas partículas independentes, para sistemas mais complexos são utilizados métodos numéricos. Se a posição considerada do sistema para um tempo t for $r(t)$ então pelo uso do algoritmo de Verlet (equação 4).[15]

$$\begin{aligned} \vec{x}(t + \Delta t) &= \vec{x}(t) + \vec{v}(t) \Delta t + \frac{1}{2} \vec{a}(t) \Delta t^2 \\ \vec{v}(t + \Delta t) &= \vec{v}(t) + \frac{\vec{a}(t) + \vec{a}(t + \Delta t)}{2} \Delta t \end{aligned} \quad (4)$$

A solução numérica então depende do conhecimento da posição $r(t)$, da velocidade dr/dt e da aceleração d^2r/dt^2 para cada átomo, além de aproximações para as contribuições de termos de maior ordem. O intervalo de tempo Δt de cada etapa da trajetória é um parâmetro de grande importância em um cálculo de dinâmica molecular.

O artifício usado para calcular a velocidade é considerar o valor de Δt muito pequeno para podermos considerar que a aceleração seja considerada continua ao longo do tempo. Todavia intervalos muito pequenos se tornariam proibitivos por isso utilizamos intervalos na ordem 0,5 a 1 fs (fs= 10^{-15} s). Estes cálculos são extremamente custosos, por isso exigem altas capacidades computacionais.

Existem diversos programas que são utilizados para Dinâmica Molecular. Citamos dois deles como exemplos: GROMACS[16] e o TINKER[17].

3.3 “Coarse Graining” e o campos de Força MARTINI

A qualidade dos resultados de um sistema estudada depende do campo de força utilizado. Existem vários campos de força, mas o de interesse em nosso trabalho é o campo de força MARTINI[18] que associada a metodologia “Coarse-graining” permite que possamos fazer aproximações precisas sem desviar do modelo real. A redução do número de graus de liberdade utilizando sistemas de conjuntos de átomos como sendo sítios de interação, produzem alta efetividade e redução de grandeza temporal na ordem de 2~3 vezes. O que permite analisar longos tempos de simulação.

A metodologia “Coarse-graining” e o campo de força MARTINI foram comparados a diversos estudos para comprovar a sua eficiência e para melhorar sua aplicabilidade. Foram feitos alguns estudos sobre sistema já existentes. Cito exemplo: estudo em HIV-1 [19], vários estudos da influência de proteínas em membranas [20-23], estudo de deformação e destruição de membranas[24, 25], estudos simultâneos atomísticos e CG de peptídeos [26] e proteínas [27, 28], estudos de surfactantes e lipídios [18, 29], se mostra capaz de ter propriedades semi-qualitativas e termodinâmicas de camada bi-lipídicos [30-32],

O campo de força é dessa forma bastante aplicável para longas simulações de sistemas grandes.

O campo de força MARTINI e a metodologia “Coarse-Graining” são baseados nas representações de centros de interações e define quatro sistemas específicos que podem ser utilizados para representações de moléculas que são eles: Polar (P), Intermediário (N), Apolar (C) e Carregado (Q). Além disso, há uma subdivisão que considera o tipo de interação que pode ser assim definida: (d= doador, a= aceptor, da= os dois casos e 0=none) que se refere diretamente ao hidrogênios e ainda o grau de polarização associado ao centros de interações que podem ser definidos da seguinte forma (1 até 5, significando que 1 a polarização é fraca e 5 é altamente polarizado). A figura 4 mostra a representação dos aminoácidos utilizados em

MARTINI e a tabela 3 mostra os aminoácidos com seus nomes, abreviaturas e códigos FASTA.

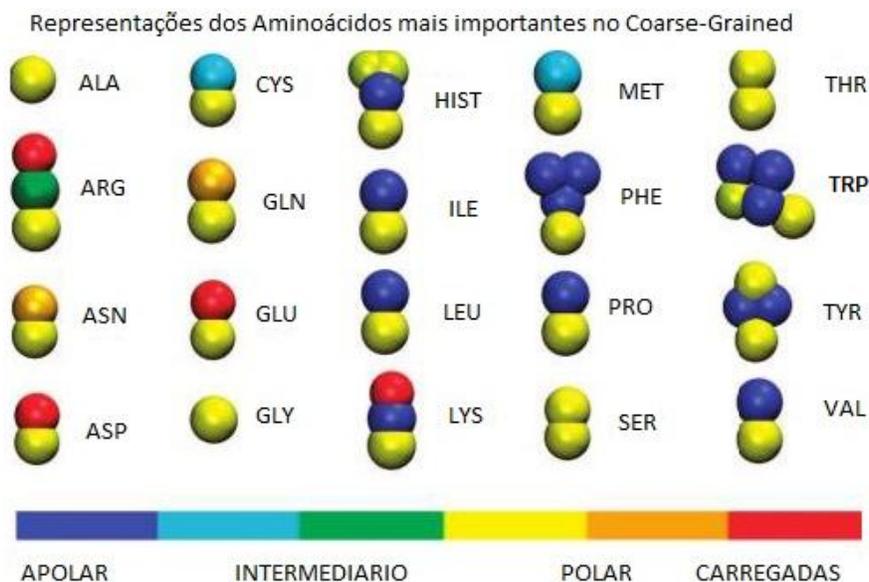


Figura 4: Representação do Aminoácidos em coarse-grained.

Tabela 3: Abreviaturas, Nomes e código FASTA dos aminoácidos.

Nº	Sigla	Nome	Código FASTA
1	ALA	Alanina	A
2	ARG	Arginina	R
3	ASN	Asparagina	N
4	ASP	Aspartato	D
5	CYS	Cisteína	C
6	GLN	Glutamina	Q
7	GLU	Glutamato	E
8	GLY	Glicina	G
9	HIS	Histidina	H
10	ILE	Isoleucina	I
11	LEU	Leucina	L
12	LYS	Lisina	K
13	MET	Metionina	M
14	PHE	Fenilalanina	F
15	PRO	Prolina	P
16	SER	Serina	S
17	THR	Treonina	T
18	TRP	Triptofano	W
19	TYR	Tirosina	Y
20	VAL	Valina	V

As equações (5-10) são usadas para parametrização do campo de força.

As interações são medidas pela equação de Leonard-Jones (LJ) as distâncias r_{ij} são as distâncias entre as moléculas a formula e mostrada na eq. (5),

$$V_{\text{Lennard-Jones}}(r_{ij}) = 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (5)$$

O valor de ε_{ij} variam de acordo com o tipo de partículas que interagem sendo $\varepsilon_{ij} = 5.6$ kJ/mol para interações entre sistemas polares fortes e valores de $\varepsilon_{ij} = 2.0$ kJ/mol para interações de sistemas apolares e polares, representando os efeitos hidrofóbicos. Os efeitos de tamanho das partículas são mostrado pela variação de $\sigma = 0.47$ nm para partículas normais, para partículas que são de interação do tipo anel-anel usa-se $\sigma = 0.43$ nm e o ε_{ij} e usado com valor de 75% em relação ao valor padrão.

Para os sistemas do tipo (Q = partículas carregadas) são usados interações do tipo coulumb representadas pela eq. (6).

$$V_{\text{el}} = \frac{q_i q_j}{4\pi \varepsilon_0 \varepsilon_{\text{rel}} r_{ij}} \quad (6)$$

A Constante Dielétrica do meio para estas interações e de $\varepsilon_{\text{rel}} = 15$ e o cutoff para Lennard-Jones: (shift function) entre $r = 0.9$ e $r = 1.2$ e para Coulumbic: cutoff (shift function) entre $r = 0$ e $r = 1.2$. As interações de sistemas muito próximos são desconsideradas como não ligantes. As equações a seguir descrevem as energias potencias dos ligantes eq. (7,8,9 e 10).

$$V_b = \frac{1}{2} K_b (d_{ij} - d_b)^2 \quad (7)$$

$$V_a = \frac{1}{2} K_a [\cos(\varphi_{ijk}) - \cos(\varphi_a)]^2 \quad (8)$$

$$V_d = K_d [1 + \cos(n\psi_{ijkl} - \psi_d)] \quad (9)$$

$$V_{\text{id}} = K_{\text{id}} (\psi_{ijkl} - \psi_{\text{id}})^2 \quad (10)$$

As equações atuam sobre os sítios ligados i, j, k e l com distância de equilíbrio d_B , ângulo φ_a e ângulos diedrais ψ_d e ψ_{id} . A constante de força K é geralmente fraca para poder simular efeitos de mobilidade existentes em modelos atomísticos de simulação. O ângulo potencial (eq. 8) é utilizada para rigidez da cadeia. O potencial de ligação (eq. 7) é utilizado para ligações químicas. O potencial de diedrais impróprios (eq. 10) e utilizado para prevenir distorções de sistemas planares e o potencial para diedrais próprios (eq. 9) é utilizado para manter conformação da estrutura secundária. Além disso, e importante ressaltar que mudanças conformacionais das estruturas secundárias das proteínas não estão adequadamente representadas por este modelo[10].

3.4 Análises

De posse das trajetórias das simulações foram realizadas análises empregando programas do pacote de software GROMACS[33]. As análises realizadas foram: Distâncias de interações dos polipeptídios e mapas de contato de resíduos e energias Coulumb e Lennard-Jones.

3.5 Aminoácidos e Código FASTA

Os aminoácidos são as unidades básicas das proteínas. Um α -aminoácido é constituído de um grupamento amina, uma carboxila, um átomo de Hidrogênio e um radical R diferenciado, ligados a um átomo de carbono, que é chamado de carbono α por ser adjacente ao sistema carboxila, (figura 5).

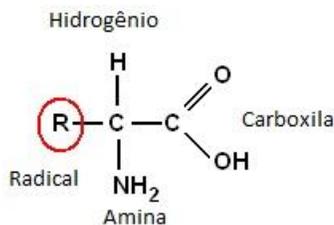


Figura 5: Estrutura básica de aminoácidos, as variações dos Radicais (R) dão origens a vários aminoácidos encontrados no seres vivos que originam as proteínas.

As variações das cadeias laterais geram 20 aminoácidos que possuem importância fundamental para seres vivos. Esses aminoácidos são representados no campo de força MARTINI e são os constituintes dos Antígenos B estudados.

As figuras (6-9) demonstram quais seriam estes 20 aminoácidos. Inicialmente representamos os que possuem: cadeias (R) Alifáticas, nas figuras depois mostramos também (R) de cadeias aromáticas e os aminoácidos de cadeias laterais com enxofre, cadeias (R) alifáticas hidroxiladas e de cadeias de laterais básicas e contendo (R) de aminoácidos ácidos e amidas derivadas nas (figuras 6,7,8 e 9).[34]

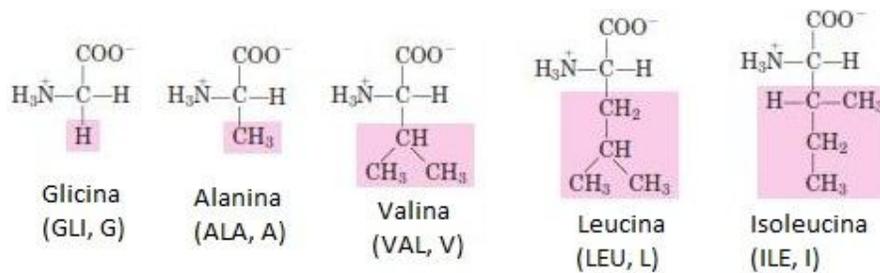


Figura 6: Aminoácidos de cadeia Alifática.

