

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

BIANCA VILLAVICENCIO

**BIOINFORMÁTICA ESTRUTURAL
APLICADA AO ESTUDO DE PEPTÍDEOS DE
INTERESSE FARMACOLÓGICO E
BIOTECNOLÓGICO**

Porto Alegre

2020

BIANCA VILLAVICENCIO

**BIOINFORMÁTICA ESTRUTURAL
APLICADA AO ESTUDO DE PEPTÍDEOS DE
INTERESSE FARMACOLÓGICO E
BIOTECNOLÓGICO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutora em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Hugo Verli

Porto Alegre

2020

CIP - Catalogação na Publicação

Villavicencio, Bianca
Bioinformática Estrutural Aplicada ao Estudo de
Peptídeos de Interesse Farmacológico e Biotecnológico
/ Bianca Villavicencio. -- 2020.
97 f.
Orientador: Hugo Verli.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Centro de Biotecnologia do Estado do
Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular, Porto Alegre, BR-RS,
2020.

1. Bioinformática Estrutural. 2. Peptídeos. 3.
Dinâmica Molecular. 4. Peptídeos Bioativos. 5.
Glicocinas. I. Verli, Hugo, orient. II. Título.

Dedicatória

Esta tese é dedicada a todas as pessoas (especialmente as que fazem parte de minorias) que lutam para tornar o mundo (e o meio acadêmico) mais diverso e empático.

Agradecimentos

À minha família, pelo suporte e compreensão durante toda essa trajetória.

Ao meu orientador Hugo Verli, agradeço a oportunidade do doutorado, e pela paciência de lidar com o meu processo de aprendizado por vezes tortuoso.

Aos membros da banca pela disponibilidade e pelo conhecimento agregado aos trabalhos aqui presentes.

Ao saudoso Old GBE pela parceria, motivação e inspiração. Foi com vocês que eu aprendi que um laboratório pode ser um ambiente de aprendizado, diversão, criatividade, inspiração e suporte muito poderoso. Carla, Conrado, Elisa, Fábio, Felipe, Juliano, Marcelo, Pablo e Rodrigo, vocês tiveram (e continuam tendo) um impacto imensurável na minha vida pessoal e profissional, e vocês me fazem acreditar que o meio acadêmico pode ser um ambiente colaborativo, construtivo e gentil. Eu poderia escrever uma tese pra cada um de vocês, mas acho que basta dizer que eu sempre vou lembrar das nossas tardes no lab.

Ao New GBE, que tanto me ajuda e dá suporte. Eu adorei nossa convivência, nossas conversas sobre todo o tipo de coisa, e o ambiente colaborativo que vocês mantêm. Ana Paula, Brisa, Crisciele, Jota, Laís: muita força pra vocês!

À UBTEC, que me viu tantas vezes durante esses anos que me deu o prêmio de Melhores Aparições de 2019! Em especial, Andrea, Fábio, Gabriela, Meiski e Rodrigo: obrigada pelas risadas, jogatinas e caféina! Poder conversar com vocês sobre evolução e besteiras sempre me deu novas perspectivas sobre o mundo.

Aos compadres Caroline e Fred, e ao meu cientista preferido Niko: sem a força de vocês eu não teria conseguido chegar aqui. Vocês sempre estiveram presentes e dispostos a me lembrar (com muito amor) que a minha visão de mim mesma é bem enviesada.

À Alexandra Elbakyan e a todos que contribuem para uma ciência livre e colaborativa.

A todos os que não foram citados nominalmente, mas que tiveram influência na minha vida pessoal e profissional.

Resumo

O estudo de sistemas moleculares através de metodologias computacionais tem ganhado destaque no meio científico. Em particular, a busca do entendimento da estrutura e dinâmica de peptídeos mostra-se promissor, pois, apesar de serem tradicionalmente considerados sistemas de baixa estabilidade conformacional, suas características os tornam moléculas com um grande potencial biotecnológico e terapêutico. Dentre as modificações que podem ser feitas para interferir na manutenção estrutural de peptídeos estão a adição de restritores conformacionais, como grampos olefínicos, e a adição de açúcares, como a S-glicosilação. Neste trabalho, investigou-se o impacto dessas modificações em peptídeos através de simulações por dinâmica molecular. O tratamento de peptídeos grampeados por diferentes campos de força mostrou que o campo de força GROMOS54A7 apresentou melhor desempenho, mas ainda não reproduz na totalidade os efeitos observados experimentalmente. As simulações de peptídeos antimicrobianos S-glicosilados indicam que essa modificação incomum tem um impacto na flexibilidade do peptídeo, o que pode ter um impacto direto em sua atividade. Nos dois casos, seja com grampos olefínicos, seja com S-glicosilação, é possível antecipar o efeito conformacional dessas modificações em peptídeos. A obtenção de informações estruturais *in silico* permite a redução de custos associados ao desenvolvimento de peptídeos modificados e contribui para a possível modulação de processos biológicos de forma controlada e eficiente.

Abstract

The study of molecular systems through computational methodologies has been gathering attention in the scientific community. The search for understanding the structure and dynamics of peptides is particularly promising, in spite of being traditionally considered systems with low conformational stability, because of their great biotechnological and therapeutic potential. Among the changes that can be made in order to allow the structural maintenance of the peptides, are the addition of restrictors, such as olefinic staples, and the addition of sugars, such as an S-glycosylation. In this work, we investigate the impact of these peptide modifications through simulations. The description of stapled peptide dynamics by different force fields showed that the GROMOS54A7 force field performed better than others, but it still does not reproduce the effects observed experimentally. Simulations of antimicrobial peptides show a significant impact of S-glycosylation on their flexibility, which can directly impact its activity. In both cases, either with all-hydrocarbon staples or with glycosylation, it is possible to anticipate the effect of these changes on their peptides. Obtaining structural information *in silico* allows the reduction of costs associated with the development of modified peptides, and contributes to the possible modulation of biological processes in a controlled and efficient way.

Lista de ilustrações

- Figura 1 – Representação do dogma central da biologia molecular. Tradicionalmente, a informação é armazenada no DNA, que tem capacidade de replicação. O fluxo de informação é expresso através da transcrição de DNA em RNA, que é traduzido em proteína, que poderá efetuar a função biológica. Adicionalmente, os processos de enovelamento, glicosilação e de reconhecimento molecular são acrescentados, devido ao seu caráter fundamental para a manifestação da função gênica. Adaptado de (VERLI, 2014). 15
- Figura 2 – Ilustração do funil energético de enovelamento de um peptídeo. A estrutura do peptídeo presente no mínimo energético à esquerda corresponde a sua conformação nativa, enquanto o peptídeo à direita está cineticamente preso em um mínimo local. Reproduzido de <http://portfolio.scistyle.com/filter/journal-cover/Protein-Folding-Funnel>. Baseado em (C VANDEN-EIJNDEN E, 2009). 16
- Figura 3 – Superfície de energia livre de uma proteína. O tempo para a conversão da proteína para um estado mais energeticamente favorável é proporcional à altura da barreira. Reproduzido de (GÖBL; TJANDRA, 2012). 17
- Figura 4 – Estruturas tridimensionais de biomoléculas obtidas por A) cristalografia de raios-X (RNA Polimerase II (PDB ID 1I6H)); B) ressonância magnética nuclear (Príon na sua forma amilóide (PDB ID 2RMN)), e C) criomicroscopia eletrônica (Zika Virus (PDB ID 5IRE)). Reproduzido de (ARANTES, 2018). 18
- Figura 5 – Esquema do mecanismo de ação de AMPs disruptores de membrana. Um peptídeo policatiônico é simulado por 100 ns com DM, interagindo com a membrana e alterando-a. Adaptado de (FJELL *et al.*, 2012). 23
- Figura 6 – Estrutura de glicocinas. Sequência primária, esquema da estrutura secundária, e estrutura tridimensional determinada por RMN. S-glicosilações em amarelo; O-glicosilações em roxo; pontes dissulfeto em laranja. 24
- Figura 7 – Representação esquemática do processo de desenho de fármacos auxiliado por computador. A abordagem gera depende das informações estruturais disponíveis de alvo e/ou ligantes. A partir disso, ocorre a identificação, refinamento, e otimização de compostos para obter potenciais candidatos a fármacos. Adaptado de (LEELANANDA; LINDERT, 2016). 27
- Figura 8 – Esquema dos parâmetros que descrevem a forma funcional de um campo de força. Adaptado de (VERLI, 2014). 31
- Figura 9 – Diferentes abordagens de representação de átomos em campos de força. Reproduzido de (VERLI, 2014). 32

| | |
|--|----|
| Figura 10 – (A) Representação das condições periódicas de contorno em uma simulação e do (B) efeito de diferentes tempos de integração na amostragem da DM. Adaptado de (VERLI, 2014). | 33 |
| Figura 11 – Perfil de CD de algumas estruturas secundárias. Reproduzido de (VERLI, 2014). | 39 |

Lista de abreviaturas e siglas

| | |
|---------|--|
| AA | <i>all-atom</i> |
| AMP | Peptídeo Antimicrobiano |
| CADD | Desenho de Fármacos Auxiliado por Computador |
| CASP | Avaliação Crítica da Predição da Estrutura de Proteínas |
| CD | Dicroísmo Circular |
| CG | <i>coarse-grained</i> |
| Crio-EM | Criomicroscopia Eletrônica |
| DM | Dinâmica Molecular |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| DSSP | Dicionário de Estrutura Secundária de Proteínas |
| FEL | Superfície de Energia Livre |
| Glc | Glicose |
| GlcNAc | N-acetil Glicosamina |
| LAB | Bactérias do Ácido Lático |
| MM | Mecânica Molecular |
| MRSA | <i>Staphylococcus aureus</i> Resistente à Meticilina |
| PPI | Interações Proteína-Proteína |
| QM | Mecânica Quântica |
| OGA | O N-acetil Glicosamina hidrolase |
| RMN | Ressonância Magnética Nuclear |
| RMSD | Desvio Quadrático Médio (<i>Root Mean Square Deviation</i>) |
| RMSF | Flutuação Quadrática Média (<i>Root Mean Square Fluctuation</i>) |
| RNA | Ácido Ribonucleico |
| UA | <i>united-atom</i> |

Sumário

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 12 |
| 1.1 | Estrutura de biomoléculas | 12 |
| 1.2 | Um breve histórico da Biologia Estrutural | 13 |
| 1.3 | Métodos de resolução de estrutura de proteínas | 17 |
| 1.4 | Engenharia de Peptídeos | 20 |
| 1.5 | Bioinformática Estrutural Aplicada ao Estudo de Biomoléculas | 25 |
| 1.5.1 | Desenho de fármacos auxiliado por computador | 25 |
| 1.5.2 | Abordagens Metodológicas | 26 |
| 1.5.2.1 | Modelagem Molecular | 27 |
| 1.5.2.2 | Atracamento Molecular | 29 |
| 1.5.2.3 | Dinâmica Molecular | 29 |
| 2 | OBJETIVOS | 34 |
| 2.1 | Objetivo Geral | 34 |
| 2.2 | Objetivos Específicos | 34 |
| 3 | METODOLOGIA | 35 |
| 3.1 | Sistemas estudados | 35 |
| 3.2 | Programas utilizados | 35 |
| 3.3 | Modelagem comparativa | 35 |
| 3.4 | Dinâmica molecular | 36 |
| 3.4.1 | Construção de topologias | 36 |
| 3.4.2 | Análises | 37 |
| 4 | RESULTADOS | 40 |
| 4.1 | Capítulo I: Descrição computacional de peptídeos grampeados | 40 |
| 4.1.1 | Preâmbulo | 40 |
| 4.2 | Capítulo II: Aspectos estruturais de glicocinas | 50 |
| 4.2.1 | Preâmbulo | 50 |
| 5 | DISCUSSÃO GERAL | 69 |
| 5.1 | Campos de Força utilizados | 69 |
| 5.2 | Efeito das modificações | 71 |
| 5.3 | Simulação de peptídeos por DM | 72 |
| 6 | CONCLUSÕES | 74 |

| | | |
|----|---------------------------|----|
| 7 | PERSPECTIVAS | 75 |
| 8 | REFERÊNCIAS | 76 |
| 9 | APÊNDICES | 85 |
| 10 | CURRICULUM VITÆ | 94 |

1 Introdução

1.1 Estrutura de biomoléculas

Desde seus primórdios, a espécie humana busca entender o ambiente ao seu redor e utilizá-lo na resolução de problemas. Inicialmente através da tentativa e erro, o uso e a modificação de organismos para servir a um propósito foi sendo aprimorado a partir da soma dos conhecimentos passados. Ações como a ingestão de determinadas plantas para tratar doenças e ferimentos (JÚNIOR; ALBUQUERQUE, 2018), ou o cruzamento de indivíduos com alguma característica desejável (GUPTA, 2004), tiveram um grande impacto na qualidade de vida humana.

Especialmente a partir do século XX, uma série de revoluções científicas impulsionaram o rápido desenvolvimento das ciências biológicas, impactando profundamente nossa relação com o ambiente, e, portanto, nossa capacidade de modifica-lo. Essas revoluções incluem a descoberta dos antibióticos (FLEMING, 1929), e da estrutura de moléculas biológicas como o DNA (WATSON; CRICK *et al.*, 1953) e proteínas (PERUTZ *et al.*, 1960). Embora seja impossível mensurar o impacto dessas revoluções na ciência, ele pode ser visto em áreas de pesquisa como a microbiologia, que estuda a estrutura, função, e classificação de microorganismos; a biologia molecular, que estuda as estruturas e processos biológicos que envolvem moléculas como DNA ou proteínas; e a engenharia de moléculas, que busca desenhar e testar propriedades moleculares.

Conforme a sociedade se desenvolve e cria novas necessidades, a ciência tem novos desafios para abordar. Por isso, busca-se explorar o repositório da natureza para investigar problemas, encontrar soluções ou inspirações, e utilizá-las para implementar tecnologias para a humanidade. (HEBERLÉ; AZEVEDO, 2011) Para isso, é necessário ter informações disponíveis sobre como esses processos biológicos ocorrem, quais os componentes envolvidos, as condições necessárias para replicar essa ocorrência, e se estas variáveis podem ser modificadas. A investigação científica da estrutura de biomoléculas nos fornece evidências para tentar responder esses questionamentos, auxiliando no entendimento de suas funções, e portanto permitindo a modulação dos processos biológicos nos quais estão envolvidas.

