

## ESTUDOS ESTRUTURAIS DE CASOCIDINA-I E SEUS ANÁLOGOS – UMA ABORDAGEM COMPUTACIONAL

**GIOTTO, Thierry Pueblo Freitas<sup>1</sup>; DYSZY, Fábio Henrique<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Estudante de Iniciação Científica – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Câmpus Rio Verde/GO. [thierrypueblo@hotmail.com](mailto:thierrypueblo@hotmail.com); <sup>2</sup> Orientador – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Câmpus Rio Verde/GO. [fabio.dyszy@ifgoiano.edu.br](mailto:fabio.dyszy@ifgoiano.edu.br)

**RESUMO:** Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) podem exibir atividade contra bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas, fungos, protozoários, vírus e as próprias células de mamíferos, sejam elas tumorais ou não, o que os torna alvo de desenvolvimento de possíveis drogas terapêuticas. Para o estudo da função de PAMs, é crucial entender a estrutura destas biomoléculas. Para tanto, a área de bioinformática e dinâmica molecular vem acrescentando muito conhecimento à área. Neste trabalho, fizemos a análise da estrutura do peptídeo antimicrobiano casocidina-I, um PAM derivado da  $\alpha_{S2}$ -caseína do leite bovino, e de seus fragmentos. Foram utilizadas ferramentas disponibilizadas pelos sítios The Antimicrobial Peptide Database e PEP-FOLD, onde pudemos verificar que o efeito hidrofóbico não é o efeito preponderante para a interação peptídeo-membrana. Além disso, pudemos verificar que o peptídeo casocidina-I e seus fragmentos apresentam alta propensão a adotar uma estrutura secundária  $\alpha$ -helicoidal.

**Palavras-chave:** Peptídeos Antimicrobianos. Membranas lipídicas. Interação peptídeo-membrana.

### INTRODUÇÃO

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) são peptídeos que apresentam atividade contra bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas, fungos, protozoários, vírus e as próprias células de mamíferos, sejam elas tumorais ou não, o que os torna alvo de desenvolvimento de possíveis drogas terapêuticas (REDDY *et al.*, 2004). Existem diferentes mecanismos de ação descritos para PAMs, sendo que na maior parte deles a interação com a bicamada lipídica é um evento crucial para que o PAM possa exercer sua função. Assim sendo, a membrana plasmática é o principal alvo dos PAMs, sendo que estes podem formar poros na membrana, permitindo o extravasamento do conteúdo intracelular (JENSSEN *et al.*, 2006). A casocidina-I é um peptídeo de 39 aminoácidos derivado da caseína- $\alpha_{S2}$ , proteína abundante no leite bovino, que apresenta atividade antimicrobiana (ZUCHT *et al.*, 1995). Entretanto, não há dados estruturais nem sobre seu mecanismo de ação. A bioinformática tem contribuído de forma decisiva no que se refere aos estudos sobre os mecanismos de ação de PAMs. Este trabalho teve por objetivo caracterizar o peptídeo casocidina utilizando principalmente duas ferramentas de bioinformática de acesso livre, The Antimicrobial Peptide Database (APD) e o PEP-FOLD.

### MATERIAL E MÉTODOS

Foram escolhidos o peptídeo casocidina-I e seus fragmentos derivados (tabela I).

**Tabela I – Estrutura primária da casocidina-I e de seus fragmentos.**

Peptídeo	Estrutura Primária
Casocidina-I	KTKLTEEEKNRLNFKKISQRYQKFALPQYLKTVYQHQQ
Casocidina-I com N-terminal truncado	LTEEEKNRLNFKKISQRYQKFALPQYLKTVYQHQQ
Casocidina-I com C-terminal truncado	KTKLTEEEKNRLNFKKISQRYQKFALPQYLKTVYQ
Hélice N-terminal	KTKLTEEEKNRLNFKKISQRY
Hélice N-terminal + loop	KTKLTEEEKNRLNFKKISQRYQKFA
Hélice C-terminal	LPQYLKTVYQHQQ
Hélice C-terminal + loop	YQKFALPQYLKTVYQHQQ

Para as análises, o APD permitiu a busca do PAM em estudo, uma vez que o banco de dados permite também a busca de peptídeos quimicamente modificados e os alvos moleculares destas biomoléculas (WANG *et al.*, 2009). A ferramenta PEP-FOLD possibilita prever a estrutura secundária de um peptídeo a partir das informações de uma estrutura primária (THEVENET *et al.*, 2012).

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

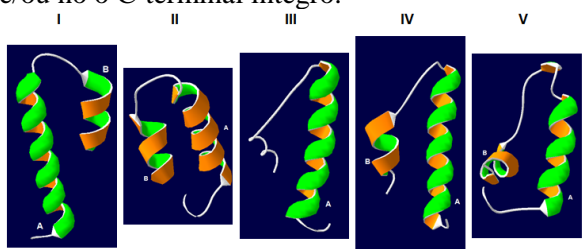
Utilizando-se o APD, foram calculados diferentes parâmetros, mostrados na tabela II.