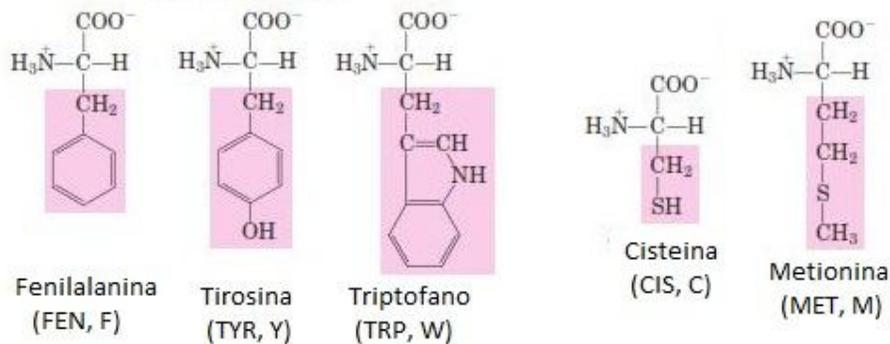


Figura 7: Aminoácidos de cadeia Aromáticas e Alifáticas contendo Enxofre (S).

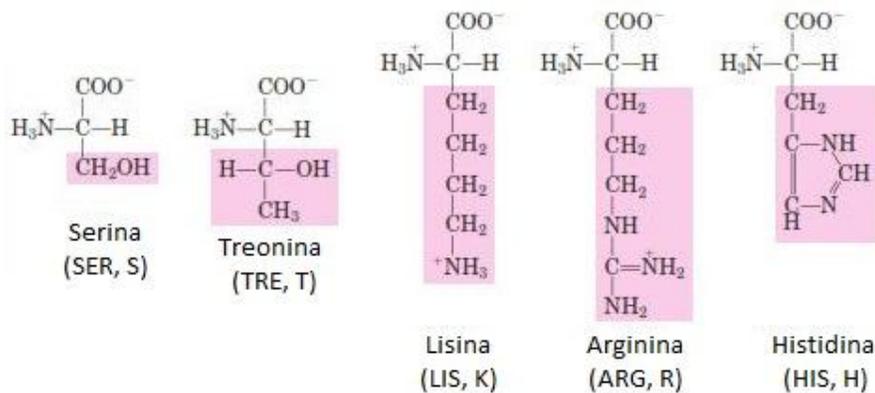


Figura 8: Aminoácidos de cadeias laterais alifáticas hidroxiladas e cadeias laterais básicas.

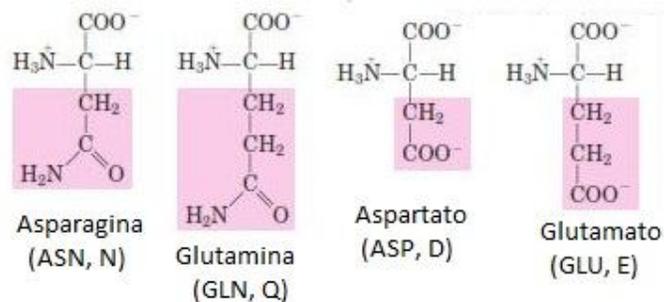


Figura 9: Aminoácidos Ácidos e cadeias laterais derivadas de amidas.

Os aminoácidos são geralmente representados por abreviações de três letras que normalmente são as três letras iniciais dos nomes dos aminoácidos, exceto para o Triptofano (Trp), Asparagina (Asn) e Glutamina (Gln). Existe também a representação pelo Código FASTA, esse código foi criado para simplificação e padronização da utilização dos aminoácidos na montagem de proteínas de tamanhos muito grandes[35]. A tabela 3, anteriormente demonstrada possui os códigos e siglas dos 20 aminoácidos constituintes dos polipeptídios.

A figura 10 apresenta os códigos primários para os três AgBs estudados: AgB81, AgB82 e AgB83.[5]

Apresentamos as diferenciações de cores para N-Terminal e C-Terminal dos polipeptídios.

```

AgB8/1 : ---DDGLTSTSRSVLKMFGQEVKVFYFERDPLGQKVVDDLKELVEVFOQLRKKLRMAIRSHLRGLIAEGE----- : 65
AgB8/3 : DDDDDDEVTKTKKGVYKAISEIKHFFQSDPLGKGLVEVMKLVASVCEMVRKKA R MALKYVVRKLVKEDS----- : 68
AgB8/2 : --RDEPKAHMGQVVKRRNGELRDFFRNDPLGQRLVALGNLDTAICQKQLQKIREVLRKLVKLVKEDDSDSK : 70

```

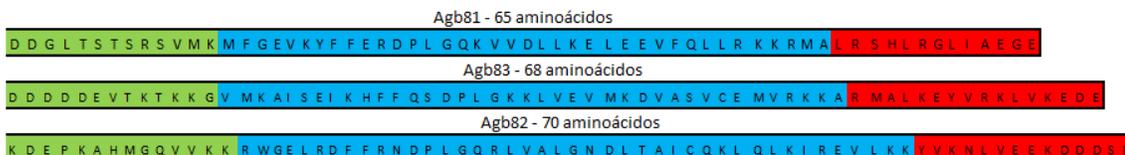


Figura 10: Código FASTA usado para montagem dos polipeptídios, o colorido identifica as partes N-iniciais e C-Iniciais dos polipeptídios para diferenciações posteriores.

A seguir demonstramos os aminoácidos componentes dos polipeptídios e o número de vezes que aparecem em cada um deles figura 11.

Agb83				Agb82				Agb81			
N°	Sigla	Nome	N° vezes	N°	Sigla	Nome	N° vezes	N°	Sigla	Nome	N° vezes
1	ASP	Ácido Aspártico (D)	9	1	ASP	Ácido Aspártico (D)	7	1	ASP	Ácido Aspártico (D)	4
2	GLY	Glicina (G)	2	2	GLY	Glicina (G)	4	2	GLY	Glicina (G)	5
3	LEU	Leucina (L)	4	3	LEU	Leucina (L)	9	3	LEU	Leucina (L)	11
4	THR	Treonina (T)	2	4	THR	Treonina (T)	1	4	THR	Treonina (T)	2
5	SER	Serina (S)	3	5	SER	Serina (S)	1	5	SER	Serina (S)	4
6	ARG	Arginina (R)	3	6	ARG	Arginina (R)	5	6	ARG	Arginina (R)	6
7	VAL	Valina (V)	9	7	VAL	Valina (V)	6	7	VAL	Valina (V)	5
8	MET	Metionina (M)	4	8	MET	Metionina (M)	1	8	MET	Metionina (M)	3
9	LYS	Lisina (K)	13	9	LYS	Lisina (K)	11	9	LYS	Lisina (K)	6
10	PHE	Fenilalanina (F)	2	10	PHE	Fenilalanina (F)	2	10	PHE	Fenilalanina (F)	4
11	GLU	Ácido Glutâmico (E)	6	11	GLU	Ácido Glutâmico (E)	5	11	GLU	Ácido Glutâmico (E)	7
12	TYR	Tirosina (Y)	1	12	TYR	Tirosina (Y)	1	12	TYR	Tirosina (Y)	1
13	PRO	Prolina (P)	1	13	PRO	Prolina (P)	2	13	PRO	Prolina (P)	1
14	GLN	Glutamina (Q)	1	14	GLN	Glutamina (Q)	4	14	GLN	Glutamina (Q)	2
15	ALA	Alanina (A)	4	15	ALA	Alanina (A)	3	15	ALA	Alanina (A)	2
16	HIS	Histidina (H)	1	16	HIS	Histidina (H)	1	16	HIS	Histidina (H)	1
17	ILE	Isoleucina (I)	2	17	ILE	Isoleucina (I)	2	17	ILE	Isoleucina (I)	1
18	TRP	Triptofano (W)	0	18	TRP	Triptofano (W)	1	18	TRP	Triptofano (W)	0
19	ASN	Asparagina (N)	0	19	ASN	Asparagina (N)	3	19	ASN	Asparagina (N)	0
20	CYS	Cisteína (C)	1	20	CYS	Cisteína (C)	1	20	CYS	Cisteína (C)	0
total			68	total			70	total			65

Figura 11: Polipeptídios e seus aminoácidos componentes e o número de vezes que eles aparecem em cada polipeptídio.

4. Protocolo de Simulação

A fim de investigar as possíveis interações entre os polipeptídios acima citados, efetuaram-se quatro simulações: Primeiras três delas foram feitas com os polipeptídios AgB81, AgB82 e AgB83 em caixas separadas contendo cada uma oito polipeptídios e chamamos de sistema AgB81, sistema AgB82 e sistema AgB83 e uma quarta simulação foi realizada misturando os três AgBs para testar as interações entre eles que foi chamada de sistema de Heteroligomeros, nesta utilizou-se 4 polipeptídios de AgB81, AgB82 e AgB83 na mesma caixa totalizando 12 componentes para o sistema de Heteroligomeros.

As simulações e análises foram realizadas com o pacote de software GROMACS, utilizando o campo de força Martini.

O passo de integração utilizado foi de 20 fs. Simulávamos 500ns e as trajetórias foram salvas a cada 0,1ns.

O algoritmo de Nose-hoover[36] foi utilizado para manter a temperatura de 310K e o de Parrinello-Rahman[37] para manter a pressão isotrópica de 1 bar.

A montagem das estruturas como já falado acima foi feita com utilização do ROSSETA e do código FASTA[6]. Antes da solvatação dos polipeptídios utilizamos o script desenvolvido por Marrink et al[10]. Após montagem das estruturas e colocação da água de solvatação. Avaliamos a cargas do sistema e utilizamos Cl⁻ para contrabalancear as cargas do sistema.

A minimização de energia ocorreu via algoritmo Steepest Descent.

Para fazermos todos os preparos das amostras foram utilizadas ferramentas do software GROMACS, tais como *genbox* e *editconf*. As tabelas abaixo (5) e (6) mostram estruturas montadas para simulação.

Tabela 4: Tamanho dos resíduos com CG e como ficam nas simulações atomísticas

Tabela das estruturas montadas para simulação

Nomes	Aminoácidos (8x)	Résíduos CG (8x)	Résíduos Atômísticas (8x)
AgB81	65 (520)	147 (1176)	682 (5456)
AgB82	70 (560)	160 (1280)	745 (5960)
AgB83	58 (464)	154 (1232)	696 (5568)
Heteroligomeros	(4x) 65(260), 70(280),58(232)	1844	8492

Tabela 5: Dimensões das caixas e quantidades de estruturas componentes, diferenciando o sistema de Heteroligomeros por ter 4 componentes de cada sistema de polipeptídios.