1.2 Um breve histórico da Biologia Estrutural

Assim como a de qualquer molécula, a estrutura de proteínas não é estática, e sim possui movimentos decorrentes das interações entre seus átomos componentes, além de com o meio no qual ela está inserida. Essa flexibilidade pode estar diretamente associada à interação com seu alvo biológico (que também é flexível), e portanto à sua função. O conjunto dessas conformações biologicamente relevantes, de baixa energia livre, e no meio em que a molécula exerce suas funções, é denominado “estado nativo” (VERLI, 2014).

As bases da biologia estrutural foram estabelecidas na década de 1950 com uma série de experimentos que revelaram que a sequência de aminoácidos determina a conformação proteica, e portanto sua função (STRASSER; CHADAREVIAN, 2011). Em 1949, L. Pauling demonstrou que a anemia falciforme era associada a uma mudança física na estrutura da hemoglobina, possivelmente por uma mudança na composição de sua sequência de aminoácidos (ITANO; PAULING, 1949). Essa diferença foi atribuída à mudança de apenas um resíduo de aminoácido em 1957 por V. M. Ingram (INGRAM *et al.*, 1957). A relação entre a sequência e função foi refinada por C. Anfinsen em seu trabalho com a enzima ribonuclease, que lhe rendeu o Prêmio Nobel de Química em 1972. Quando em condições desnaturantes, ao ser incubada com ureia e beta-mercaptoetanol, a ribonuclease perdeu totalmente sua atividade catalítica - dessa forma, descobriu-se a relação entre a conformação nativa de uma proteína e sua função. Em seguida, através de um processo de diálise, notou-se que a ribonuclease readquiria sua atividade aos poucos, deduzindo-se a reaquisição da forma cataliticamente ativa. De tais experimentos decorre-se o postulado de Anfinsen, ou hipótese termodinâmica, em que a informação necessária para a formação da estrutura tridimensional nativa da proteína está contida em sua sequência. (ANFINSSEN, 1973) Assim, a estrutura nativa deve ser aquela cuja conformação seja a de menor energia livre (única), que é resistente a pequenas mudanças no ambiente (estável), e que seja possível chegar no estado enovelado a partir de desenovelados em um período de tempo biológico (cineticamente acessível) (VERLI, 2014).

A energia utilizada por sistemas biológicos, como células e proteínas, em reações bioquímicas, como é o caso do enovelamento, provém de trocas energéticas com o seu entorno. Essas trocas podem ser descritas por três unidades termodinâmicas:

- Entalpia (H), que descreve a quantidade de calor de um sistema, que depende do conteúdo, tipo, e quantidade de ligações químicas dos reagentes e produtos de uma reação. A variação de entalpia ΔH indica quanto calor é transferido em pressão constante. Valores positivos de ΔH indicam absorção de calor; valores negativos indicam que o sistema perdeu calor para o ambiente.

- Entropia (S), que é uma medida de desordem do sistema. Valores elevados indicam um arranjo desordenado, e valores baixos denotam ordem, de forma que a mudança de entropia mede a dispersão de energia em um processo.
- Energia de Gibbs (G), que descreve a quantidade de energia disponível para promover trabalho em um sistema. É uma função da entalpia e entropia:

$$G = H - TS$$

Em temperatura e pressão constantes, a diferença de energia livre é:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

A energia livre de Gibbs de um sistema depende, portanto, do arranjo espacial de suas moléculas, bem como de sua composição e interações químicas. Dessa forma, uma molécula biológica ocupa diferentes conformações em equilíbrio químico de acordo com sua energia livre de Gibbs, pois suas conformações variam em tipos e quantidades de interações intra- e intermoleculares, além de interagirem com o solvente no qual estão inseridas em diferentes arranjos espaciais. Assim, proteínas e outras biomoléculas possuem diferentes estados conformacionais em equilíbrio químico de acordo com sua energia livre de Gibbs (GARRETT; GRISHAM, 2016).

Porém, algumas questões relativas ao enovelamento proteico se contrapõem ao postulado de Anfinsen. Nem toda proteína é capaz de readquirir sua estrutura nativa, acabando por se agregar inespecificamente a outras cadeias polipeptídicas (ZETTLMEISSL; RUDOLPH; JAENICKE, 1979). Portanto, embora a termodinâmica determine o enovelamento, é necessário considerar a cinética e as interações intermoleculares inespecíficas entre proteínas *in vivo*. A ação de chaperonas moleculares, que são proteínas que auxiliam outras proteínas a se enovelar em sua estrutura nativa, parece ocorrer de forma passiva, criando um microambiente para proteger seu alvo de agregação, e não por atuar ativamente no enovelamento (ELLIS, 2001; DAHIYA; BUCHNER, 2019).

Com base nesses estudos, construiu-se a ideia do dogma central da biologia molecular, que explica como a informação guardada no material genético na forma de ácido desoxirribonucleico (DNA) ou ribonucleico (RNA) é passada adiante e traduzida em proteínas, que serão as efetoras de grande parte dos processos biológicos (Figura 1). Adicionalmente, tal esquema pode ser complementado com modificações co- ou pós-traducionais, tais como glicosilação, fosforilação, e adição de cauda poli-A (VERLI, 2014; ALBERTS *et al.*, 2015).

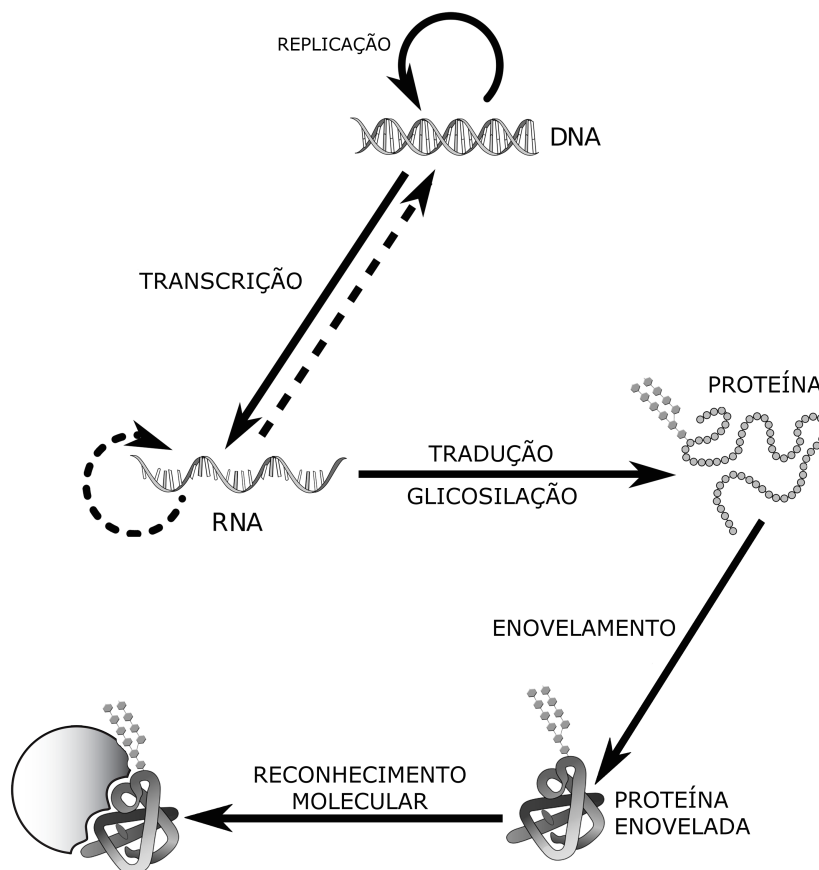


Figura 1 – Representação do dogma central da biologia molecular. Tradicionalmente, a informação é armazenada no DNA, que tem capacidade de replicação. O fluxo de informação é expresso através da transcrição de DNA em RNA, que é traduzido em proteína, que poderá efetuar a função biológica. Adicionalmente, os processos de enovelamento, glicosilação e de reconhecimento molecular são acrescentados, devido ao seu caráter fundamental para a manifestação da função gênica. Adaptado de (VERLI, 2014).

No entanto, se considerarmos que proteínas possuem muitas ligações rotacionáveis, para que estas possam explorar todas as conformações possíveis será necessário um tempo astronômico. Esse exercício de pensamento é conhecido como o paradoxo de Levinthal, e mostra o quão complexo é o processo de enovelamento. Entretanto, o enovelamento proteico ocorre com mais facilidade do que isso, com pequenas proteínas se enovelando em pequenas escalas de tempo. O próprio Levinthal, quando propôs seu paradoxo, já retornou a solução: o processo de enovelamento é acelerado e guiado pela rápida formação de interações locais, que por sua vez determinam o enovelamento a seguir; isso sugere que resíduos de aminoácidos formam interações estáveis com seus vizinhos, servindo de pontos de nucleação de estrutura secundária. (ROOMAN *et al.*, 2002) Na célula, o enovelamento de uma proteína ocorre em meio aquoso. Quando a cadeia polipeptídica nascente sai do ribossomo, seus átomos interagem com moléculas de água, formando ligações de hidrogênio. Aminoácidos hidrofóbicos, no entanto, tenderão a se agrupar e a se “esconder” no interior da proteína, deixando os aminoácidos hidrofílicos expostos - o chamado efeito hidrofóbico. No interior apolar e no exterior polar da

proteína, se formam ligações covalentes (pontes dissulfeto), ligações de hidrogênio, e interações de van der Waals, que atuam juntas na manutenção da sua estrutura. Para a formação dessas interações, é necessário que haja a quebra da interação dos aminoácidos com o solvente, indo em direção a um estado de menor entropia (VERLI, 2014; BELLISSENT-FUNEL *et al.*, 2016). Adicionalmente, o trabalho de H. Frauenfelder em 1979 com a mioglobina em diferentes temperaturas e concentrações de ligantes observou múltiplas barreiras energéticas, levando ao desenvolvimento de um modelo da superfície de energia (FRAUENFELDER; PETSKO; TSERNOGLOU, 1979). Atualmente, considera-se que a superfície energética do enovelamento de proteínas (e a manutenção de sua estrutura) assemelha-se a um funil, onde a conformação nativa ocupa o mínimo energético global (Figura 2) (LEOPOLD; MONTAL; ONUCHIC, 1992). Essa superfície é ocupada pelos diferentes estados conformacionais com variações em sua energia livre. A interconversão entre esses estados requer o vencimento de barreiras energéticas, o que pode levar um tempo proporcional à altura da barreira (Figura 3).

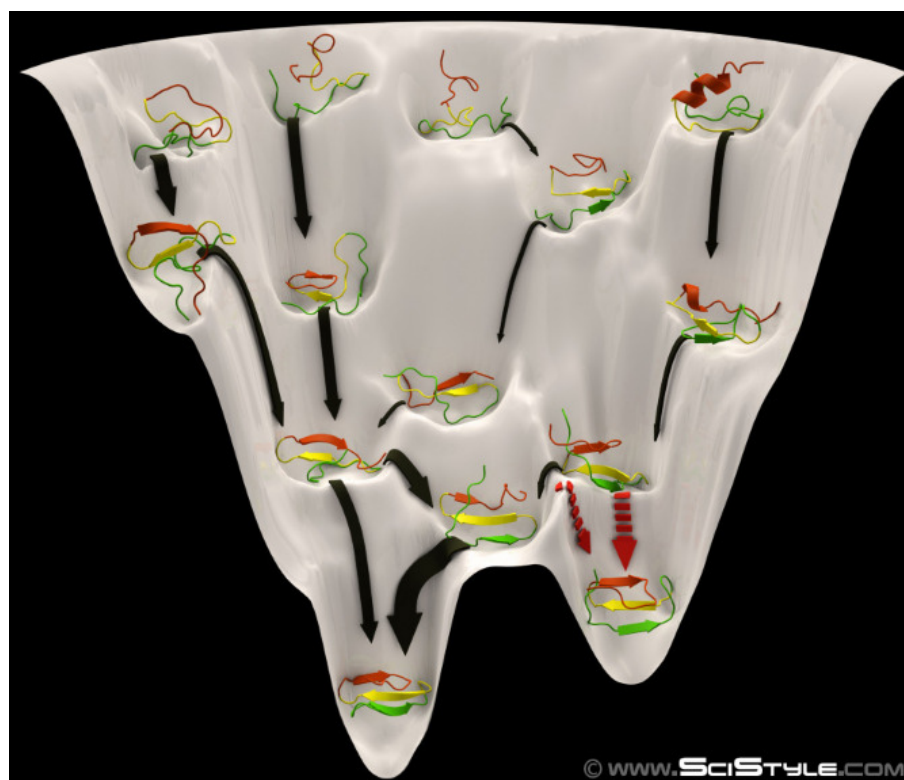


Figura 2 – Ilustração do funil energético de enovelamento de um peptídeo. A estrutura do peptídeo presente no mínimo energético à esquerda corresponde a sua conformação nativa, enquanto o peptídeo à direita está cineticamente preso em um mínimo local. Reproduzido de <http://portfolio.scistyle.com/filter/journal-cover/Protein-Folding-Funnel>. Baseado em (C VANDEN-EIJNDEN E, 2009).

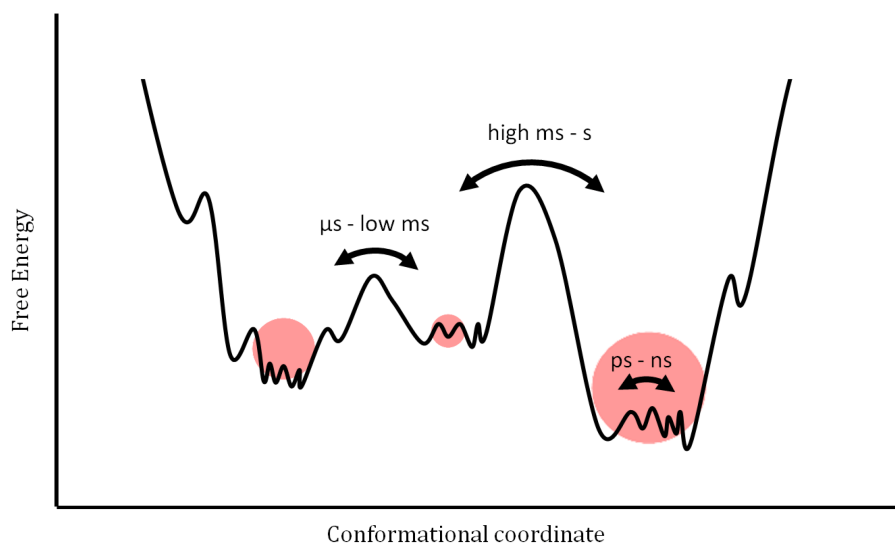


Figura 3 – Superfície de energia livre de uma proteína. O tempo para a conversão da proteína para um estado mais energeticamente favorável é proporcional à altura da barreira. Reproduzido de (GÖBL; TJANDRA, 2012).