**Tabela II – Resultados da determinação do grau de hidrofobicidade e carga de casocidina I e seus fragmentos.**

Peptídeo	% de aminoácidos apolares	$\Delta G$ de transferência $H_2O \rightarrow$ POPC (kcal/mol)	Carga (pH 7,0)
Casocidina-I	25	12,56	+ 7
Casocidina-I com N-terminal truncado	27	10,44	+ 5
Casocidina-I com C-terminal truncado	27	10,82	+ 6
Hélice N-terminal	22	10,40	+ 4
Hélice N-terminal + loop	26	11,01	+ 5
Hélice C-terminal	23	1,55	+ 2
Hélice C-terminal + loop	27	1,22	+ 3

Apesar da variação de energia livre ser positiva, sabe-se, a partir de dados da literatura, que levar em conta apenas eventos como o efeito hidrofóbico para determinar a partição de uma molécula em uma membrana pode levar a erros, uma vez que não estão sendo levados em conta eventos como formação de ligações eletrostáticas entre a molécula e a membrana, nem a formação de ligações de hidrogênio intramoleculares (BEN-TAL *et al.*, 1996). Em estudos mais recentes, sabe-se que a superfície da membrana possui propriedades físico-químicas diferentes da solução aquosa como um todo, e esse fato é decisivo para a interação peptídeo-membrana, sendo observado também para interações proteína-membrana (DYSZY *et al.*, 2013). Além disso, a simulação trabalha com um lipídeo zwitteriônico, não refletindo a condição ideal para a interação peptídeo-membrana.

Os resultados acima mostram que a porção C-terminal do peptídeo possui melhores chances para interagir com membranas, devido a sua menor energia livre de transferência. Após as análises com o APD, usou-se o PEP-FOLD para prever a estrutura secundária do peptídeo. Após análise, o banco de dados do PEP-FOLD mostra como resultado cinco estruturas secundárias mais estáveis para cada fragmento. As estruturas secundárias foram salvas em formato PDB para serem manipuladas posteriormente. Como o programa simula peptídeos com 36 aminoácidos, e a casocidina-I possui 39 resíduos, fez-se análises com o N-terminal e C-terminal truncado. Com a região C-terminal truncada (figura 1), uma das hélices aparenta ser mais instável quando comparadas as hélices presentes no N-terminal e/ou no C-terminal íntegro.



**Figura 1 – As cinco conformações de menor energia do peptídeo casocidina-I com o C-terminal truncado.**

Estudos mostram que a bicamada lipídica possui espessura de cerca de 30 Å (SMITH, 2012). Foi usado o programa PDB Viewer para se medir o comprimento das hélices, e observou-se que nem todas as  $\alpha$ -hélices apresentam esse comprimento. No entanto, esse requisito não é primordial para a ação de um PAM, uma vez que já foram descritos peptídeos menores que 30 Å

que permeabilizam a membrana (KELKAR *et al.*, 2007).

## CONCLUSÃO

Analisando os resultados dos programas de simulação, pode-se dizer que a casocidina-I apresenta alta tendência a formar  $\alpha$ -hélices e sua forma truncada pode alterar a estabilidade do peptídeo. Os cálculos realizados mostram também que o efeito hidrofóbico não é a principal força que governa a interação do peptídeo com a membrana, sendo que forças eletrostáticas bem como efeitos de adoção de estrutura secundária tem um importante papel nessa interação.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao IFGoiano, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro e institucional.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEN-TAL, N.; BEN-SHAUL, A.; NICHOLLS, A.; HONIG, B. (1996) Free-energy determinants of alpha-helix insertion into lipid bilayers. **Biophys J** v. 70, p. 1803-1812, 1996.
- DYSZY, F.; PINTO, A. P. A.; ARAÚJO, A. P. U.; COSTA-FILHO, A. J. Probing the Interaction of Brain Fatty Acid Binding Protein (B-FABP) with Model Membranes. **PLoS One** v. 8, p. e60198, 2013.
- JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. Peptide antimicrobial agents. **Clin Microbiol Rev** v. 19, p. 491-511, 2006.
- KELKAR, D. A.; CHATTOPADHYAY, A. The gramicidin ion channel. **Biochim Biophys Acta** v. 1768, p. 2011-2025, 2007.
- REDDY, K. V.; YEDERY, R. D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. **Int J Antimicrob Agents** v. 24, p. 536-547, 2004.
- SMITH, A. W. Lipid-protein interactions in biological membranes: a dynamic perspective. **Biochim Biophys Acta** v. 1818, p. 172-177, 2012.
- THEVENET, P.; SHEN, Y.; MAUPETIT, J.; GUYON, F.; DERREUMAUX, P. PEP-FOLD: an updated de novo structure prediction server for both linear and disulfide bonded cyclic peptides. **Nucleic Acids Res** v. 40, p. W288-W293, 2012.
- WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. **Nucleic Acids Res** v. 37, p. D933-D937, 2009.
- ZUCHT, H. D.; RAID, M.; ADERMANN, K.; MÄGERT, H. J.; FORSSMANN, W. G. (1995) Casocidin-I: a casein-alphaS2 derived peptide exhibits antibacterial activity. **FEBS Lett** v. 372, p. 185-188, 1995.