Estruturas montadas para simulação

nomes	Polipéptidos	Caixa dimensões (X-Y-Z)	Moléculas de Água	Ions Cl-	Totais
AgB81	8	27,6162	179179	8	179195
AgB82	8	27,14746	171996	32	172042
AgB83	8	27,82032	185159	8	185175
Heteroligomes	12 - 4/4/4	(xy)28,53378/(z)56,8810	322340	24	322376

Terminadas as dinâmicas, foram feitas as seguintes análises, com base nas trajetórias das simulações: avaliações energéticas dos sistemas, avaliações de aproximações dos resíduos e mapas de contato no fim de 500000 ps de simulação para os polipeptídios e 242300 ps para o sistema de Heteroligomeros.

Todas as simulações foram realizadas no laboratório de Química Teórica, localizado no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

5. Resultados e Discussões

5.1 Sistema AgB83

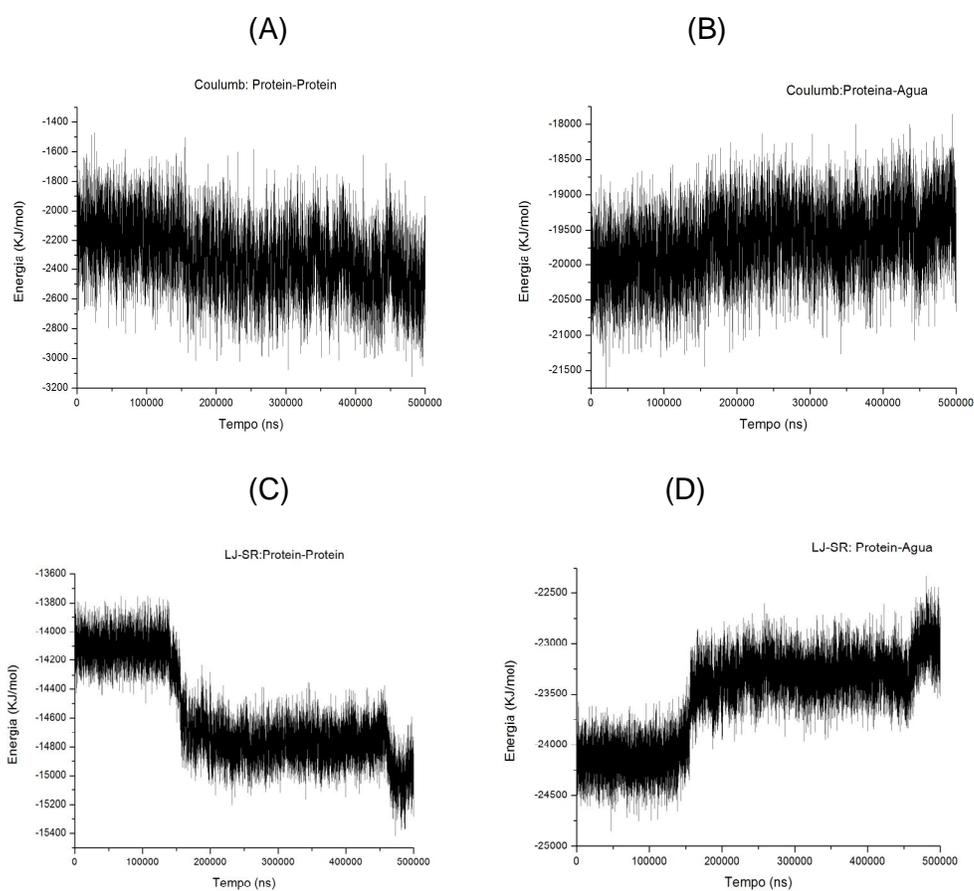


Figura 12: O gráfico (A) Energia de Coulomb do sistema AgB83 entre polipeptídios, o gráfico (B) Energia de Coulomb do sistema AgB83 entre polipeptídios e águas do sistema, gráfico (C) Energia Lennard-Jones do sistemas AgB83 entre polipeptídios e o gráfico (D) Energia Lennard-Jones do Grupo AgB83 entre polipeptídios e águas do sistemas.

Tabela 6: Patamares energéticos dos gráficos apresentados.

Patamares energéticos dos sistemas Interação entre Polipeptídios (kJ/mol)

Ag83	Coulumbic	-2.000	-2.400	-400
	Lennard-Jones	-14.100	-15.000	-900

Patamares energéticos dos sistemas Interação entre Polipeptídios e água (kJ/mol)

Ag83	Coulumbic	-20.000	-19.500	500
	Lennard-Jones	-24.250	-23.000	1.250

Como podemos verificar pelos gráficos 12 (A, B, C e D) de energia apresentados para o sistema AgB83 os gráficos referentes a energias de Lennard-Jones dos polipeptídios e água sofrem uma elevação tornando-se ao longo do tempo menos negativos, pois as áreas acessíveis para os solventes está se tornando menor devido a maior interações entre os polipeptídios do sistema, vemos ainda que no caso da energia de Coulomb houve queda se tornando está ao contrário mais negativas o que evidência que houve aproximações entre os polipeptídios dos sistema. Existem ainda evidências de encontro, demonstradas pelos dois patamares energéticos bem definidos nos quadro gráficos apresentados, nos tempos em torno de 130ns e quase ao fim da trajetória. A tabela 6 demonstra as diferenças energéticas dos gráficos.

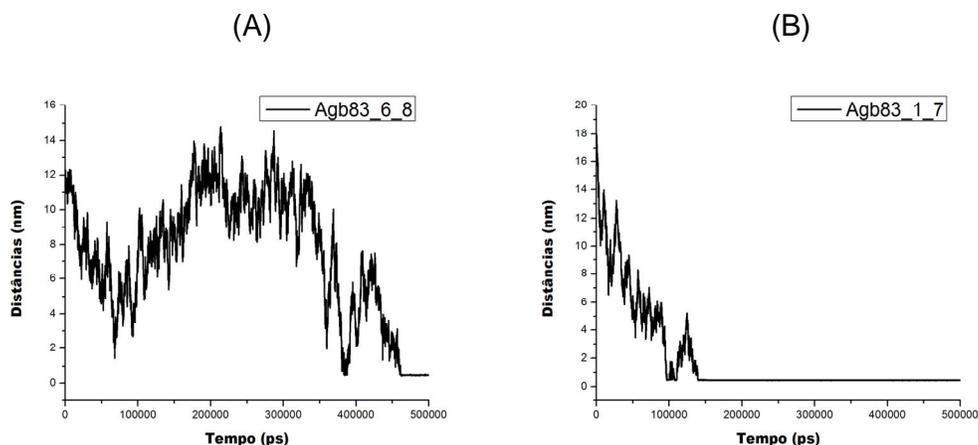


Figura 13: O gráfico (A) mostra aproximação de dois polipeptídios do sistema AgB83 são eles AgB83_1 e AgB83_7 e gráfico (B) mostra aproximação dos polipeptídios AgB83_6 e AgB83_8.

Os tempos de encontro demonstrados nos gráficos da figura 13 (A e B) são para os polipeptídios 1_7(139.400 ns) e 6_8(461.200 ns). Foram poucos encontros e com tempos bastante elevados. O sistema praticamente não demonstrou uma tendência de agregação como era de se esperar, pois na literatura estudada o AgB83 tem menores quantidades de encontros, porem são eles mais robusto em relação aos outros AgB estudados.[2]

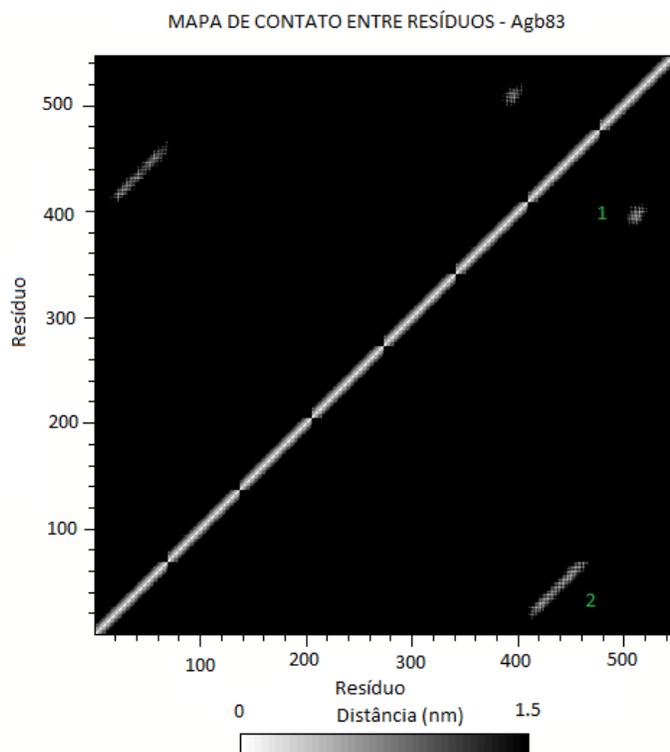


Figura 14: Mapa de contato, mostra locais aonde existe contato entre resíduos constituintes do polipeptídios do sistema AgB83. Os números verdes mostram a seqüência de analises feita para determinar os contatos entre resíduos do sistema AgB83.

Tabela 7: Aminoácidos que interagem a partir do mapa de contato.

Sistema AgB83	
1-7 Aminoácidos - 13 até 68- 409 até 469 (2) paralelo	
1	...
7	...
6-8 Aminoácidos - 385 até 405- 499 até 522 (1) perpendicular	
6	...
8	...

Observamos a formação de dímeros nesse sistema como demonstrado na tabela 7, é ainda verificamos que houve um pareamento de dois polipeptídios praticamente completo no sistema estudado e ainda um encontro entre **C-terminal** e **partes centrais**.

5.2 Sistema AgB82

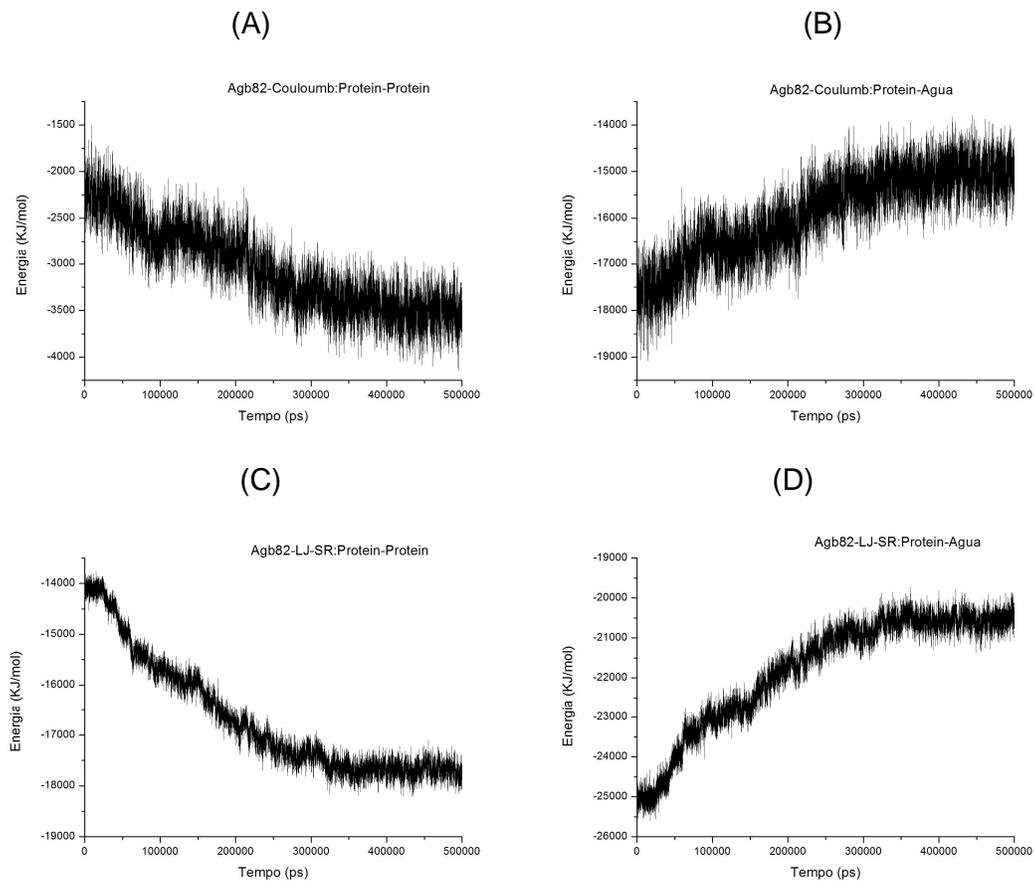


Figura 15: O gráfico (A) Energia de Coulomb do sistema AgB82 entre polipeptídios, o gráfico (B) Energia de Coulomb do sistema AgB82 entre as polipeptídios e águas do sistema, gráfico (C) Energia Lennard-Jones do sistemas AgB82 entre polipeptídios e o gráfico (D) Energia Lennard-Jones do Grupo AgB83 entre polipeptídios e águas do sistemas.