1.3 Métodos de resolução de estrutura de proteínas

De que forma é possível descobrir a estrutura de uma proteína? Atualmente, são utilizadas três técnicas principais para determinar a estrutura de biomoléculas (Figura 4), detalhadas a seguir:

- **Cristalografia de Raios-X**

Este método utiliza a difração de feixes de raios-X em uma estrutura cristalina para obter um modelo da estrutura de biomoléculas. A cristalografia vem sendo utilizada em macromoléculas desde 1958, quando foi determinada a estrutura da mioglobina, com 6Å de resolução (KENDREW *et al.*, 1958), sendo posteriormente refinada a 2Å (KENDREW *et al.*, 1960). A obtenção de um cristal de proteínas depende da organização dessas macromoléculas em um arranjo periódico durante o processo de precipitação, o que pode requerer condições controladas. Porém, essas condições variam muito de acordo com a proteína, resultando em estruturas com diferentes níveis de qualidade. Quanto maior a capacidade de difração de raios-X, menor o valor de resolução da estrutura, e portanto melhor a qualidade do modelo (VERLI, 2014).

Quando o feixe de raios-X atinge o núcleo de um átomo, gera-se um padrão de difração, que possibilita a medição da amplitude e posição das ondas de raios-X difratadas. O somatório destas ondas leva à obtenção de mapas de densidade eletrônica, a partir dos quais é gerada uma estrutura química. O modelo é ajustado e refinado repetidamente até que o padrão de difração calculado seja o mesmo do medido experimentalmente.

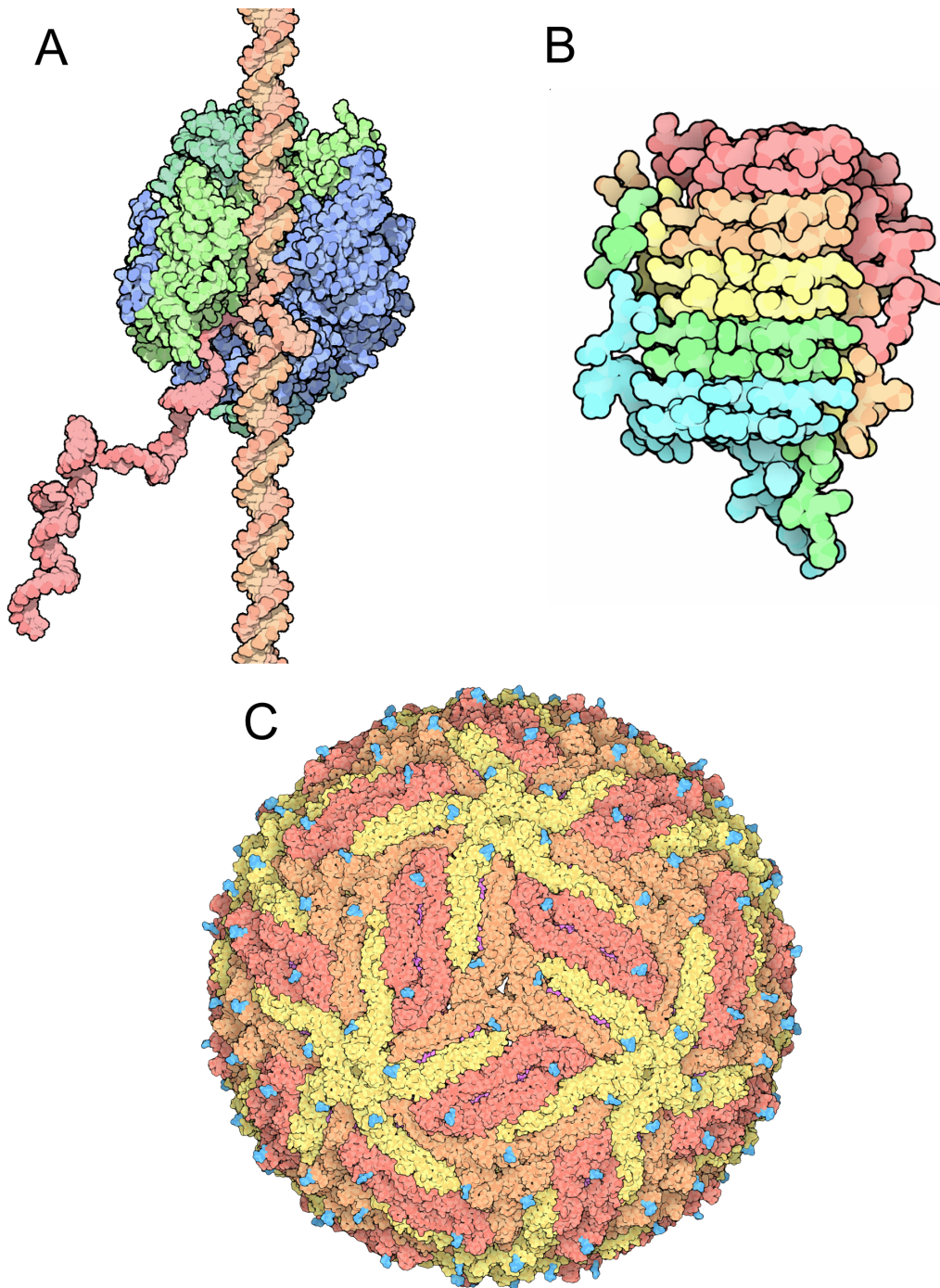


Figura 4 – Estruturas tridimensionais de biomoléculas obtidas por A) cristalografia de raios-X (RNA Polimerase II (PDB ID 1I6H)); B) ressonância magnética nuclear (Príon na sua forma amilóide (PDB ID 2RMN)), e C) criomicroscopia eletrônica (Zika Virus (PDB ID 5IRE)). Reproduzido de (ARANTES, 2018).

A qualidade do modelo gerado está atrelada à interpretação dos mapas de densidade eletrônica, que por sua vez depende da resolução da estrutura. O arranjo periódico da biomolécula no cristal reforça o sinal do espalhamento, gerando um dado de melhor qualidade. Por isso, o uso da cristalografia para elucidar a estrutura de moléculas muito flexíveis é limitado. É possível, em alguns casos, utilizar restrições conformacionais para

fazer com que moléculas flexíveis sejam empacotadas e formem redes cristalinas.

A cristalografia de raios-X pode ser utilizada não só na resolução da estrutura de uma proteína isolada, mas também com pequenos ligantes cocrystalizados, permitindo entender sua interação e suas conformações ativas associadas. No entanto, o meio cristalino é muito diferente do biológico, e portanto não necessariamente descreverá a conformação dessas moléculas em solução (BLUNDELL; JHOTI; ABELL, 2002).

- Ressonância magnética nuclear

A ressonância magnética nuclear (RMN) permite a resolução da estrutura de moléculas em solução, o que, em estudos biológicos, permite o estudo de eventos ao longo do tempo, como movimentos intramoleculares, reações cinéticas, ou até mesmo enovelamento de proteínas (VERLI, 2014). Adicionalmente, é possível empregar métodos derivados de RMN na investigação de interações proteína-proteína (PPIs) (BARILE; PELLECCIA, 2014).

As bases da técnica tiveram início em 1945, através da observação do efeito de campos magnéticos no momento angular de spins atômicos. A incidência de pulsos magnéticos sobre a biomolécula leva ao alinhamento dos spins magnéticos dos núcleos de certos isótopos (por exemplo, ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F e ^{31}P). Em seguida, emite-se uma fonte de energia, que pode ser absorvida pelos átomos, invertendo o alinhamento do spin em relação ao campo magnético. O espectro de absorção permite a medição da energia de transição dos estados energéticos dos spins, e também a proximidade a outros átomos. O experimento é repetido e os espectros gerados são combinados, resultando em dados que permitem a resolução da estrutura. Uma das grandes vantagens do uso da RMN na determinação da estrutura de proteínas é a possibilidade de investigar seu comportamento em meio similar ou idêntico ao biológico. (WUTHRICH, 1989) No entanto, a técnica tem limitações quanto ao tamanho das moléculas (até 900 kDa), e na escala de tempo que consegue descrever (da ordem de picossegundos). A utilização de RMN em baixas temperaturas diminui a energia cinética das moléculas, e, conseqüentemente, reduz a energia para a interconversão de conformações, o que permite identificar diferentes populações e suas abundâncias.

- Criomicroscopia eletrônica

A técnica de criomicroscopia eletrônica (ou crio-EM) moderna tem suas raízes na década de 1980 (DUBOCHET *et al.*, 1985). Diferente da cristalografia e do RMN, a crio-EM funciona com amostras menores, e também permite a determinação de estruturas de diversos tamanhos, desde dezenas de kDa, até partículas virais de muitos MDa, ou até mesmo células inteiras. Esta metodologia consiste em incidir um feixe de elétrons em uma biomolécula-alvo congelada em solução. Este feixe penetra na molécula, e as partículas que se dispersam ajudam a formar um “mapa” dos obstáculos que encontraram.

O tamanho máximo de uma biomolécula que pode ter sua estrutura determinada por

crio-EM depende da profundidade que pode ser penetrada pelo feixe de elétrons (por volta de 500 nm no caso de microscópios eletrônicos de transmissão de 300 kV). Já o tamanho mínimo é um desafio maior - atualmente, cerca de 50 kDa. Esta limitação está ligada ao quanto a biomolécula suporta ser bombardeada por elétrons - quanto mais tempo, maior o contraste gerado, e melhor resolvida fica a molécula. O dano causado pelo feixe de elétrons depende de muitos fatores, tanto da amostra quanto do equipamento. Desta forma, a crio-EM mostra-se muito adequada para o estudo de interações de macromoléculas, tanto em ambiente aquoso quanto em membranas. Em especial, as interações proteína-proteína podem se beneficiar muito desta técnica, pois condições próximas às fisiológicas podem ser utilizadas para determinar a dinâmica desse complexo, ou seja, unindo características tanto da cristalografia de raios-X quanto da RMN.

Avanços recentes tem aumentado o alcance dessa técnica, e seus impactos são tais que há quem considere que suas aplicações ao estudo de biomoléculas iniciaram a “revolução da resolução”. Essas melhorias se dão principalmente a duas inovações: ao uso de detector direto de elétrons para a microscopia eletrônica, que aumenta o poder de detecção de elétrons; e ao avanço de ferramentas de processamento de imagens aliado ao aumento de performance de microprocessadores, permitindo a análise de centenas de milhares de imagens provenientes de microscópios eletrônicos por algoritmos computacionalmente custosos. (CHENG, 2015; MURATA; WOLF, 2018)

1.4 Engenharia de Peptídeos

Peptídeos se definem como cadeias polipeptídicas formadas por até cerca de 100 resíduos de aminoácidos. Peptídeos formados por entre 100 e 200 aminoácidos são, de maneira geral, mais próximos a proteínas, podendo ser chamados de mini-proteínas (YANG *et al.*, 2011; VERDINE; HILINSKI, 2012). Esta proximidade se dá pois sua estrutura é frequentemente mais estável do que a de peptídeos menores, devido ao maior número de interações interatômicas, que auxiliam na manutenção do arcabouço proteico. Peptídeos menores, e peptídeos extraídos de uma proteína maior, possuem algumas diferenças estruturais relevantes em relação a proteínas, justamente por seu menor tamanho, que se traduz em menos átomos para interagirem entre si. Em um meio biológico, peptídeos ficam suscetíveis a perder sua estrutura secundária, pois a interação com o solvente pode ser mais favorável do que as interações intramoleculares, podendo romper as ligações de hidrogênio que o estabilizam, promovendo alterações de enovelamento. Essa instabilidade conformacional pode fazer com que o peptídeo perca a sua forma biologicamente relevante, resultando em um conjunto de conformações aleatórias. Como resultado, peptídeos são suscetíveis à hidrólise e oxidação, tem baixa capacidade de atravessar

membranas, tendem à agregação, tem meia-vida curta, fácil eliminação e geralmente não são disponíveis oralmente. Essas características são particularmente importantes no campo do desenvolvimento de peptídeos de interesse farmacêutico, e busca-se melhorar tais características (GEORGOULIA; GLYKOS, 2019).