Tabela 8: Patamares energéticos do sistema AgB82 apresentados nos gráficos da figura 15 (A, B, C e D).

Patamares energéticos dos sistemas Interação entre Polipeptídios (kJ/mol)

AgB82	Coulumbic	-2.250	-3.400	-1150
	Lennard-Jones	-14.000	-17.600	-3.600

Patamares energéticos dos sistemas Interação entre Polipeptídios e água (kJ/mol)

AgB82	Coulumbic	-17.500	-15.500	2.000
	Lennard-Jones	-25.000	-20.500	4.500

A figura 15 (A, B, C e D) mostram os gráficos de energias de Coulomb e as de Lennard-Jones do sistema AgB82. Em comparação com os gráficos do sistema Agb83 vemos uma tendência de queda mais suave das curvas do gráfico, refletindo um maior número de agregações. E menor acessibilidade do solvente nesse grupo.

Observamos também uma diferença energética maior que pode ser evidência pela tabela 10, isso também demonstra que esse sistema teve maior número de agregações que o sistema anterior.

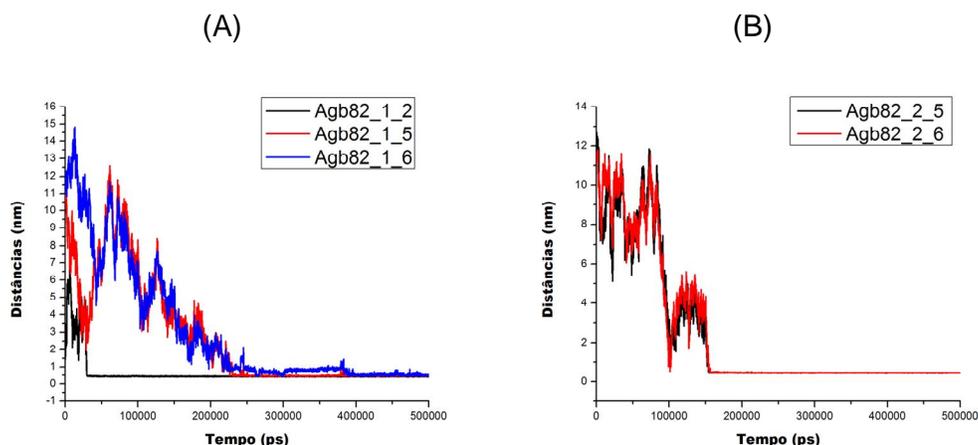


Figura 16: O gráfico (A) mostra a distâncias entre AgB82_1 e AgB82_2, AgB82_5 e AgB82_6, o gráfico (B) mostra a distâncias entre o AgB82_2 e AgB82_5 e AgB82_6

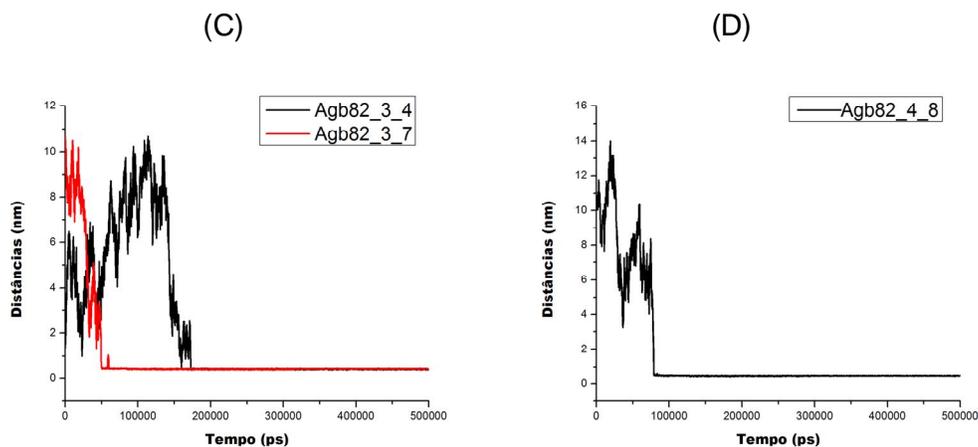


Figura 17: O gráfico (C) mostra as distâncias entre AgB82_3 e AgB82_4 e AgB82_7, o gráfico (D) mostra as distâncias entre AgB82_4 e AgB82_8.

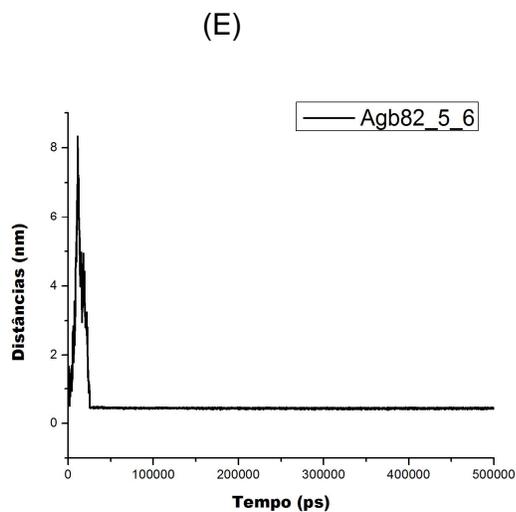


Figura 18: O gráfico (E) mostra as distâncias entre AgB82_5 e AgB82_6.

A figura 16 (A e B), a figura 17 (C e D) e figura 18 mostram os gráficos de distância entre os polipeptídios que compõem o sistema AgB82 e seus tempos de encontro, esse encontros foram entre os seguintes polipeptídios nos seguintes

tempos: 1_2 (30 ns), 1_5 (384 ns), 1_6 (391 ns), 2_5 (154 ns), 2_6 (156,2 ns), 3_4 (172,8 ns), 3_7 (59,8 ns), 4_8 (78,9 ns), 5_6 (25,3 ns). Verificamos um total de nove encontros para este sistema. Anteriormente havíamos apenas 2 encontros para sistema AgB83.

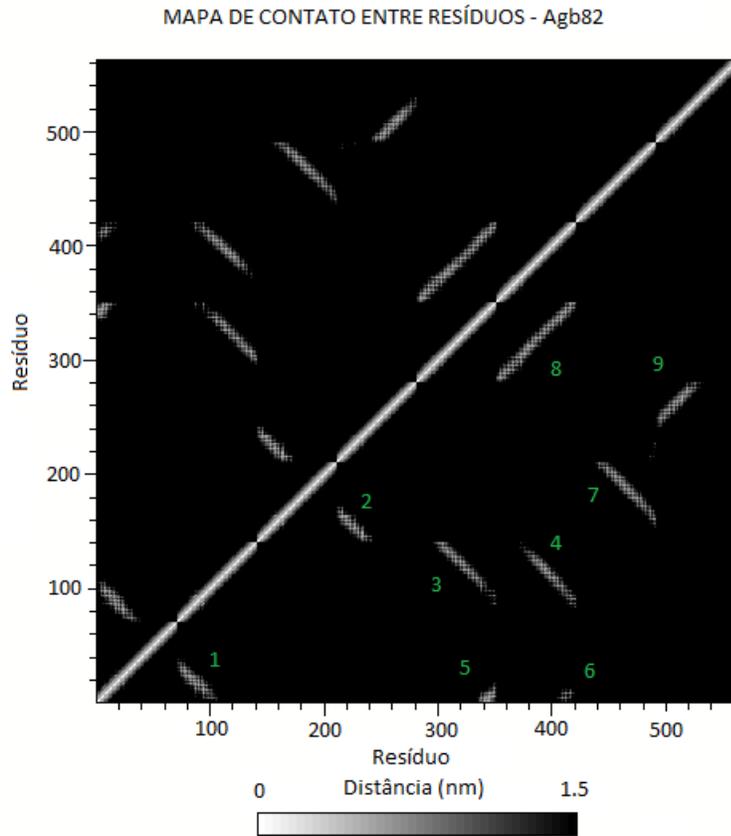
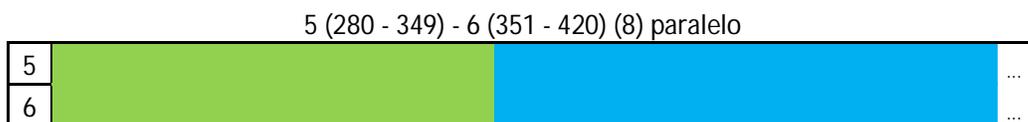
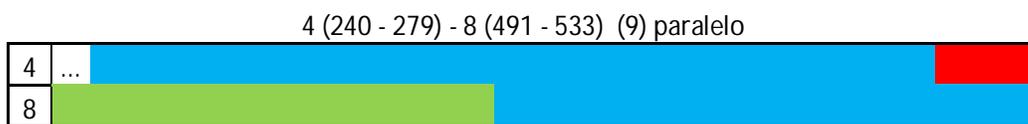
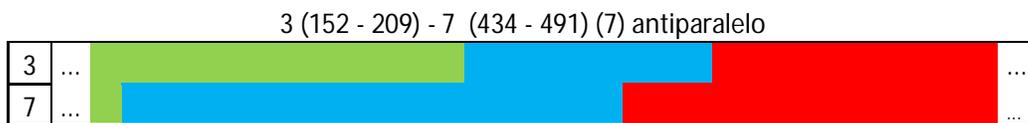
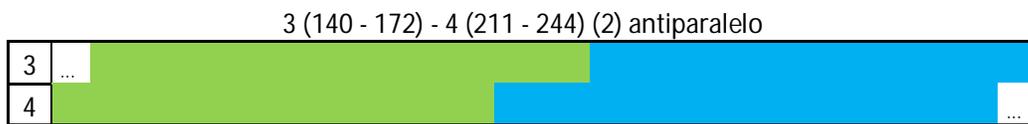
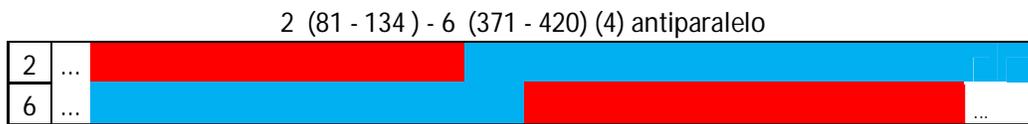
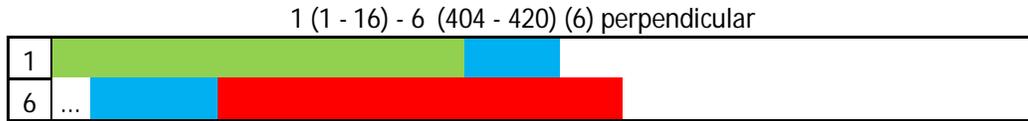
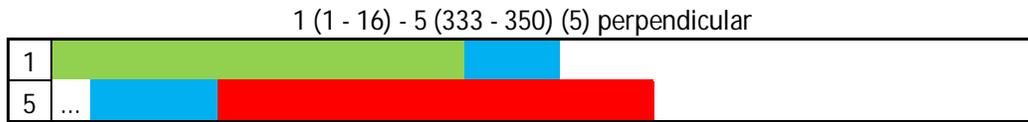


Figura 19: Mapa de contato, mostra locais aonde existe contato entre resíduos constituintes do polipeptídios do sistema AgB82. Os números verdes mostram a seqüência de análises feita para determinar os contatos entre resíduos do sistema AgB82.