A busca por modular a atividade biológica de peptídeos, tanto naturais como sintéticos, se deve à grande quantidade de vantagens que estes oferecem. Peptídeos de interesse terapêutico em geral possuem uma alta afinidade ao seu alvo, o que pode se traduzir em uma redução da dose necessária, o que diminuiria os efeitos colaterais de um tratamento, por exemplo. A síntese de peptídeos é, no entanto, muito custosa de maneira geral, necessitando de várias etapas de isolamento e purificação de intermediários. Desde os trabalhos pioneiros de Emil Fischer e du Vigneaud na primeira metade do século XX, as técnicas de sínteses de peptídeos foram muito aprimoradas, com a síntese enzimática sendo adequada para peptídeos de até 10 aminoácidos, e a síntese química mais adequada para peptídeos de até 80 aminoácidos (GUZMÁN; BARBERIS; ILLANES, 2007). Atualmente, a automatização de técnicas como a síntese de peptídeos em fase sólida, em especial a baseada em Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonil) como protetor temporário da região N-terminal de peptídeos, possibilita um maior nível de controle do processo. O escalonamento da produção ainda é uma questão em desenvolvimento, com o fármaco peptídico Enfuvirtide sendo produzido na escala de multiquilogramas. (MÄDE; ELS-HEINDL; BECK-SICKINGER, 2014) Nos últimos anos, a expansão da área de “ômicas” tem encontrado muitas combinações de peptídeos e seus alvos, e aliada a melhorias nas técnicas de síntese, fazem o campo da peptidologia muito promissor. (MAHLAPUU *et al.*, 2016)

Muitos organismos sintetizam peptídeos essenciais para sua interação com o meio e com outros organismos, como peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês *Antimicrobial Peptide*) (BAHAR; REN, 2013). AMPs são produzidos por diversos organismos, incluindo bactérias, plantas, fungos, artrópodes e cordados. Vários AMPs foram descobertos em alimentos, e o potencial uso de AMPs naturalmente produzidos é de especial interesse para a indústria alimentícia. Destacam-se os peptídeos antimicrobianos produzidos por bactérias do ácido lático (LAB) por terem um longo histórico de uso seguro em humanos. Muitas LABs possuem o status de GRAS (geralmente consideradas como seguras, do inglês *Generally Regarded As Safe*) e QPS (presunção qualificada de segurança, do inglês *Qualified Presumption of Safety*), acompanhando a tendência de alimentos minimamente processados, sem aditivos químicos, e com altos níveis de segurança e durabilidade (AHMED; HAMMAMI, 2019). A relação estrutura-função desses peptídeos naturais depende de algumas propriedades físico-químicas: anfipaticidade (domínios hidrofóbicos e hidrofílicos alternados), carga (em geral positiva), hidrofobicidade (50% ou mais de resíduos hidrofóbicos), sequência (preferência por lisina e arginina), tamanho (pelo menos 22 aminoácidos para o ancoramento de uma hélice- α em uma membrana bacteriana), e estrutura secundária (frequentemente hélice- α ou folha- β) (POWERS; HANCOCK, 2003; AHMED;

HAMMAMI, 2019). Esses fatores influenciam, por exemplo, a capacidade do AMP de atravessar membranas, que relaciona-se com a carga positiva, que facilita sua interação com a membrana celular de seus alvos, e também com a anfipaticidade, permitindo a interação do peptídeo com as camadas da membrana. Além disso, altas concentrações de peptídeos policatiônicos estão associadas à toxicidade celular (HOWL; JONES, 2015), garantindo, portanto, uma vantagem competitiva para o organismo produtor.

Os mecanismos de ação de AMPs policatiônicos estão divididos em categorias relacionadas a sua interação com a membrana do alvo (Figura 5): AMPs disruptivos ou não-disruptivos (POWERS; HANCOCK, 2003). Apesar do escasso conhecimento sobre o modo de ação de muitos deles, AMPs tem sido cotados como uma alternativa viável a antibióticos, pois dificultam a seleção de cepas de patógenos resistentes e multirresistentes. Adicionalmente, podem ser utilizados como adjuvantes no tratamento com antibióticos convencionais, pois possuem efeito sinérgico e atividade anti-inflamatória (FJELL *et al.*, 2012). Atualmente, há um esforço para melhorar a atividade e custo-benefício da produção de AMPs policatiônicos naturais, especialmente através da otimização de sequência, eliminação de modificações pós-traducionais, e ajuste de espectro de atividade, toxicidade, farmacocinética e seletividade (FJELL *et al.*, 2012).

As bacteriocinas são um exemplo de peptídeos antimicrobianos produzidos por bactérias que possuem ação bactericida ou bacteriostática, ou seja, ou matam seus competidores, ou promovem a estagnação de seu crescimento. Recentemente, foi proposta uma classificação dessas bacteriocinas utilizando seu mecanismo de biossíntese e atividade biológica como critério. (ALVAREZ-SIEIRO *et al.*, 2016) As bacteriocinas produzidas por bactérias do ácido láctico são divididas em três classes, com a classe I contendo peptídeos modificados pós-traducionalmente; a classe II englobando peptídeos não-modificados de até 10 kDa; e a classe III, que abrange bacteriocinas não-modificadas maiores do que 10 kDa. Dentro da classe I, um grupo de bacteriocinas destaca-se por possuir uma modificação pós-traducional incomum: são S-glicosilados, ou seja, possuem um carboidrato ligado ao átomo de enxofre na cadeia lateral de uma cisteína. Tal glicosilação é esparsamente descrita na literatura, e pouco se sabe a seu respeito (OMAN *et al.*, 2011). O grupo das bacteriocinas glicosiladas, ou glicocinas, possui poucos integrantes caracterizados (Figura 6). A glicocina F (GccF (VENUGOPAL *et al.*, 2011)) e sua homóloga Asm1 (HATA; TANAKA; OHMOMO, 2010) são peptídeos de 43 aminoácidos provenientes de *Lactobacillus plantarum*, e, embora tenham uma diferença de apenas 5 aminoácidos, possuem estruturas dramaticamente diferentes, sendo GccF composta por duas hélices ligadas por uma alça com uma GlcNAc O-ligada, e com uma “cauda” C-terminal com uma GlcNAc S-ligada ao último aminoácido, e Asm1 com as mesmas glicosilações nas mesmas posições, mas sem estrutura secundária definida. A sublancina (SunA (OMAN *et al.*, 2011)), de *Bacillus subtilis*, possui 37 aminoácidos e uma arquitetura muito similar à da GccF

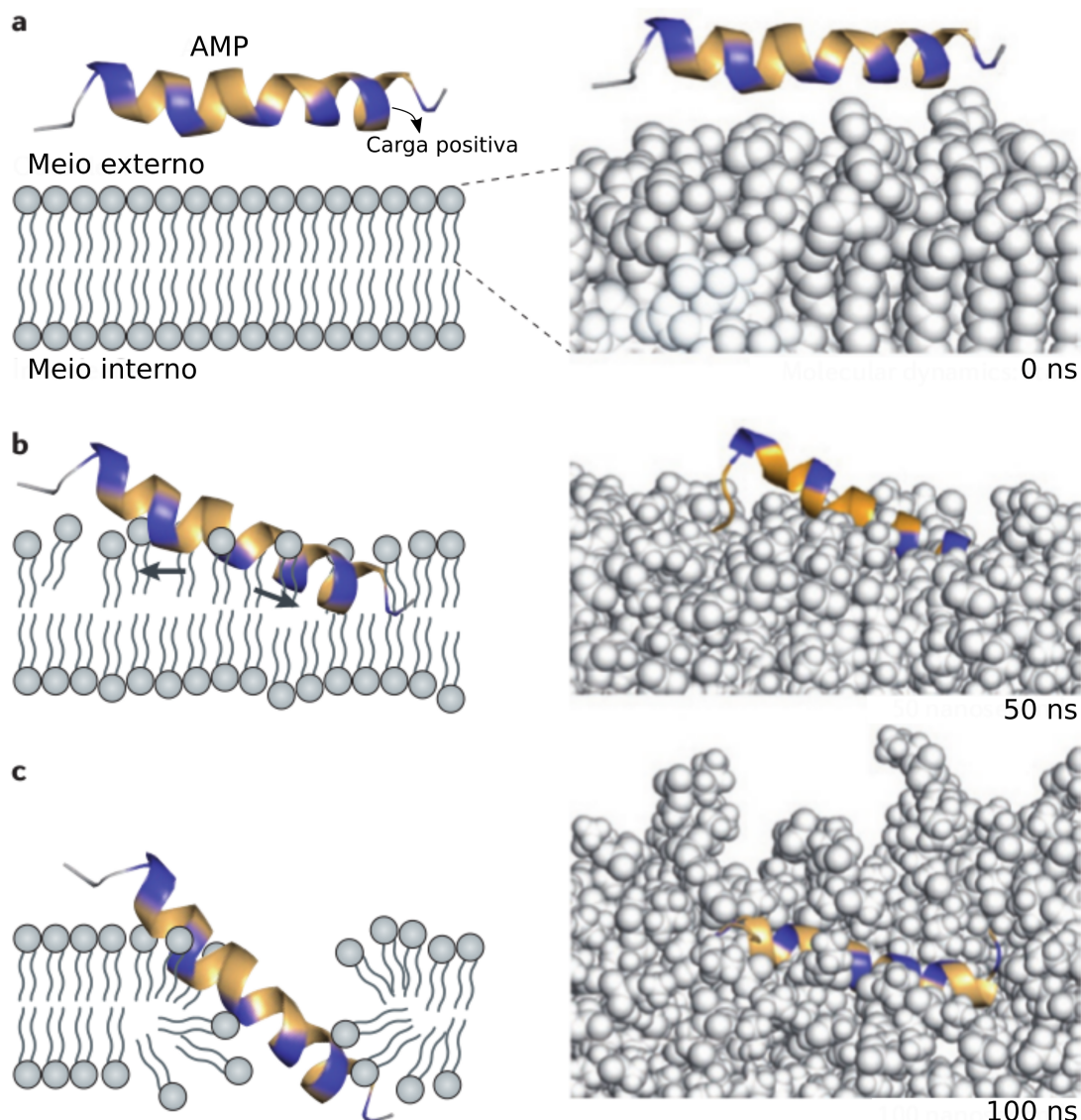


Figura 5 – Esquema do mecanismo de ação de AMPs disruptores de membrana. Um peptídeo policatiônico é simulado por 100 ns com DM, interagindo com a membrana e alterando-a. Adaptado de (FJELL *et al.*, 2012).

(GONZALO *et al.*, 2014), com uma GlcNAc S-ligada à alça entre suas hélices. Outras glicocinas já bioquimicamente caracterizadas, mas sem estrutura determinada experimentalmente, incluem a thurandacina (ThuA (WANG *et al.*, 2014), de *Bacillus thuringiensis*) e a enterocina (enterocina F4-9 (MAKY *et al.*, 2015) e enterocina 96 (IZQUIERDO *et al.*, 2009), de *Enterococcus faecalis*). Outras possíveis glicocinas incluem a durancina 61A (de *Enterococcus durans*), LeHA (de *Bacillus lehensis*), e Paeglicocina (de *Paenibacillus* sp.) (NORRIS; PATCHETT, 2016).

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de fármacos baseados em peptídeos tem sido utilizado como uma alternativa para atingir alvos de difícil modulação terapêutica, por exemplo no tratamento de cânceres e de doenças metabólicas (FOSGERAU; HOFFMANN, 2015). No entanto, fármacos baseados em peptídeos possuem uma série de limitações que

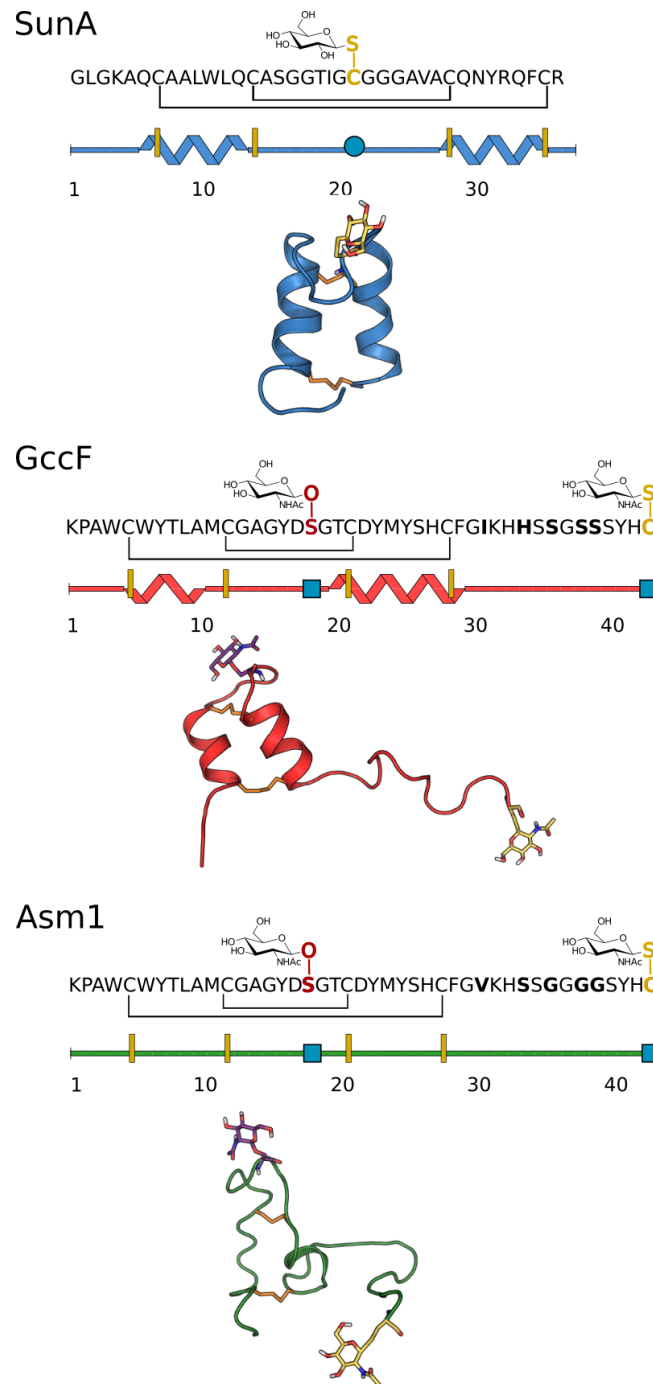


Figura 6 – Estrutura de glicocinas. Sequência primária, esquema da estrutura secundária, e estrutura tridimensional determinada por RMN. S-glicosilações em amarelo; O-glicosilações em roxo; pontes dissulfeto em laranja.

são diretamente ligadas à sua estrutura. Diversos métodos foram desenvolvidos para garantir a estabilidade estrutural de peptídeos, melhorando seu potencial farmacológico (CRAIK *et al.*, 2013; BIRD *et al.*, 2016). Alguns métodos para a manutenção de hélices- α incluem estabilização de hélice (pré-organiza resíduos de aminoácidos e inicia a formação de hélice), foldâmeros de hélice (análogos a aminoácidos, capazes de adotar conformações similares àquelas encontradas em proteínas na natureza), e miméticos de superfície de hélice (formam arcabouços

restritos com grupos funcionais ligados que se parecem com o padrão de posição de i , $i+4$ ou $i+7$ na hélice- α , unindo uma e duas voltas, respectivamente) (SCOTT *et al.*, 2016). Outras estratégias incluem otimização de sequência, incorporação de moléculas não naturais, PEGilação e conjugação com outras biomoléculas, e, especialmente para hélices- α , pontes salinas, quelação por metal, e modificações químicas, como pontes dissulfeto e lactâmicas (PARTHASARATHY; ANANDAMMA; KALESH, 2019). Estas são muito eficientes na manutenção do conteúdo de hélice de peptídeos, mas nem sempre permanecem estáveis na célula, sendo suscetíveis à degradação (FOSGERAU; HOFFMANN, 2015).