Tabela 9: Mostra os resíduos que aparecem próximos a partir da análise do mapa de contato do sistema AgB82 e mostra a orientação no mapa de contato.

Sistema AgB82	
1 (1-37) - 2 (71 - 110) (1) antiparalelo	
1	...
2



Observamos para este sistema a formação de dois tetrâmeros compostos pelos polipeptídios 1_2_5_6 e 3_4_7_8. Eles se encontram três vezes entre **N-Terminal** com **N-Terminal**, duas vezes **C-Terminal** com **C-Terminal** e três vezes **N-Terminal** com **C-Terminal** e tivemos 1 encontro completo pareando dois polipeptídios neste grupo. Mostrando que tem grande capacidade de agregação e podem se encontrar de variadas formas ao agregarem com maior tendência de

encontro entre partes **N-Terminal** com **N-Terminal**, duas vezes **C-Terminal** com **C-Terminal**.

5.3 Sistema AgB81

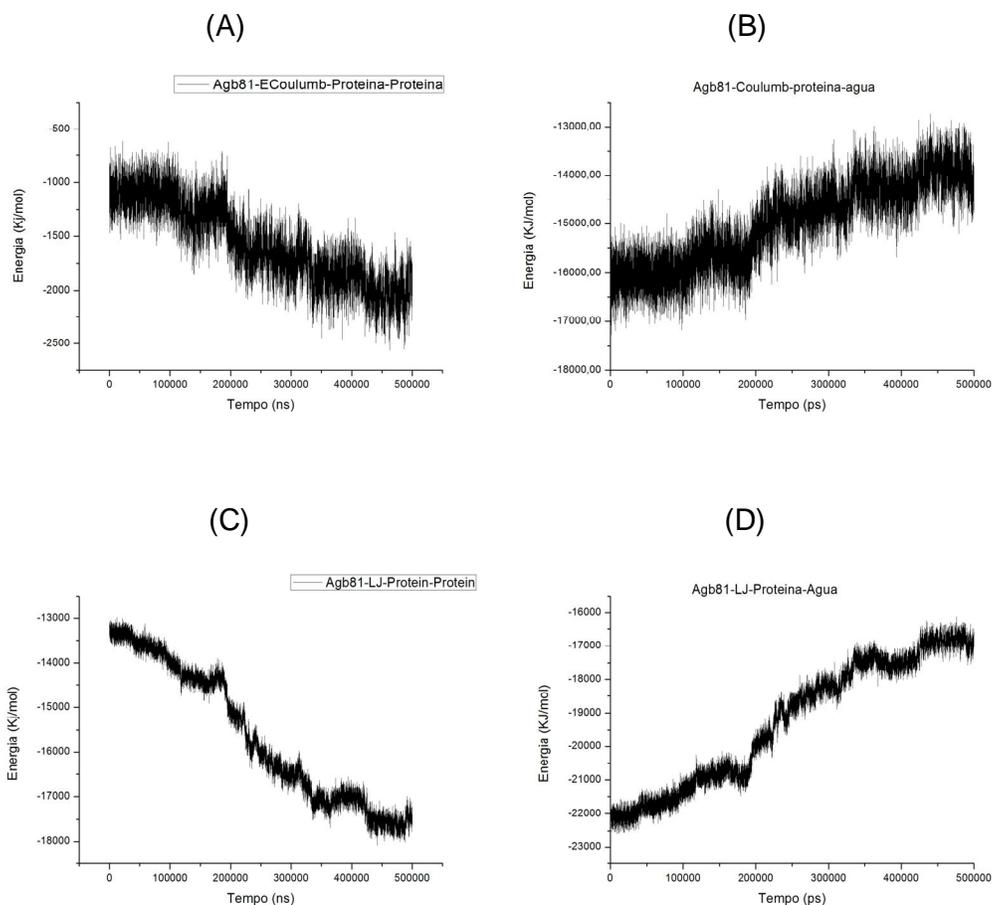


Figura 20: O gráfico (A) Energia de Coulomb do sistema AgB81 entre polipeptídios, o gráfico (B) Energia de Coulomb do sistema AgB82 entre os polipeptídios e águas do sistema, O gráfico (C) Energia Lennard-Jones do sistema AgB81 entre polipeptídios e o gráfico (D) Energia Lennard-Jones do Grupo AgB81 entre polipeptídios e águas do sistema.

Tabela 10: Patamares energéticos do sistema AgB81.

Patamares energéticos dos sistemas Interação entre Polipeptídios (kJ/mol)				
	Energias	Inicial	Final	diferências
AgB81	Coulombic	-1.000	-2.000	-1.000
	Lennard-Jones	-13.500	-17.500	-4.000

Patamares energéticos dos sistemas Interação entre Polipeptídios e água (kJ/mol)

	Energias	Inicial	Final	diferências
AgB81	Coulumbic	-16.000	-14.000	2.000
	Lennard-Jones	-22.000	-17.000	5.000

Os gráficos de energia apresentados na figuras 20 (A, B, C e D) possuem também uma tendência de queda mais suaves em suas curvas, como anteriormente para o sistema AgB82 isso evidência grande número de agregações. Podemos ainda verificar de acordo com a tabela 13 que as variações energéticas foram ainda maiores que o do sistema AgB82, ou seja, este sistema apresentou um número de agregações maiores que o sistema anterior ao longo da simulação.

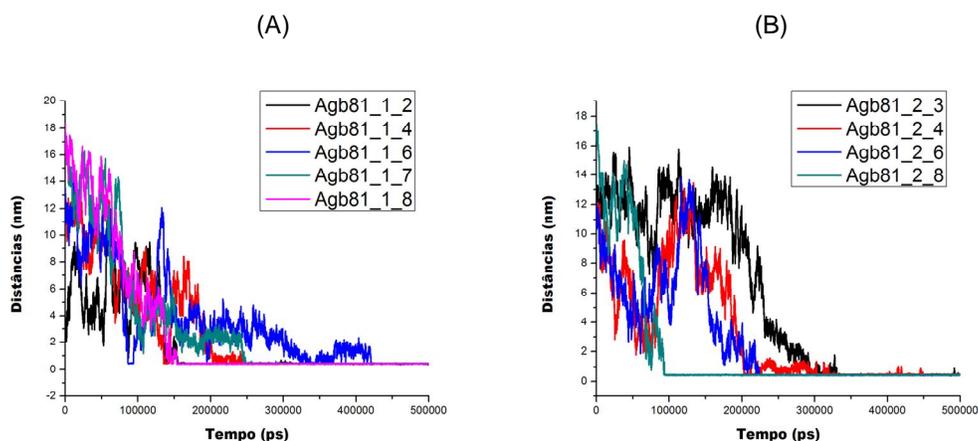


Figura 21: O gráfico (A) mostra distâncias entre os polipeptídios do sistema AgB81 e o polipeptídio AgB81_1, o gráfico (B) mostram as distâncias entre os polipeptídios do sistema AgB81 e o polipeptídio AgB81_2.

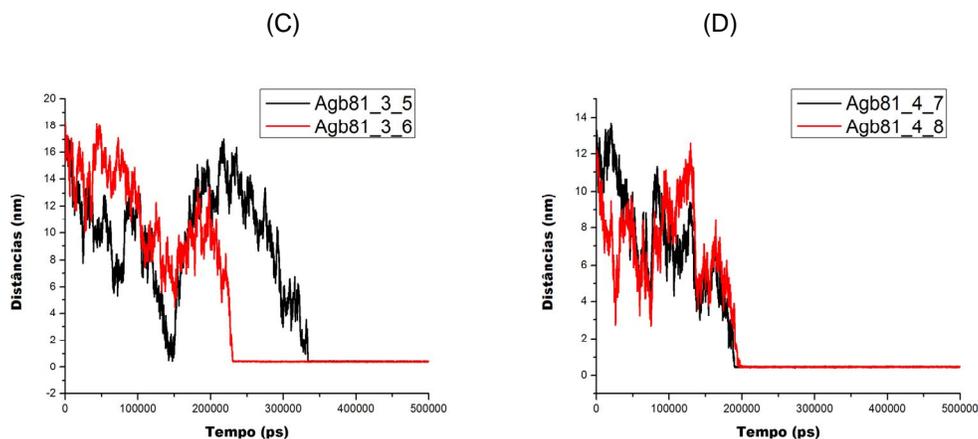


Figura 22: O gráfico (C) mostra distâncias entre os polipeptídios do sistema AgB81 e o polipeptídio AgB81_3, o gráfico (D) mostra a distâncias entre os polipeptídios do sistema AgB81 e o polipeptídio AgB81_4.

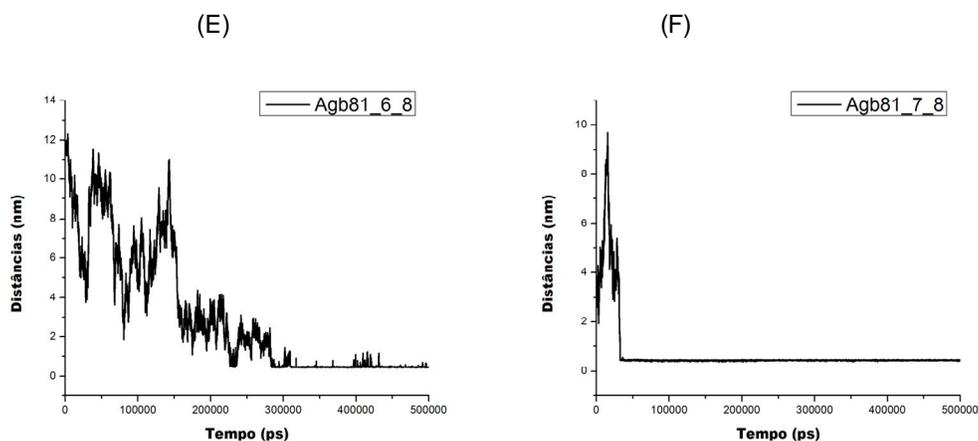


Figura 23: O gráfico (E) mostra distâncias entre os polipeptídios do sistema AgB81 e o polipeptídio AgB81_6, o gráfico (F) mostra a distâncias entre os polipeptídios do sistema AgB81 e o polipeptídio AgB81_7.