Uma alternativa possível para a manutenção de estrutura secundária é a incorporação de “grampos” de hidrocarbonetos, que são inseridos em aminoácidos separados por três, quatro ou sete resíduos (i , $i+3$, i , $i+4$ e i , $i+7$, respectivamente), ligando voltas de hélice (VERDINE; HILINSKI, 2012). Um dos primeiros estudos de tais sistemas investigou um peptídeo modelo, baseado em RNase A, que tem conteúdo parcial de hélice- α em meio aquoso (25% no peptídeo não-modificado), o que facilita a observação de alterações no conteúdo de hélice com diferentes modificações (SCHAFMEISTER; PO; VERDINE, 2000; SHIM; KIM; VERDINE, 2013). Algumas configurações desse grampo resultaram em aumento do conteúdo de hélice, da afinidade de ligação com o alvo, da capacidade de atravessar membranas, da sua resistência a proteases, de sua estabilidade *in vitro* e *in vivo*, e de sua eficácia em modelos animais de doenças humanas (WALENSKY, 2004; BERNAL *et al.*, 2007; KIM; GROSSMANN; VERDINE, 2011; WALENSKY; BIRD, 2014; HOWL; JONES, 2015). O estudo desse tipo de modificação promete revolucionar a indústria farmacêutica, permitindo o acesso a um grande número de interações que são consideradas como não-moduláveis terapêuticamente, como interações proteína-proteína. Atualmente, alguns peptídeos grampeados passam por estudos clínicos em humanos.

1.5 Bioinformática Estrutural Aplicada ao Estudo de Biomoléculas

1.5.1 Desenho de fármacos auxiliado por computador

Apesar da revolução causada pela descoberta de antibióticos, a resistência a estes por parte de microorganismos patogênicos tem sido um empecilho para o tratamento de diversas infecções em humanos e animais de interesse econômico (DAVIES; DAVIES, 2010). Frente à crescente preocupação com a resistência por parte de bactérias patogênicas, a busca por alternativas a antibióticos recebe muito esforço de pesquisa, e algumas abordagens sugeridas incluem a utilização de biomoléculas produzidas por bactérias (COTTER; ROSS; HILL, 2013), ou por organismos que as produzem como um mecanismo de defesa contra infecções, como

é o caso com artrópodes (LACERDA *et al.*, 2016). Tais biomoléculas, geralmente peptídeos com propriedades antimicrobianas, são refinadas por muitos anos de coevolução, e, embora ainda não tenham sido testadas clinicamente, estima-se que são menos propensas a gerar multi-resistência da parte de bactérias patogênicas (GOMES *et al.*, 2018).

A descoberta de fármacos vem sofrendo consideráveis avanços nas últimas décadas, mas mesmo assim permanece com um alto custo financeiro e temporal associado. Desde a busca de potenciais fármacos, incluindo pesquisas sobre dose e toxicidade, e culminando em múltiplas fases de teste em animais modelo e em humanos, o investimento pode chegar à faixa de bilhões de dólares em um período de 16 a 20 anos (SOLLANO *et al.*, 2008). A busca por moléculas que interajam com um determinado alvo molecular associado a uma doença pode ser auxiliada pela melhor compreensão da estrutura desse alvo. Por exemplo, a elucidação da estrutura de proteínas, que são efetoras de muitos processos celulares, permite que estas sejam potenciais alvos no chamado desenho de fármacos auxiliado por computador (do inglês *Computer-Aided Drug Design*, ou CADD) (LILL; DANIELSON, 2011; XIANG *et al.*, 2012; NERO; PARKER; MORTON, 2018). Através da combinação com dados estruturais, simulações de biomoléculas em computador podem guiar o desenvolvimento de fármacos, especialmente nas fases iniciais do processo, onde ocorrem a seleção e otimização de potenciais ligantes (Figura 7) (ALONSO; BLIZNYUK; GREASY, 2006). Com base nisso, a utilização de metodologias computacionais pode contribuir muito com o conhecimento sobre peptídeos. O CADD beneficia-se da utilização de informações estruturais, seja a respeito de um alvo proteico, ou de um grupo de potenciais fármacos, para tentar simplificar a busca por novos compostos terapêuticos, economizando tempo e dinheiro (LEELANANDA; LINDERT, 2016). Em especial, a utilização da dinâmica molecular (DM) no CADD pode contribuir com o entendimento da formação de complexos proteicos (NERO; PARKER; MORTON, 2018). O estudo de peptídeos através de simulações de DM, que já completa 20 anos, contribui de forma vital na geração de conhecimento e no aprimoramento de campos de força, auxiliando na capacidade das simulações de capturar e reproduzir a realidade biológica (GEORGOULIA; GLYKOS, 2019).

1.5.2 Abordagens Metodológicas

Assim como no desenho de qualquer experimento, cada metodologia computacional parte de um modelo, que, por definição, é uma simplificação do processo biológico estudado. De forma a entender sua contribuição na investigação de problemas biológicos, detalharemos as principais metodologias utilizadas no decorrer desta tese. Para cada uma, será feita uma breve revisão de sua história e de suas aplicações, bem como de seus méritos e limitações.

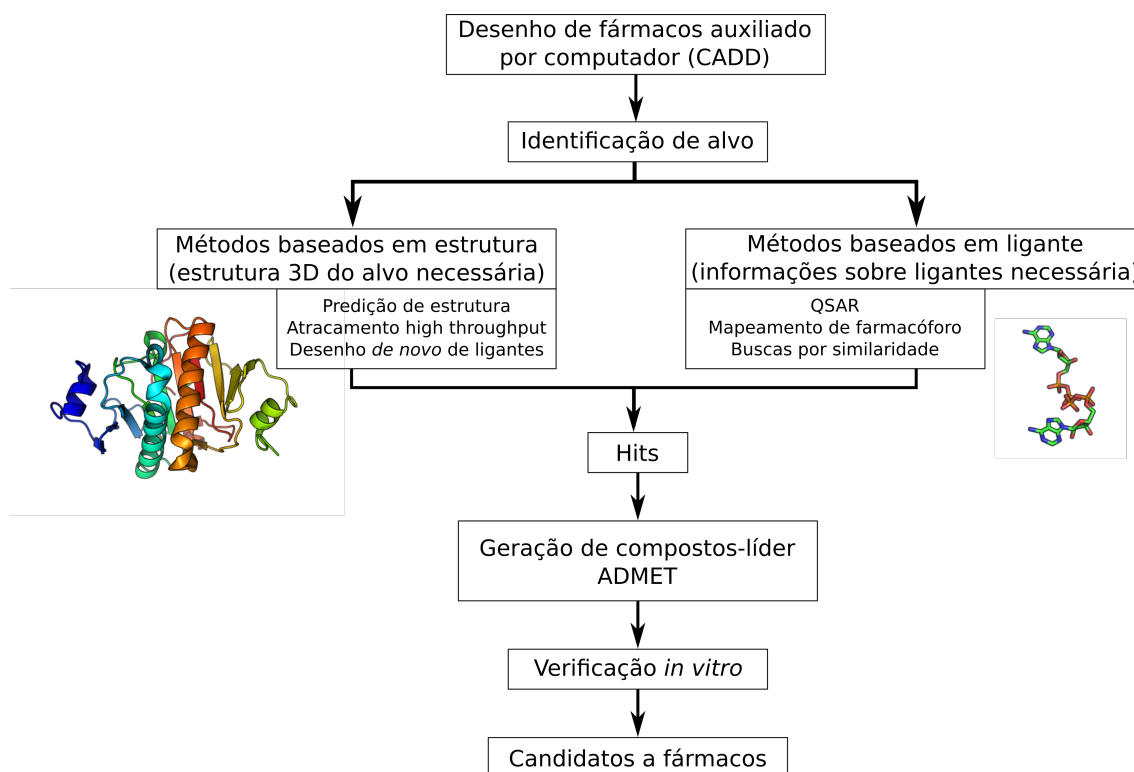


Figura 7 – Representação esquemática do processo de desenho de fármacos auxiliado por computador. A abordagem gera depende das informações estruturais disponíveis de alvo e/ou ligantes. A partir disso, ocorre a identificação, refinamento, e otimização de compostos para obter potenciais candidatos a fármacos. Adaptado de (LEELANANDA; LINDERT, 2016).

1.5.2.1 Modelagem Molecular

A modelagem molecular tem o intuito de investigar a estrutura e as propriedades de moléculas através do uso da química computacional (MCNAUGHT; A., 2019). De maneira geral, e no caso de proteínas, se parte da sequência de aminoácidos de interesse. Inicialmente, é realizada uma busca da sequência contra uma base de dados de estruturas, como o Protein Data Bank, através de algum alinhador, como o BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990) ou HMMER (FINN; CLEMENTS; EDDY, 2011). Se houver uma correspondência de 100% de identidade, então a estrutura tridimensional está disponível; se não, utiliza-se a modelagem molecular.

O tipo de abordagem para a modelagem molecular dependerá do grau de similaridade, que é calculado a partir da identidade entre as sequências alinhadas, e da cobertura do alinhamento em relação à sequência em questão. (WEBB; SALI, 2014) A lógica é que, quanto mais informação estiver disponível, menor será o custo computacional. Quando há informações estruturais de moléculas com no mínimo 30% de similaridade com a sequência-alvo, pode-se utilizar a modelagem comparativa (ou “modelagem por homologia”). Esta técnica permite a construção de modelos tridimensionais a partir da estrutura de uma (ou mais) proteína cuja sequência de aminoácidos seja similar (“molde”). Quando a similaridade está entre 20 e 30%,

pode-se utilizar a técnica de predição de enovelamento (ou “*threading*”) (BOWIE; LUTHY; EISENBERG, 1991; MIZUGUCHI, 2004), onde se utilizam “pedaços” de proteínas determinadas experimentalmente. Esta metodologia parte do princípio de que a estrutura tridimensional de proteínas é mais conservada do que o alinhamento de suas sequências (LESK; CHOTHIA, 1980; ILLERGÅRD; ARDELL; ELOFSSON, 2009); isto significa que sequências com baixa similaridade podem ser muito semelhantes em sua estrutura, o que já restringe as conformações que podem ser adotadas. Diversos tipos de enovelamentos são conhecidos, e estima-se que há, no máximo, cerca de 7000 na natureza. Tais “moldes” estão disponíveis em bancos de dados como o CATH (do inglês “*Class, Architecture, Topology, Homology*”) (DAWSON *et al.*, 2016), e o SCOP2 (do inglês “*Structural Classification Of Proteins*”) (ANDREEVA *et al.*, 2013), de forma que é possível gerar um modelo a partir de fragmentos, como se fossemos o Dr. Frankenstein montando seu monstro.

Caso não haja moldes disponíveis para a modelagem, é possível utilizar o método *de novo* (utiliza algum tipo de informação estrutural, tais como fragmentos de proteínas, predição de estrutura secundária e potenciais estatísticos, porém de forma independente da similaridade com o alvo), ou de predição por primeiros princípios (ou “*ab initio*”) (SIMONS *et al.*, 1997). Apesar da vantagem de não necessitar de nenhuma informação estrutural para prever o arranjo da proteína de interesse, esta técnica deve ser empregada com muito cuidado. Esta metodologia tem avançado a passos largos nas últimas décadas, tendo sua expressão máxima nos experimentos de Avaliação Crítica da Predição da Estrutura de Proteínas (CASP, do inglês *Critical Assessment of protein Structure Prediction*, disponível em: <http://predictioncenter.org>), um evento bienal no qual estruturas tridimensionais de moléculas são resolvidas em segredo e diversos grupos no mundo testam a capacidade de seus algoritmos de predição de modelar corretamente cada sequência.

Finalmente, a qualidade do modelo é analisada através do uso de avaliações estereoquímicas, energéticas e funcionais. Avaliações estereoquímicas verificam aspectos tridimensionais do modelo, como impedimentos estéricos, quiralidade, e tensões angulares, em especial as entre os ângulos ϕ e ψ de cada aminoácido através do diagrama de Ramachandran, que indica se estes estão em regiões energeticamente favoráveis (RAMACHANDRAN, 1963). Diversas adições a esse gráfico foram feitas ao longo do tempo, incluindo a demonstração de que diferentes resíduos possuem diferentes preferências conformacionais quando envolvidos em diferentes estruturas secundárias (LIGABUE-BRAUN *et al.*, 2018). Avaliações energéticas comparam o modelo obtido com proteínas similares (por exemplo, com o mesmo perfil molecular ou tipo de enovelamento). Já as avaliações funcionais fazem a importante ligação do modelo computacional a informações funcionais ou estruturais conhecidas: se o modelo não concordar com dados experimentais prévios (por exemplo, a conservação de sítios ativos ou de superfícies de contato com outras proteínas), não será considerado totalmente válido. Caso a avaliação do

modelo não seja satisfatória, este pode ser refinado até que se obtenha uma estrutura de boa qualidade. (VERLI, 2014)

1.5.2.2 Atracamento Molecular

Para entendermos os processos celulares e seus mecanismos, é preciso determinar e compreender o modo de interação entre biomoléculas. O atracamento (ou *docking*) molecular é uma técnica que procura determinar a estrutura tridimensional de um complexo de moléculas, ou de maneira simplificada, encontrar a posição mais favorável para que as moléculas desse complexo interajam. (AZEVEDO *et al.*, 2012) Os tipos de atracamento mais comuns são entre uma proteína e um pequeno ligante, entre duas proteínas, e entre proteína e DNA, e cada um tem suas particularidades. Para simplificar a explicação, trataremos inicialmente do atracamento proteína-ligante.