As figuras 21 (A e B), 22 (C e D) e 23 (E e F), mostram os gráficos de distância entre os polipeptídios que compõem o sistema AgB81 e seus tempos de encontro, esses encontro foram entre os seguintes polipeptídios nos seguintes tempos: 1_2 (156 ns), 1_4 (246 ns), 1_6 (425 ns), 1_7 (249 ns), 1_8 (155 ns), 2_3 (330 ns), 2_4 (320,6 ns), 2_6 (225 ns), 2_8(98 ns), 3_5 (335 ns), 3_6 (231 ns), 4_7 (190 ns), 4_8 (199 ns), 6_8 (311 ns), 7_8 (94 ns).

MAPA DE CONTATO ENTRE RESÍDUOS - Agb81

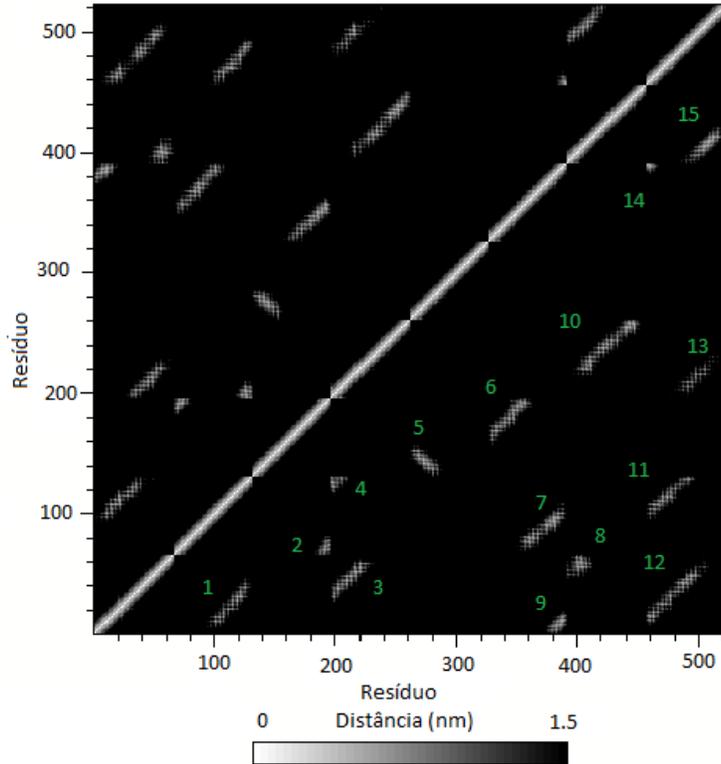
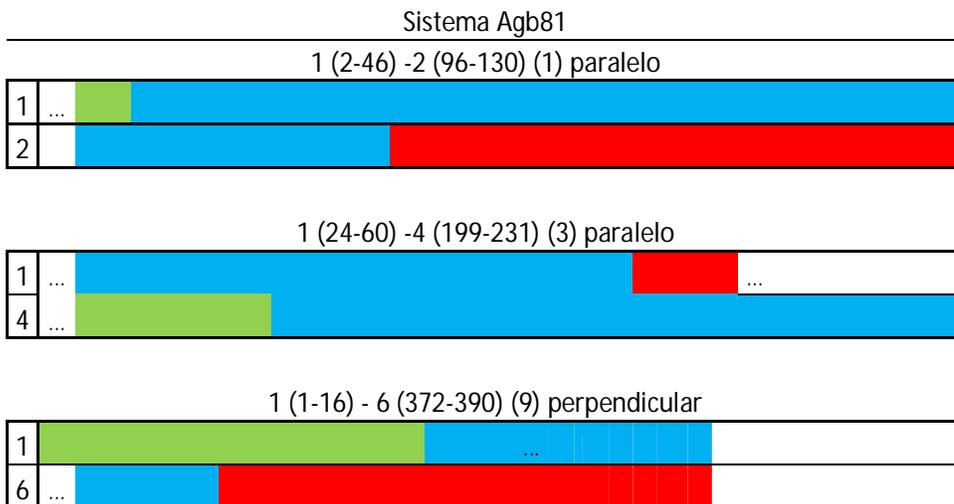


Figura 24: Mapa de contato mostra locais aonde existe contato entre resíduos constituintes dos polipeptídios do sistema AgB81. Os números mostram a seqüência de análises feita para determinar os contatos entre resíduos do sistema AgB81.

Tabela 11: Mostra os resíduos que estão próximos a partir da análise do mapa de contato do sistema AgB81.



1 (43-63) - 7 (391- 412) (8) perpendicular



1 (5-58) - 8 (456-508) (12) paralelo



2 (66-78) - 3 (181-195) (2) perpendicular



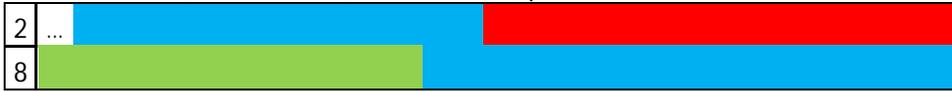
2 (112-128) - 4 (196 - 213) (4) perpendicular



2 (66 - 105) - 6 (346 - 391) (7) paralelo



2 (93 - 128) - 8 (456 -499) (11) paralelo



3 (131 - 154) - 5 (261 - 386) (5) antiparalelo



3 (155 - 193) - 6 (326 - 362) (6) paralelo



...

4 (210 - 258) - 7 (395 - 452) (13) paralelo



4 (196 - 235) - 8 (476 - 520) (10) paralelo



6 (379 - 388) - 8 (456 - 467) (14) perpendicular



7 (391 - 421) - 8 (485 - 420) (15) paralelo



Observamos para este sistema a formação de um octamero composto pelos polipeptídios 1_2_3_4_5_6_7_8. Eles se encontram dez vezes entre **N-Terminal** com **C-Terminal**, duas vezes **C-Terminal** com **parte central** e duas vezes **N-Terminal** com **N-Terminal** e uma vez **N-Terminal** com **parte central**. Mostrando que tem grande capacidade de agregação e podem se encontrar de variadas formas ao agregarem com maior tendência de encontro entre partes **N-Terminal** com **C-Terminal**, ocorrendo 10 vezes neste sistema.

5.4 Sistema de Heteroligomeros

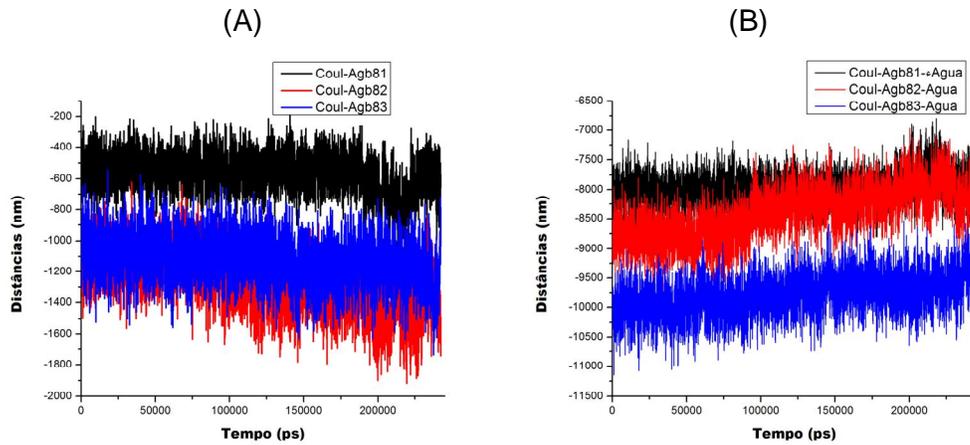


Figura 25: O gráfico (A) mostra energias de Coulumbic associada a cada um dos sistemas do sistema e o gráfico (B) mostra as energias de Coulumbic do sistema com a água.

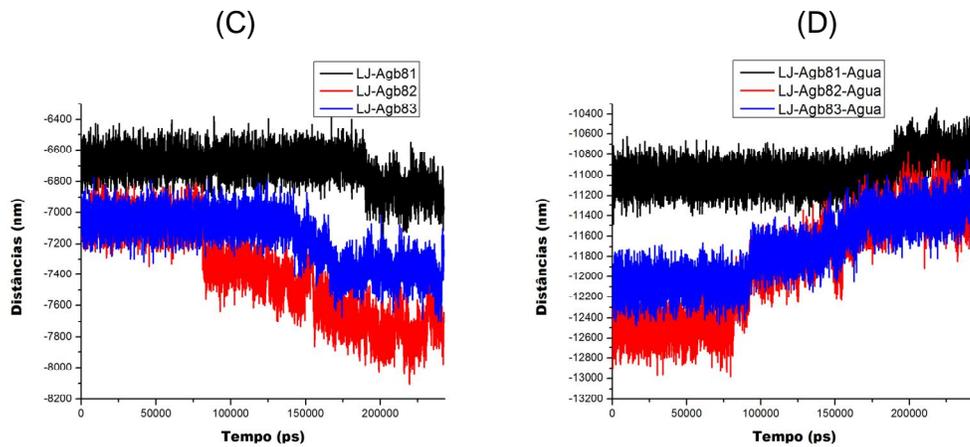


Figura 26: O Gráfico (C), Mostra as Energias de Leonard Jones de cada sistema do sistema e o gráfico (D) mostra a Energia de Lennard-Jones dos sistemas com água.

Tabela 12: Patamares energéticos do sistema de Heteroligomeros de todos os sistemas presentes.

Patamares energéticos para os polipeptídios do sistema de Heteroligomeros

	Energias	Inicial	Final	diferências
AgB81	Coulumb	-500	-580	-80
	Lennard-Jones	-6.700	-6.900	-200

AgB82	Coulumb	-11.000	-14.000	-300
	Lennard-Jones	-7.000	-7.600	-600

Ag83	Coulumb	-1.100	-1.250	-150
	Lennard-Jones	-7.000	-7.400	-400

Patamares energéticos para interação dos polipeptídios com Água do sistema de Heteroligomeros

	Energias	Inicial	Final	diferências
AgB81	Coulumb	-8.100	-8.000	100
	Lennard-Jones	-11.000	-10.600	400

AgB82	Coulumb	-8.700	-8.000	700
	Lennard-Jones	-12.800	-11.200	1.600

Ag83	Coulumb	-9.800	-9.300	500
	Lennard-Jones	-12.000	-11.200	800

Os dados que serão apresentados a partir de agora são correspondentes as análises feitas em cima da simulação chamada de sistema de Heteroligomeros a qual possui polipeptídios dos três sistemas apresentados. Nas Figuras 25 (A e B) e 26 (C e D) mostramos os gráficos de energia do sistema de Heteroligomeros e tabela 19 seus patamares energéticos observados nos gráficos 25 e 26. Aqui realizamos um estudo de energia por grupos e verificamos dois patamares energéticos a para os polipeptídios dos sistemas AgB82 e AgB83 e um patamar mais significativo para o sistema AgB81. Os gráficos seguem mesma tendência dos gráficos já apresentados durante o trabalho. Uma diferença apresentada na tabela 19 foi a variação energética para o representantes do sistema AgB83 no sistema Heteroligomero, pois não esperávamos verificar maiores encontros por parte desse

grupo em relação aos representantes do sistema AgB81, que dessa vez não teve muitos encontro durante a simulação. O AgB83 teve um encontro entre grupos e um encontro entre polipeptídios do mesmo sistema, mas esse encontro que ocorre na casa de 130ns segue a tendência do sistema simulado isolado, demorou maior tempo para ocorrer.

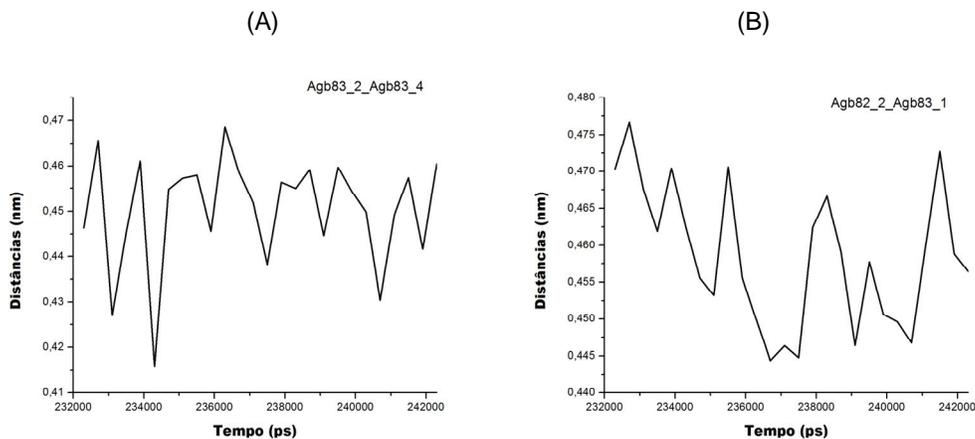


Figura 27: O gráfico (A) mostra a aproximação entre os polipeptídios AgB83_2 e AgB83_4 pertencentes ao mesmo sistema, o gráfico (B) mostra a aproximação dos polipeptídios AgB82_2 e AgB83_1 sendo esses de sistemas diferentes.

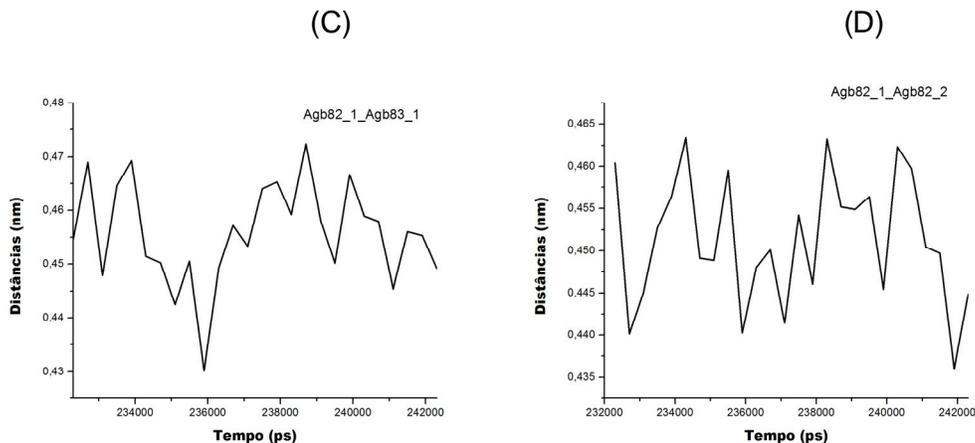


Figura 28: O gráfico (C) mostra a aproximação entre os polipeptídios AgB82_1 e AgB83_1 pertencentes aos sistemas AgB82 e AgB83, o gráfico (D) mostra a aproximação dos polipeptídios AgB82_1 e AgB82_2 sendo esses do mesmo sistema AgB82.

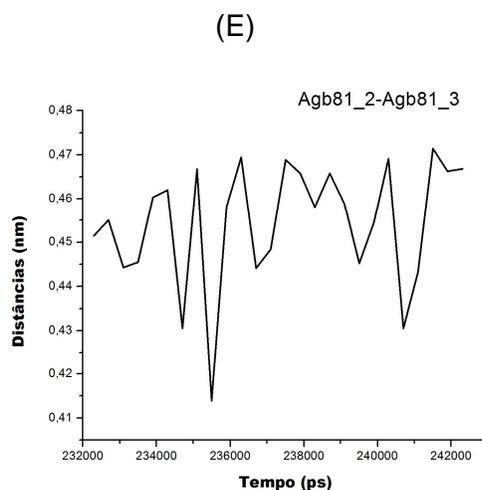


Figura 29: O gráfico (E) mostra a aproximação entre polipeptídeos AgB81_2 e AgB81_3 pertencentes ao mesmo sistema AgB81.

Os gráficos de distâncias entre os polipeptídeos que se aproximaram no sistema de Heteroligomeros figuras 27 (A e B), 28 (C e D) e 29, foram feitos nos tempos finais da simulação por conta de um problema de hardware que nos causou perda de dados e paralisação na simulação, eles mostram as distâncias de encontro na casa de 0,4 nm. Os representantes por sistema que se encontraram foram: AgB81_2 e AgB81_3(43 ns), AgB82_1 e AgB82_2(90 ns), AgB82_1 e AgB83_1(70 ns), AgB82_2 e AgB83_1(70 ns), AgB83_2 e AgB83_4(120,7 ns). A tabela 13 mostra de forma mais organizada estes encontros.

Tabela 13: Encontro para o sistema Heteroligomeros e tempos de encontros.

	Tempo de encontros dos polipeptídeos do sistema Heteroligomeros (ps)						
	AgB81_2	AgB81_3	AgB82_1	AgB82_2	AgB83_1	AgB83_2	AgB83_4
AgB81_2	x	170.000	x	x	x	x	x
AgB81_3	170.000	x	x	x	x	x	x
AgB82_1	x	x	x	90.000	70.000	x	x
AgB82_2	x	x	90.000	x	70.000	x	x
AgB83_1	x	x	70.000	70.000	x	x	x
AgB83_2	x	x	x	x	x	x	120.700
AgB83_4	x	x	x	x	x	120.700	x

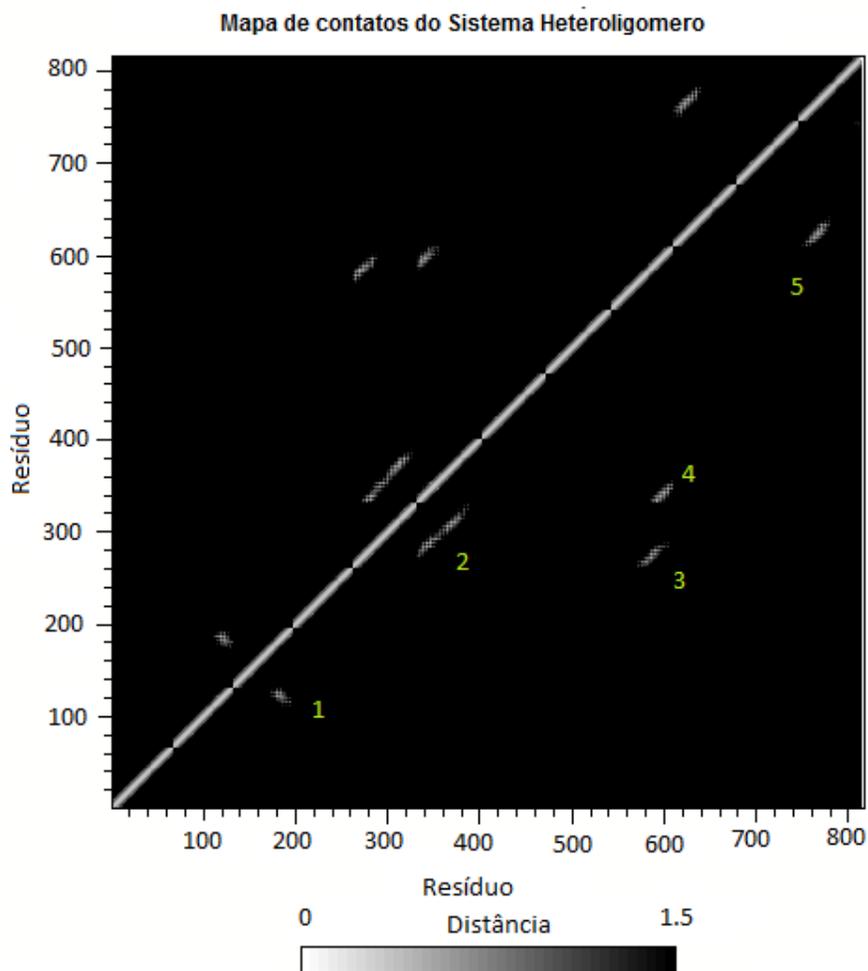
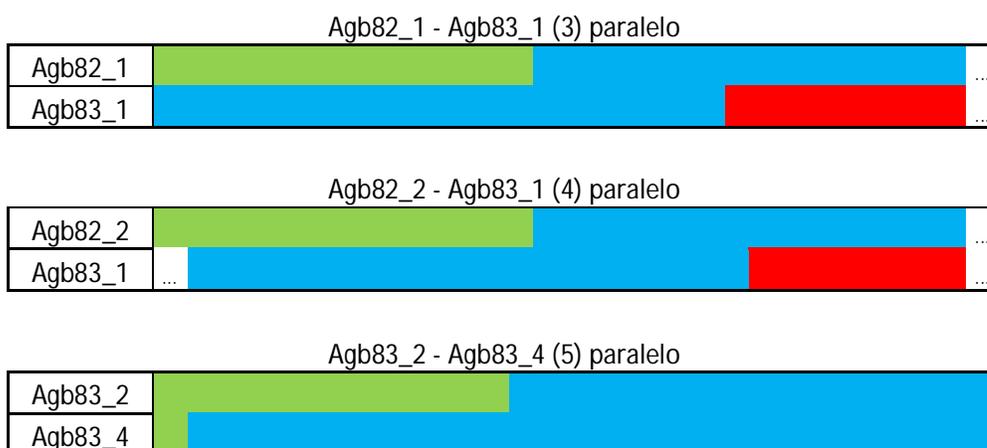


Figura 30: Mapa de contato entre resíduos do sistema de Heteroligomeros.

Tabela 14: Resíduos mais próximos de acordo com o mapa de contato.