De maneira geral, o atracamento molecular é análogo a um problema “chave e fechadura”, onde o papel de algoritmos de busca é encontrar a posição da chave (um pequeno ligante) em relação à fechadura (sítio de ligação a uma proteína) que possibilitaria a abertura da porta (permitir a atividade da proteína), ou impedi-la de ser aberta (por estar ocupando a “fechadura”). Na prática, os algoritmos de busca retornam diversas posições possíveis, que são ranqueadas por funções de escore, que podem ou não ser baseadas em energia. (SANTOS; FERREIRA; ANDRICOPULO, 2018) O atracamento molecular é um problema de otimização, tentando encontrar a melhor solução em uma grande quantidade de possibilidades.

Considerando a proteína rígida, o ligante pode rotacionar e translacionar nos eixos xyz em relação a ela, mas este também possui ângulos torcionais. Quanto mais variáveis de posição houverem, mais complexo e computacionalmente custoso se torna o problema. Camadas adicionais de complexidade incluem a flexibilidade da proteína, a presença de cofatores, e moléculas de solvente, além da incorporação de métodos de mecânica quântica (QM) aos de mecânica molecular (MM), formando um modelo híbrido de QM/MM (RUYCK *et al.*, 2016).

1.5.2.3 Dinâmica Molecular

Apesar das enormes contribuições de experimentos e modelos estruturais, ainda falta um importante componente para entendermos como funcionam as biomoléculas: o movimento. É como se estivéssemos de posse de uma fotografia da biomolécula, quando na realidade ela é a estrela de um longo filme. Já que biomoléculas são dinâmicas, flexíveis, e se modificam ao longo do tempo, de que forma podemos entender como essas pequenas remexidas e molejos

impactam a estrutura de uma proteína? Já desde a década de 1950, e aplicado ao estudo de biomoléculas em 1977 (MCCAMMON; GELIN; KARPLUS, 1977), se desenvolveu uma forma de calcular o movimento atômico com base na mecânica clássica: a dinâmica molecular (DM). Através do vertiginoso avanço dos computadores, as simulações de DM são capazes de calcular o movimento de sistemas muito grandes por longos períodos de tempo, permitindo a investigação da estrutura e dinâmica de biomoléculas em escalas biológicas. Dentre algumas possíveis aplicações estão o estudo da desnaturação e enovelamento protéicos (PONDER; CASE, 2003), da translocação de tRNAs no ribossomo (SANBONMATSU; JOSEPH; TUNG, 2005) e a dissolução de capsídeos virais (LARSSON; LILJAS; SPOEL, 2012).

Para gerar uma trajetória (o “filme”) a partir de uma estrutura (a “foto”), o computador realiza ciclos de cálculos para todos os átomos do sistema através da integração da equação de movimento de Newton:

$$F_i = m_i \cdot a_i$$

onde uma força F_i causa uma aceleração sobre um átomo i , que o faz mudar de posição num intervalo de tempo dt . As equações de movimento são integradas de forma a determinar a nova posição e velocidade no tempo $t+\Delta t$. Porém, como uma biomolécula pode ter centenas ou até milhares de átomos, a equação de Newton não consegue, sozinha, calcular a magnitude e a direção da força F_i em todos os átomos do sistema. O conjunto de parâmetros que dizem “como” cada partícula do sistema interage com o seu entorno se chama “campo de força” (LEACH, 2001). De maneira mais formal, o campo de força pode ser definido como um conjunto de funções e parâmetros usados em cálculos de mecânica molecular (MM). Essas funções definem as interações com os átomos que estão ligados (interações ligadas) ou apenas próximos (interações não-ligadas) a uma partícula (Figura 8). As interações ligadas incluem parâmetros para o estiramento e ângulo de ligações covalentes, e ângulos diedrais próprios e impróprios. Interações não-ligadas incluem efeitos eletrostáticos, ligações de hidrogênio e de van der Waals (representados pelo Potencial de Lennard-Jones). Portanto, o campo de força expressa a soma das energias potenciais de cada átomo para que seja possível calcular a energia do sistema (LEACH, 2001; SCHLICK, 2010).

Contudo, conforme aumenta o número de partículas no sistema, também aumenta o custo computacional. A fim de diminuí-los, alguns campos de força representam partículas de maneira simplificada 9. Modelos *coarse-grained* (CG), como o MARTINI (MARRINK *et al.*, 2007) e o SIRAH (MACHADO *et al.*, 2019) representam um conjunto de átomos em uma única esfera, diminuindo o tempo de máquina e permitindo a simulação de grandes sistemas. Um outro tipo de abordagem é a utilizada pelos campos de força GROMOS (OOSTENBRINK

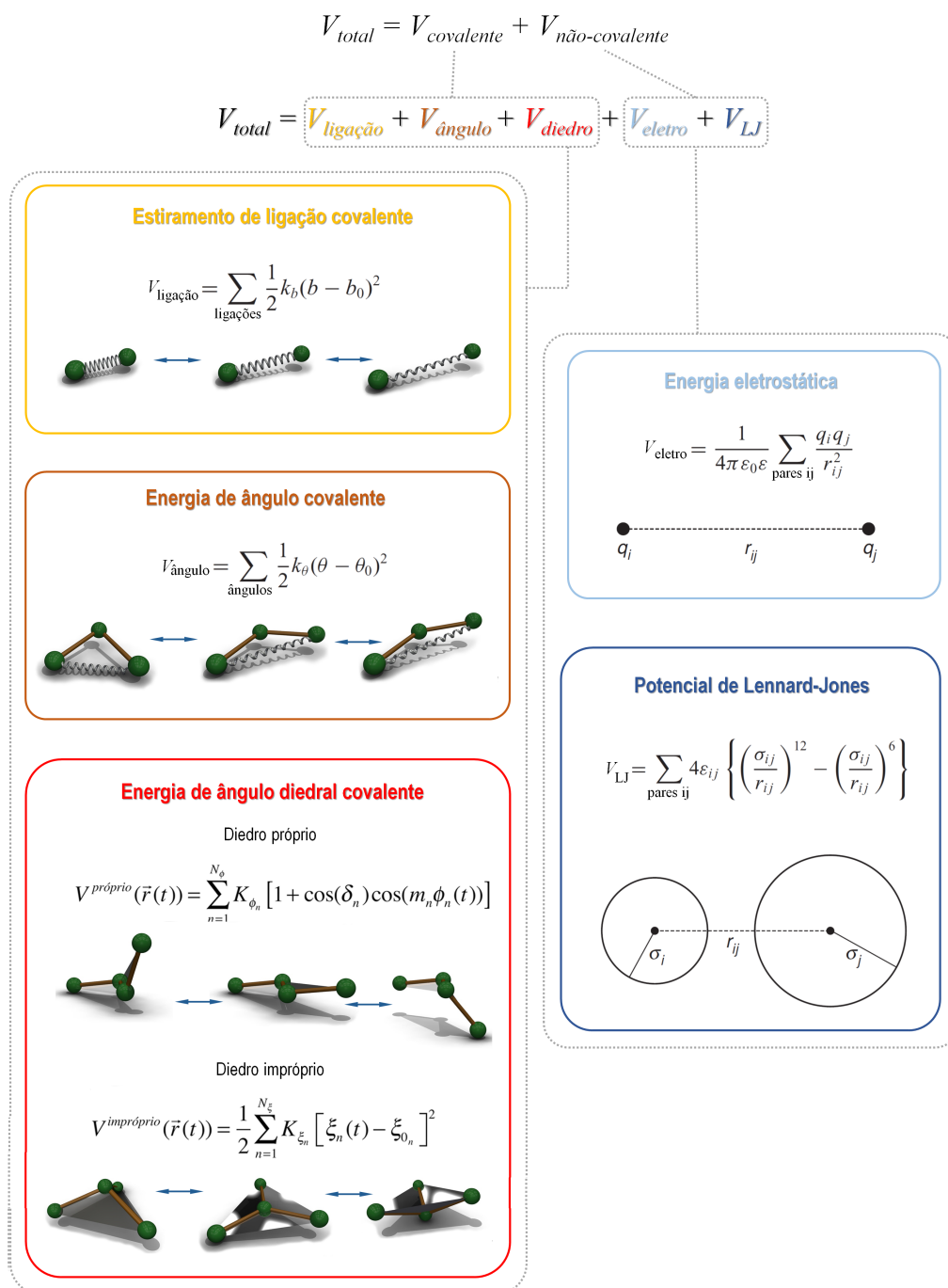


Figura 8 – Esquema dos parâmetros que descrevem a forma funcional de um campo de força. Adaptado de (VERLI, 2014).

et al., 2004), que une hidrogênios apolares a seu respectivo carbono em um pseudotomo. Esse campo de força é chamado de “tomo unido” (UA, do inglês “united-atom”), e reduz bastante o número de partículas no sistema sem, no entanto, perder tantos detalhes quanto o CG. A representao de todos os átomos do sistema (AA, do inglês “all-atom”)  utilizada por campos de força como os da família AMBER (LINDORFF-LARSEN *et al.*, 2010), CHARMM (HUANG;

JR, 2013) e OPLS (KAMINSKI *et al.*, 2001). Dentro de cada campo de força, grupamentos químicos iguais possuem as mesmas propriedades, o que possibilita a transferência dos mesmos descritores para moléculas diferentes (mas que possuem um mesmo grupamento). Isso diminui a necessidade de criar parâmetros novos para cada simulação. A construção de topologias, ou seja, a descrição molecular do sistema, com todas as informações conforme a descrição pelo campo de força, não é simples de ser feita. Logo, a transferibilidade auxilia muito no uso da DM para sistemas biológicos.

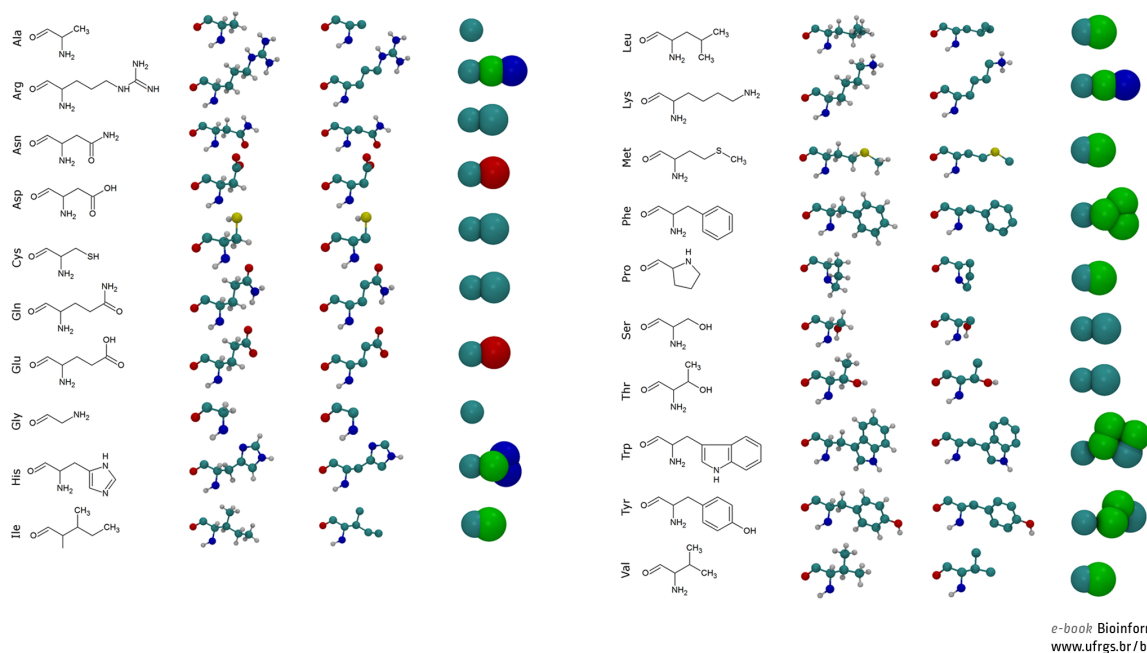


Figura 9 – Diferentes abordagens de representação de átomos em campos de força. Reproduzido de (VERLI, 2014).

Outros aspectos relevantes das simulações por DM incluem alguns outros descritores. Para melhor simular um ambiente biológico, utilizam-se as chamadas “condições periódicas de contorno”, que replicam a caixa de simulação (ou seja, a(s) molécula(s) solvatadas) em todas as direções, de forma periódica, para que a molécula não interaja com o vácuo (Figura 10A). O tempo de integração indica o tamanho do “passo” de cada cálculo (Figura 10B): valores de 1 femtossegundo são normalmente empregados em simulações de dinâmica de proteínas, de maneira que 1 nanossegundo de simulação requer 1.000.000 cálculos de força e energia para cada átomo (LEACH, 2001; SERDYUK; ZACCAI; ZACCAI, 2007; SCHLICK, 2010). A amostragem de uma simulação por DM é uma medida do volume de informação obtido, que idealmente descreve os fenômenos de interesse. Ela se correlaciona diretamente com o tempo de simulação, que, se for longo o suficiente, conseguirá explorar adequadamente o espaço conformacional. Outras formas de aumentar a amostragem incluem metodologias como *Replica Exchange* (SUGITA; OKAMOTO, 1999), metadinâmica (LAIO; PARRINELLO, 2002), entre outros (HARPOLE; DELEMOTTE, 2018). Modelos CG ou UA, que reduzem o número de partículas no sistema, também reduzem o número de estados conformacionais que podem

ser adotados, o que resulta em uma amostragem maior em um mesmo tempo (HSIEH; LUO, 2010).

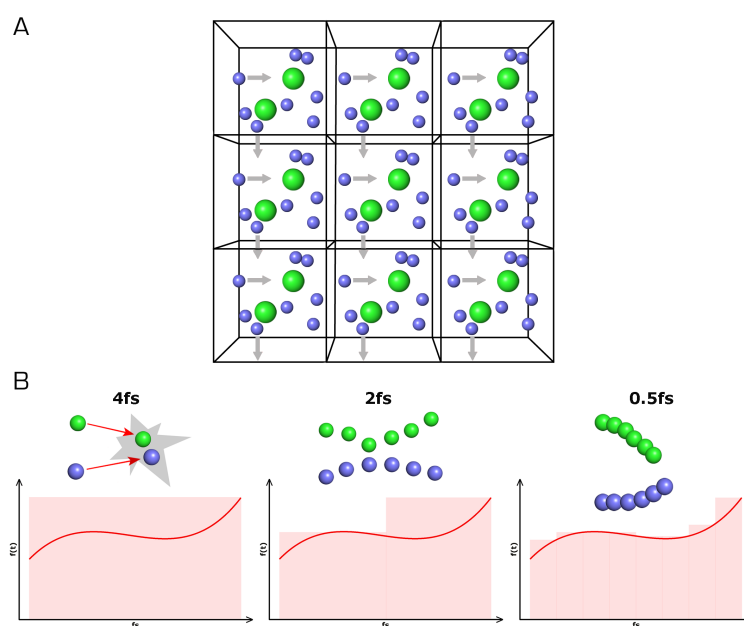


Figura 10 – (A) Representação das condições periódicas de contorno em uma simulação e do (B) efeito de diferentes tempos de integração na amostragem da DM. Adaptado de (VERLI, 2014).