Sistema Heteroligomeros				
Agb81_2 - Agb81_3 (1) antiparalelo				
Agb81_2	<table border="1" style="width: 100%; height: 20px; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 20%; background-color: red;"></td> <td style="width: 60%; background-color: blue;"></td> <td style="width: 20%; background-color: white;"></td> </tr> </table>			
Agb81_3	<table border="1" style="width: 100%; height: 20px; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 15%; background-color: green;"></td> <td style="width: 85%; background-color: blue;"></td> </tr> </table>			
Agb82_1 - Agb82_2 (2) paralelo				
Agb82_1	<table border="1" style="width: 100%; height: 20px; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; background-color: green;"></td> <td style="width: 50%; background-color: blue;"></td> </tr> </table>			
Agb82_2	<table border="1" style="width: 100%; height: 20px; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; background-color: green;"></td> <td style="width: 50%; background-color: blue;"></td> </tr> </table>			



A tabela 14 demonstra que houve cinco encontros para a simulação do grupo de Heteroligomeros.

Havia uma expectativa ainda maior de encontros, pelo maior quantidade de polipeptídios presentes, mas ocorreram relativamente pouco em comparação com os sistemas AgB81 e AgB82 mesmo assim o menor tempo de simulação desse sistema foi suficiente para demonstrar que os polipeptídios tem alta capacidade de agregação entre seus representantes.

Observamos a formação de dois dímeros e um trimero, sendo este composto por polipeptídios do sistema AgB82 e AgB83, evidenciando o encontro entre sistemas e um do dímeros formado foi por representantes do grupo AgB83 são eles o Agb83_2 com AgB834, por esse motivo as diferenças energéticas elevadas em relações ao grupo AgB81.

Verificamos ainda entre os dímeros do representantes do sistemas AgB81 um encontro **N-Terminal** com **C-Terminal** e entre os representantes do sistema AgB83 **N-Terminal** com **N-Terminal**. Mantendo-se a tendência do sistema AgB81 simulado.

6. Conclusões

Podemos afirmar que os AgBs possuem alta capacidade de interações e que eles também possuem alta capacidade de agregações tendo em vista os estudos feitos.

Sobre os tempos de simulação acreditamos que foram adequados para avaliar as associações, pois para o campo de força MARTINI e a metodologia “Coarse-Graining” não é um grande problema usarmos tempos longo de simulação como já foi explicado.

O tempo de 500ns utilizado na simulação para os sistemas individualmente e os 242300ns em relação ao sistema de Heteroligomeros seria impossível de ser realizado em simulações atomísticas, simulamos menos os sistema Heteroligomeros devido a uma falha que deixou o grupo de química teórico por 3 semanas sem possibilidade de acessar os dados e simular, essa falha de hardware prejudicou o tempo de simulação, mas não os resultados do trabalho. Ainda assim conseguimos observar com clareza a alta capacidade de agregação apresentada pelas subunidades do Antígeno B simuladas.

O sistema AgB81 possui 65 resíduos e apresentou o maior número de associações em tempos relativamente pequenos ao longo da simulação, esse sistema não possui a presença dos seguintes resíduos: Cistina, Asparagina e o Triptofano. O sistema AgB82 possui 70 resíduos e o maior entre os três simulados e possui os três resíduos citados que aparecem no sistema AgB81 e teve um comportamento parecido com o ele em relação a quantidade de agregações, mas não em relação a maneira como se encontraram os polipeptídios como foi demonstrado para o sistema AgB81 tivemos uma grande quantidades de encontros **N-Terminal** com **C-Terminal**. O AgB83 possui 68 resíduos e possui em sua composição o resíduo cisteína, mas não possui Triptofano e Asparagina no entanto não apresentou resultados parecidos em relação ao número de agregação apresentados pelos outros componentes dos grupos durante a simulação, concluímos estudando as distribuições dos resíduos que não temos uma relação coerente entre os

resíduos componentes dos sistemas e número de resíduos constituintes no caso da simulação apresentada. Os três sistemas possuem alguns resíduos em grande quantidade a Lisina, o ácido glutâmico e o Leucina para o caso do AgB81.

Referências

1. Iglésias, J.D.F. *Aspectos médicos das parasitoses humanas*. , Rio de Janeiro Medsi, 1997. 483 p. : il.
2. Carmem, I., Henrique, B. F., Karina, M. M., Mara, R., Laura, K., Hector, H. G., Yessika, V., Cesar, N., Elizabeth, S., Myriam, L., Maria, C. , Jerry, A. L., Gualberto, G., G., *Comparative Analysis of the Diagnostic Performance of Six Major Echinococcus granulosus Antigens Assessed in a Double-Blind, Randomized Multicenter Study*. Journal Of Clinical Microbiology, Juny 2005. **Vol. 43**(No. 6): p. p. 2764–2770.
3. Rey, L., *Parasitologia : parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais*. Vol. 4. ed.: Rio de Janeiro, RJ : Guanabara Koogan, 2008. xiv, [28], 883 p. : il. + 1 CD-ROM
4. Wenbao Zhang, Jun Li, and a.D.P. McManus, *Concepts in Immunology and Diagnosis of Hydatid Disease*. Clinical Microbiology Reviews, Jan. 2003. **Vol. 16, No. 1**: p. p. 18–36.
5. Karina, M. M., Sandra, M.N. S., Marcos, V.A.S. N., Nilson, I.T. Z. , Mateus, B. C. , Nády, P. da S., Paulo, F.B. G., Hubert, K. S., Arnaldo, Z., Henrique, B. F., *Self-assembly and structural characterization of Echinococcus granulosus antigen B recombinant subunit oligomers*. Biochimica et Biophysica Acta, 2007. **1774**: p. 278–285.
6. Karina M. Monteiro, Arnaldo Zaha, and H.B. Ferreira; *Recombinant subunits as tools for the structural and functional characterization of Echinococcus granulosus antigen B*. Experimental Parasitology, 2008. **119**: p. 490–498.
7. Wulamu, M., Yasuhito, S., Minoru, N., Ning, X., Kazuhiro, N., Yuji, I., Hiroshi, Y., Marshall, W. L., Akira, I. , *Recent advances in characterization of Echinococcus antigen B*. Parasitology International, 2005. **55**: p. S57 – S62.
8. Carmen, L., Gustavo, S., Andreina, B., Christer, W., Hellman, U., Gualberto, G. ,Lez-Sapienza, *Echinococcus granulosus antigen 5 is closely related to proteases of the trypsin family*. Biochem. J., 2003. **369**: p. 191-198.
9. University of Washington, *ROSSETA@Home*. [cited 2011 12/08/2011]; Available from: <http://boinc.bakerlab.org/rosetta/>.
10. Luca Monticelli, Luca, M., Senthil, K. K., Xavier, P., Ronald, G. L., Peter, T., Siewert-Jan, M., *The MARTINI Coarse-Grained Force Field: Extension to Proteins*. J. Chem. Theory and Comput, 2008. **4**: p. 819–834.
11. Burkert, U. and N.L. Allinger, *Molecular Mechanics*. American Chemical Society, Washington, 1982. **ACS Monograph no 177**.
12. Nevins, N., K. Chen, and Allinger, N. L. J. Comput. Chem., 1996. **17**(669).
13. Weiner, S. J., Kollman, P. A., Case, D. A., Singh, U. C., Ghio, C., Alagona, G., Profeta, S., Weiner, P. J., Am. Chem. Soc., 1984. **106**(765).
14. Leach, A.R., *Molecular Modelling, Principles and Applications*. Longman.
15. Allen; M.P. and D.J. Tildesley; *Computer Simulation of Liquids*. Clarendon Press, 1987.
16. Van Der Spoel, D., , Berendsen, H. J. J. Comput. Chem., 2005. **26**(1701).
17. Ponder, J.W., *Tinker – Software Tools for Molecular Design*. 2004.
18. Marrink, S. J., Risselada, H. J., Yefimov, S., Tieleman, D. P., de Vries, A. H., *The MARTINI forcefield: coarse grained model for biomolecular simulations*. J. Phys. Chem., 2007. **111**, **7812–7824**.

19. Tozzini, V. and J.A. McCammon, *A coarse grained model for the dynamics of flap opening in HIV-1 protease*. Chem. Phys. Lett., 2005. **413 (1-3), 123-128**.
20. Venturoli, M., Sperotto, M. M., Kranenburg, M., Smit, B., *Mesoscopic models of biological membranes*. Phys. Rep., 2006. **437 (1-2), 1-54**.
21. Sperotto, M.M., S. May, and Baumgaertner, A. *Modelling of proteins in membranes*. Chem. Phys. Lipids, 2006. **141 (1-2), 2-29**.
22. Shillcock, J.C. and R. Lipowsky, *The computational route from bilayer membranes to vesicle fusion*. J. Phys.: Condens. Matter, 2006. **18, S1191-S1219**.
23. Müller, M., K. Katsov, and M. Schick, *Biological and synthetic membranes: What can be learned from a coarse-grained description*. Phys. Rep., 2006. **434, 113-176**.
24. Venturoli, M., B. Smit, and M.M. Sperotto, *Simulation studies of protein-induced bilayer deformations, and lipid-induced protein tilting, on a mesoscopic model for lipid bilayers with embedded proteins*. Biophys. J., 2005. **88 (3), 1778-98**.
25. Smeijers, A. F., Pieterse, K., Markvoort, A. J., Hilbers, P. A. J. , *Coarse-grained transmembrane proteins: Hydrophobic matching, aggregation, and their effect on fusion*. J. Phys. Chem. Biophys. J., 2006. **110 (27), 13614-13623**.
26. Shi, Q., S. Izvekov, and G.A. Voth, *Mixed atomistic and coarsegrained molecular dynamics: Simulation of a membrane-bound ion channel*. J. Phys. Chem. Biophys. J., 2006. **110 (31), 15045-15048**.
27. Neri, M., Anselmi, C., Cascella, M., Maritan, A., Carloni, P., *Coarse-grained model of proteins incorporating atomistic detail of the active site*. Phys. Rev. Lett., 2005. **95 (21)**.
28. Heath, A.P., L.E. Kavraki, and C. Clementi, *From coarse-grain to all-atom: Toward multiscale analysis of protein landscapes*. Proteins, 2007. **68 (3), 646-661**.
29. Marrink, S.J., A.H. de Vries, and A.E. Mark, *Coarse grained model for semiquantitative lipid simulations*. s. J. Phys. Chem. Biophys. J., 2004. **108 (2), 750-760**.
30. Marrink, S.J. and A.E. Mark, *Molecular dynamics simulation of the formation, structure, and dynamics of small phospholipid vesicles*. J. Am. Chem. Soc., 2003. **125 (49), 15233-15242**.
31. Marrink, S.J. and A.E. Mark, *Molecular view of hexagonal phase formation in phospholipid membranes*. Biophys. J., 2004. **87(6), 3894-3900**.
32. Faller, R. and S.J. Marrink, *Simulation of domain formation in DLPC-DSPC mixed bilayers*. Langmuir, 2004. **20 (18), 7686-7693**.
33. University of Groningen; *GROMACS*. 2011; fevereiro 06/07/2011]; Available from: <http://www.gromacs.org/>.
34. Nelson, D.L., *Princípios de bioquímica de Lehninger*, ed. x. 5. ed. Porto Alegre : Artmed, 1273 p. : il.
35. Stryer, L., *bioquímica*. 4. ed. ed. 1996, Rio de Janeiro : Guanabara Koogan. 1000 p. : il. .
36. Nosé, S. Mol. Phys., 1984. **52**: p. 522.
37. Parrinello, M. and A. Rahman, J. Appl. Phys., 1981. **52**: p. 7182.