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Estudar a estrutura e dinâmica de peptídeos naturais e semi-sintéticos através de simulações computacionais. Para atingir esse objetivo, o trabalho foi dividido em dois capítulos:

2.2 Objetivos Específicos

- Capítulo I - Peptídeos semi-sintéticos com grampo olefínico
 - Comparar a descrição de peptídeos grampeados por três campos de força de dinâmica molecular
 - Elucidar o processo de manutenção da estrutura secundária pelos grampos
- Capítulo II - Peptídeos antimicrobianos S-glicosilados
 - Analisar o impacto da S-glicosilação na estrutura de glicocinas
 - Avaliar a importância da cauda C-terminal em GccF e Asm1
 - Comparar diferentes glicosilações em SunA
 - Descrever, de forma sistemática, o comportamento estrutural de glicocinas

3 Metodologia

3.1 Sistemas estudados

Para resolver as questões estabelecidas nos objetivos dessa tese, o trabalho foi dividido em dois capítulos. O Capítulo I estuda peptídeos semi-sintéticos com grampos olefínicos, e inclui a comparação de sua descrição por diferentes campos de força. O Capítulo II explora o comportamento estrutural de glicocinas, bem como a função de diferentes regiões de cada peptídeo.

3.2 Programas utilizados

- Modelagem molecular
 - Modeller (WEBB; SALI, 2014)
- Dinâmica molecular e análises
 - Gromacs 4.5 e 5.1 (SPOEL *et al.*, 2005)
 - DichroCalc (BULHELLER; HIRST, 2009)
- Visualização de moléculas e preparação de imagens
 - Grace (WANG *et al.*, 2013)
 - Inkscape (KIRSANOV, 2009)
 - Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, version 1.8)
 - VMD (HUMPHREY *et al.*, 1996)
- Preparação de documentos
 - Mendeley Reference Manager
 - Overleaf

3.3 Modelagem comparativa

No Capítulo I, o peptídeo baseado em RNase A teve duas conformações de partida: hélice- α e desenovelada. No entanto, para permitir o fechamento do grampo na conformação

de partida desenovelada, utilizamos o programa Modeller para gerar modelos com uma volta de hélice entre os resíduos 4 a 7. O modelo com a menor sobreposição com a hélice foi escolhido para representar a conformação de partida desenovelada.

3.4 Dinâmica molecular

Para as simulações dos Capítulos I e II, o soluto foi colocado em uma caixa dodecaédrica, que, em seguida, foi preenchida com moléculas de água do modelo SPC para as simulações com os campos de força GROMOS54A7 (Capítulo I) e GROMOS53A6-GLYC (Capítulo II), e modelo TIP3P para as simulações com os campos de força AMBER99SB-ILDN e CHARMM36 (Capítulo I). Quando necessário, contra-íons foram adicionados para neutralizar a carga total do sistema. Estes sistemas foram minimizados com o algoritmo Steepest Descent até a força máxima convergir, utilizando condições periódicas de contorno.

As simulações por DM, em geral, são divididas em duas fases: a fase de equilíbrio e a fase de produção. Na equilíbrio, se impõe uma restrição de posição sobre as moléculas de interesse, permitindo a acomodação gradual dos outros componentes do sistema, como as moléculas de solvente e os contra-íons. A primeira etapa de equilíbrio foi realizada com número de moléculas, volume e temperatura constantes (NVT). No segundo momento, a simulação prossegue com número de moléculas, pressão e temperatura constantes (NPT). Na fase NVT, o acoplamento de temperatura selecionado foi o termostato V-rescale. A fase de produção foi simulada utilizando o termostato V-rescale, o barostato de Parrinello-Rahman com $\tau_T = 0,1$ ps e $\tau_P = 2,0$ ps. Interações eletrostáticas foram calculadas utilizando o método Particle Mesh Ewald, com ponto de corte de 10 Å para raios de Coulomb e van der Waals. Os comprimentos das ligações covalentes foram fixados pelo método de Lincs, com tempo de integração de 2 fs.

3.4.1 Construção de topologias

Para o estudo dos peptídeos grampeados, foi necessária a construção das topologias moleculares nos campos de força AMBER99SB-ILDN, CHARMM36, e GROMOS54A7. Para a ligação dupla presente nos grampos, foi utilizada a descrição presente no lipídio POPC respectiva para cada campo de força.

3.4.2 Análises

- Estabilidade em relação à conformação de partida: Comparação das conformações da trajetória com a conformação de partida, de forma a indicar o quanto a estrutura se modificou ao longo do tempo de simulação. Isso é feito através do cálculo do desvio quadrático médio (RMSD, *root mean square deviation*), que calcula a diferença média entre as conformações fornecidas (MAIOROV; CRIPPEN, 1994). Conformações muito parecidas com a referência podem indicar uma baixa amostragem do espaço conformacional (ou seja, simulações muito curtas), moléculas particularmente rígidas ou um campo de força balanceado excessivamente para descrição da informação cristalina, não necessariamente equivalente a soluções. Conformações muito diferentes da referência, por sua vez, podem estar relacionadas a artefatos do campo de força, da estrutura de partida (baixa resolução da estrutura ou introdução de artefatos pelo usuário) ou a uma amostragem adequada, capaz de permitir a perda da memória conformacional do ambiente cristalino e a população de estados conformacionais na solução de interesse. O mais comum é um perfil intermediário, com a manutenção da forma do arcabouço proteico e algumas regiões concentrando o maior grau de mudança conformacional. Nesta tese, as comparações se dão com a informação proveniente de RMN, no caso das glicocinas; e com uma hélice ideal, no caso dos peptídeos grampeados. Essa comparação permite observar o quanto o peptídeo grampeado se modificou em relação a uma hélice- α ideal, para a qual um RMSD alto seria indicativo de perda de conformação, e no caso dos peptídeos que partem de uma conformação desordenada, o distanciamento da geometria de partida pode indicar o enovelamento do peptídeo. Em ambos os casos, utilizou-se como referência o esqueleto peptídico, isto é, incluindo apenas o nitrogênio da amina, o carbono- α e o carbono da carboxila, eliminando a influência de cadeias laterais, que tendem a aumentar o valor de RMSD (VERLI, 2014).
- Flexibilidade dos peptídeos: Embora o aumento nos valores de RMSD possa indicar flexibilidade conformacional, essa relação não é obrigatória. Por exemplo, se uma parte da molécula sofre uma grande mudança conformacional entre um estado e outro, e se estabiliza neste segundo estado pela maior parte da trajetória, o RMSD será elevado, pois a diferença entre o estado estável e a conformação de partida pode ser grande. No entanto, sua flexibilidade pode não o ser. Assim, utiliza-se como uma das medidas da flexibilidade de resíduos (ou átomos) em uma dada estrutura a flutuação quadrática média (RMSF, do inglês *root mean square fluctuation*) de cada resíduo. Esta análise permite que se veja a flutuação da posição atômica em comparação à configuração original, independente de tempo. Isso permite identificar os resíduos mais variáveis (flexíveis) com o passar da simulação, além de poder indicar a perda de estrutura secundária com valores elevados (VERLI, 2014). No Capítulo II, utilizamos a diferença entre RMSF do peptídeo glicosilado

em relação ao não-glicosilado, de forma que valores positivos indiquem que a glicosilação aumenta a flexibilidade do resíduo, e valores negativos indiquem o enrijecimento do mesmo.

- **Análise de estrutura secundária:** Sendo a conformação de partida uma hélice- α , valores de RMSD e RMSF baixos sugerem fortemente a estabilidade desta estrutura secundária e, por conseguinte, a manutenção de um arcabouço molecular potencialmente útil terapeuticamente. Contudo, uma estrutura do tipo hélice- α apresenta características específicas, como diâmetro de cada volta, incremento no comprimento da hélice a cada volta e um padrão de interações por ligação de hidrogênio entre os resíduos de duas voltas consecutivas. As características de RMSD e RMSF mencionadas acima podem ser alcançadas sem que todos os critérios para a ocorrência de uma hélice- α sejam atendidos, produzindo arcabouços moleculares semelhantes mas não equivalentes a hélice- α . Para tanto, empregam-se ferramentas de análises específicas, como o conteúdo de hélice (do inglês *helicity*) e medidas mais amplas de tipos de estrutura secundária (DSSP). A ferramenta *helix* realiza uma série de análises em hélices, incluindo conteúdo de hélice (HIRST; BROOKS, 1994), que verifica um pico característico no dicroísmo circular (CD) específico de hélices- α , a 222 nm. Esta análise indica a porcentagem de tempo da simulação que cada resíduo permaneceu com essa estrutura secundária, permitindo verificar o efeito da adição dos grampos na conformação dos resíduos. A análise de DSSP calcula a evolução de estruturas secundárias durante a simulação, incluindo hélices- α , estruturas desordenadas, folhas- β e outros tipos de hélices, a partir do padrão de ligações dos hidrogênios da proteína (KABSCH; SANDER, 1983).
- **Dicroísmo circular teórico:** Dados de CD foram empregados para a validação experimental dos resultados obtidos. Este método permite a análise não-destrutiva do conteúdo de estrutura secundária de uma amostra, através da incidência de luz circularmente polarizada em um cromóforo quiral. A absorção diferencial da luz polarizada para a direita e para a esquerda de uma série de cromóforos gera um espectro de CD. Para proteínas, pode-se utilizar a ligação peptídica, que absorve luz na região do ultravioleta distante (240 nm a 180 nm), como cromóforo (KELLY; PRICE, 2000). Há perfis bem definidos para algumas estruturas, permitindo a análise de mudanças na estrutura secundária da amostra 11.

Hélices- α possuem alguns picos característicos, como uma banda positiva em 190 nm e duas bandas negativas em 208 e 222 nm, sendo as duas primeiras resultantes da transição $\pi \rightarrow \pi^*$, e a última da transição $n \rightarrow \pi^*$. Como uma das principais características de peptídeos grampeados é o aumento do conteúdo de hélice, a análise do perfil de CD permite avaliar o sucesso dessa metodologia nesse aspecto. Dados experimentais de CD estavam previamente disponíveis para os sistemas estudados (SHIM; KIM; VERDINE, 2013) e, para os sistemas simulados, foram gerados espectros teóricos de CD através do servidor DichroCalc (BULHELLER; HIRST, 2009). Nos últimos 100 ns de cada simulação,

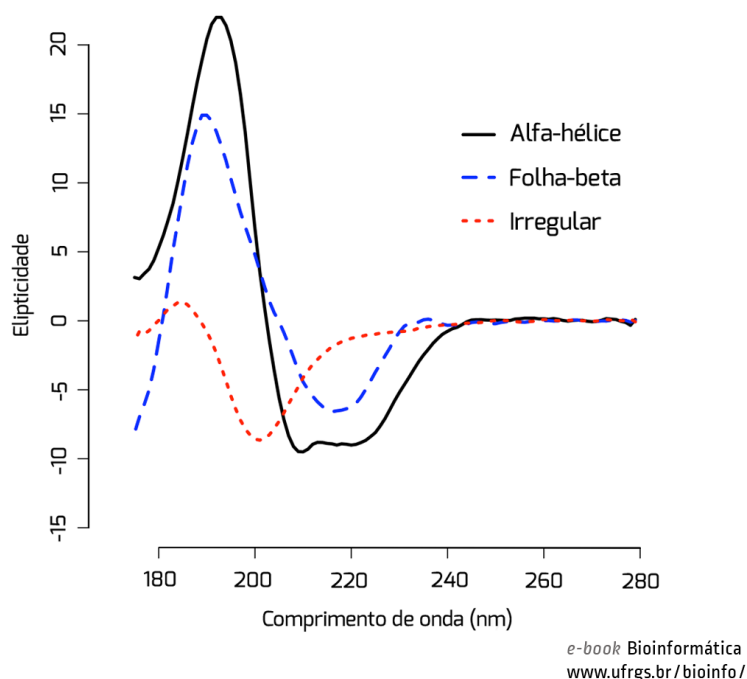


Figura 11 – Perfil de CD de algumas estruturas secundárias. Reproduzido de (VERLI, 2014).

foram selecionadas conformações a cada 10 ns, resultando em 10 conformações por simulação. Tal estratégia partiu da suposição de que a etapa final das simulações seria mais representativa da situação observada experimentalmente. A obtenção de perfis a cada 10 ns foi adotada para evitar possíveis vieses causados pela aferição do perfil de CD apenas para a conformação final de cada simulação. Todas foram submetidas ao DichroCalc, e foi realizada a média dos espectros obtidos. Após, foi feita a média dos resultados das triplicatas de cada simulação, gerando uma média dos últimos 100 ns para cada sistema em cada campo de força.

- Exploração do espaço conformacional: No Capítulo II, as trajetórias das triplicatas de cada simulação foram concatenadas, gerando uma trajetória de 3 μ s por peptídeo. Concatenando trajetórias de interesse, a covariância foi calculada, e os autovetores foram utilizados para gerar gráficos de superfície de energia livre (FEL, do inglês *Free-Energy Landscape*). Com a covariância calculada para as trajetórias de diferentes tipos de glicosilação, por exemplo, é possível ver de que maneira esses sistemas distintos exploram o mesmo espaço conformacional.
- Interações interatômicas: No Capítulo II, interações entre grupos específicos foram observadas através do uso das seguintes ferramentas do pacote Gromacs: hbond, pairdist, e energy. Hbond permite observar as ligações de hidrogênio possíveis entre dois grupos durante a trajetória; pairdist fornece a distância entre um par de átomos ao longo do tempo; e energy possibilita calcular as energias de interação ao longo da trajetória.

4 Resultados

4.1 Capítulo I: Descrição computacional de peptídeos grampeados

4.1.1 Preâmbulo

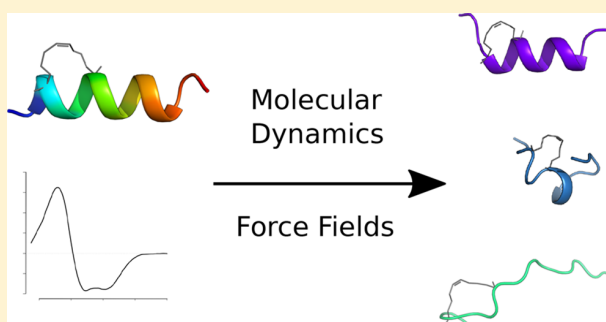
O uso de peptídeos como fármacos frequentemente esbarra em problemas de manutenção de sua estrutura fora do arcabouço proteico, requerendo estratégias que garantam que a estrutura secundária se conserve. Em particular, a manutenção de hélice- α pode se dar pela adição de grampos de hidrocarbonetos, ligando uma ou mais voltas de hélice. Embora muitos estudos experimentais tenham sido realizados com essas modificações em peptídeos, de forma a verificar que há o aumento do conteúdo de hélice, o comportamento estrutural do peptídeo ao longo do tempo não é conhecido. No artigo publicado no *Journal of Chemical Information and Modeling* (VILLAVICENCIO; LIGABUE-BRAUN; VERLI, 2018), comparam-se peptídeos baseados em RNase A com diferentes tipos de grampo (SHIM; KIM; VERDINE, 2013). A descrição conformacional dessas modificações é realizada com três campos de força distintos, com simulações em triplicatas de 1 μ s, assegurando uma amostragem adequada das simulações. Além disso, duas conformações de partida foram adotadas: uma hélice- α e uma conformação estendida, de forma a permitir o acompanhamento do enovelamento. De maneira resumida, verificou-se que, através das simulações realizadas, a ação do grampo não se dá pela fixação inflexível de uma volta de hélice, e sim há a formação e o desmanche dessa volta. Dessa forma, o grampo age como nucleador de hélice, e mantém um conjunto (*ensemble*) de conformações que permitem a reformação da hélice. Isso pode ter uma série de implicações para o uso de peptídeos como fármacos, como na permeabilidade em membranas.

All-Hydrocarbon Staples and Their Effect over Peptide Conformation under Different Force Fields

Bianca Villavicencio, Rodrigo Ligabue-Braun, and Hugo Verli*[✉]

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 91500-970 Porto Alegre-RS, Brazil

ABSTRACT: Olefinic staples enhance α -helical content and conformational stability in peptides, maintaining a structural scaffold that allows the emulation of specific regions of protein surfaces for therapeutical purposes. The ability to anticipate the efficacy of adding a staple to a peptide through computational simulations may contribute to lowering the costs associated with rational drug design. We evaluated the capabilities of different force fields to reproduce the effect of all-hydrocarbon staples in molecular dynamics simulations. Using the AMBER99SB-ILDN, CHARMM36, and GROMOS54A7 force fields and two distinct initial conformations, we compared our results to experimentally obtained circular dichroism data. The GROMOS54A7 united-atom force field seems to be more accurate compared with all-atom force fields, despite being unable to reproduce the effect of the staple in some of the simulated systems. With further force field enhancements, MD simulations may be used to anticipate conformational effects of all-hydrocarbon staples in peptides.



INTRODUCTION

Protein–protein interactions (PPIs) mediate pivotal cellular pathways that might be altered by diseases, making them attractive therapeutic targets.^{1–3} PPI interfaces are typically large and flat and comprise multiple hotspots that may be targeted by potential inhibitors.⁴ Small “drug-like” molecules, despite being orally available and able to cross cell membranes, face difficulties in modulating PPIs because of their reduced area of contact with the target.⁵ On the other hand, protein-based biologic drugs can complement and interact with PPI surfaces, binding with high affinity and selectivity, but are restricted to the extracellular medium because of their large size, which hinders membrane crossing.⁶ Furthermore, they are usually not orally available, may generate hypersensitivity reactions, and are hard to produce on a large scale.^{2,7}

Standing in between these two classes, peptides are promising candidates for PPI modulation since they allow the research and use of established knowledge on the interaction with the target, using their reasonable surface area to interact with multiple hotspots; on the other hand, their smaller size allows membrane crossing, enabling them to reach intracellular targets.⁸ Comparatively, they have better temperature stability and lower manufacturing costs than biologics and lower toxicity than small molecules. However, unmodified peptides are considered poor drug candidates because they easily lose their biologically relevant conformation when crossing membranes and entering the cellular environment, making them structures of interest for the application of stabilizing methods.^{9,10}

One way to overcome peptide unfolding is through the addition of an all-hydrocarbon staple linking two or more turns

of an α -helix,¹¹ which allows the maintenance of its bioactive conformation. Experimental studies with these so-called “stapled peptides”, obtained by the method of ring-closing olefin metathesis,¹² observed increases in helical content, affinity to the target, ability to cross membranes, protease resistance, structural stability both in vitro and in vivo, and efficacy in animal models of human disease.¹³ Modifications that alter the peptide characteristics include staple size and position,¹⁴ stereochemistry,¹⁵ positioning of the double bond,¹⁶ and charge.¹⁷

The most widely used staples are $S_{i,i+4}S_{(8)}$ and $R_{i,i+3}S_{(8)}$, both with eight carbon atoms. Smaller staples are less susceptible to aggregation, but six-carbon staples are chemically unfeasible in the $i, i + 4$ configuration;¹¹ an alternative to the well-established eight-carbon staples is the use of an $i, i + 3$ six-carbon configuration.¹⁸

Recently, the stapled peptide ALRN-6924, developed by Aileron Therapeutics, was shown to be able to inhibit the interaction between MDM2/MDM4 and p53, reactivating the latter and suppressing tumoral growth in vitro and in vivo,¹⁹ and is currently undergoing clinical trials. Other targets that have been accessed by stapled peptides include leukemia,²⁰ HIV,^{21,22} hepatitis C,²³ and respiratory syncytial virus,^{24,25} among other proteins involved in diseases,^{26–29} including small multidomain proteins³⁰ and antimicrobial peptides.³¹ Several of these studies have yielded promising results in experimental tests, showing the improvements required by the peptides in order to become potential drug candidates.³²

Received: June 21, 2018

Published: August 10, 2018

Table 1. Simulated Systems

| Initial Conformation | | Staple | All-Atom Force Fields | United-Atom Force Field |
|----------------------|-----------|-----------|-----------------------|-------------------------|
| HC | Unstapled | U — | | |
| | 6-Carbon | R5S3 | | |
| | | R3S5 | | |
| | | R5S5 | | |
| | 8-Carbon | R5S5 | | |
| | | Unstapled | U — | |
| 6-Carbon | | R5S3 | | |
| | R3S5 | | | |
| | R5S5 | | | |
| 8-Carbon | R5S5 | | | |

In this context, obtaining fast and reliable information about such systems with minimal cost would help develop their application to novel targets,³³ especially in the preclinical phase, when selection and optimization of a few candidates and leads from thousands of compounds is required.^{34,35} The use of molecular dynamics (MD) simulations to study stapled peptides may provide information at the atomistic level on the conformational behavior of different types of staples in solution.^{33,36} However, despite the vast amount of experimental data, few studies have applied computational approaches to inspect stapled peptides,^{33,37–43} and none of them have compared the use of different force fields in the description of such modifications. The use of suitable parameters in stapled peptide simulations can greatly accelerate research, generating reliable information that can guide future studies in rational drug design and protein engineering.⁴⁴ The use of staples could lead to protein stabilization, which can be useful for medical research, diagnostics, and imaging,⁴⁵ production and enhancement of biomaterials,⁴⁶ and regenerative medicine.⁴⁷ In an effort to evaluate the reliability of MD simulation predictions for stapled peptides, we compared the computational descriptions of such systems by three different force fields (AMBER99SB-ILDN,⁴⁸ CHARMM36,⁴⁹ and GROMOS54A7⁵⁰) with a set of experimentally obtained data available in the literature, ultimately evaluating the ability of MD to anticipate the conformational effect of olefin staples.

■ MATERIALS AND METHODS

Peptide Modeling. We used the RNase A-based peptide EWAETAAAKFLAAHA because of its partial helical content in solution.¹¹ In order to reinforce the capability of MD to describe the role of staples in the stabilization of α -helical structures, we used two initial conformations: an “ideal” α -helix (helical conformation, HC) with 3.6 residues per turn and a “linear” structure (linear conformation, LC) with one turn of a helix, allowing the staple to be formed in the same position as the helical peptides. HC was built with PyMOL,⁵¹ and its helical turn between residues 4 and 7 served as a template for the creation of LC on Modeller9v14.⁵² The structure with less superposition to HC, except for the turn, was chosen to be LC. These were used for the unstapled peptide simulations and also as templates for the construction of the stapled peptides.

Staple Modeling. In order to build the staple, we constructed modified amino acids to replace specific residues on the peptide. Starting with a lysine residue, we substituted the H α with a methyl group and the side chain with one of the following: A three-carbon chain with a cis double bond between the second and third carbons; a saturated three-carbon chain; or a five-carbon chain with a cis double bond between the third and fourth carbons. For each, we also built the respective stereoisomer by switching the methyl and side-chain substitutions, therefore creating R and S residues.

On the basis of the parameters for amino acid backbones used by the AMBER99SB-ILDN, CHARMM36, and GRO-

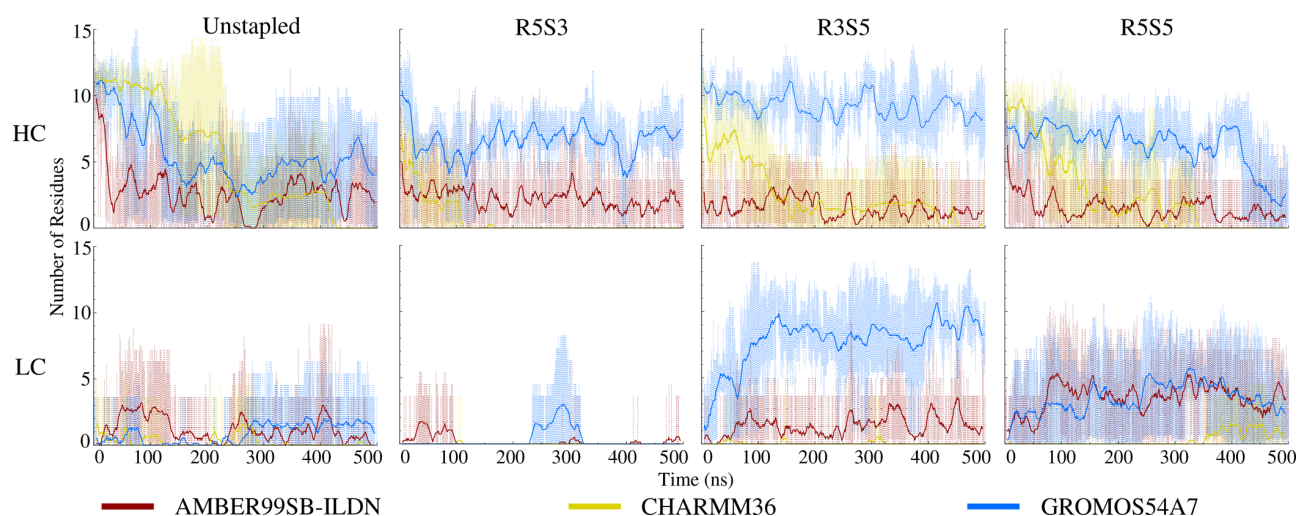


Figure 1. α -Helical content of simulated peptides per force field. Running averages on the mean number of residues in α -helical conformation throughout the simulations and their standard deviations are shown.

MOS54A7 force fields, we built the modified residues. The methyl group was described by the side chain of an alanine, and we used parameters previously described for the lipid POPG in the AMBER99SB-ILDN,⁵³ CHARMM36,⁵⁴ and GROMOS54A7^{55,56} force fields to represent the double bond.

With these pieces, we proceeded to build the three stapled peptides. The fourth and the seventh residues of the initial peptide were replaced by the modified amino acids. The peptide with the three-carbon side chain with a double bond at the fourth position and the three-carbon side chain without a double bond at the seventh position ($R_{i,i+3}S_{(6)}$) was called R3SS, the one with the double bond in the residue at the seventh position ($R_{i,i+3}S_{(6)}$) was called R5S3, and the one with the five-carbon side chain with the double bond at the fourth position and a three-carbon residue with no double bonds ($R_{i,i+3}S_{(8)}$) was called R5S5. The staple-forming side chains were rotated to be as close as possible to one another.

Molecular Dynamics Simulations. All of the simulations were based on previously described procedures⁵⁷ using the GROMACS 4.5 suite.⁵⁸ In order to “close” the staple, we manually added a bond between the terminal carbons of each side chain of a staple residue, as well as the necessary topology information for the resulting structure, and then minimized the system to reflect the new bond. Each peptide was solvated in an octahedral water box with the recommended water models for each force field: SPC⁵⁹ for GROMOS54A7 and TIP3P⁶⁰ for the all-atom force fields. Periodic boundary conditions were employed, and sodium counterions were added to neutralize the systems. The LINCS algorithm was used to constrain covalent bonds⁶¹ in order to allow an integration step of 2 fs, while electrostatic interactions were calculated using the particle mesh Ewald method⁶² using 10 Å as the cutoff for Coulomb and van der Waals radii. Each system was submitted to energy minimization steps using the steepest-descent algorithm in order to accommodate the staple, water molecules, and side chains. For each system, we ran three independent simulations of 500 ns at 293 K starting with different initial velocities in order to reduce the influence of low-probability events on the simulations’ average properties.⁶³

Structural Analyses. The presented results reflect the mean behavior of the peptides through the three independent

simulations. Analyses of the simulated peptides were performed with GROMACS, evaluating the backbone and residue conformational behavior through root-mean-square deviations (RMSDs) and fluctuations (RMSFs), the helical content of each residue per percentage of time (helicity), and the mean percentage of helical structure for the whole peptide as well as the evolution of secondary structures through the simulation based on hydrogen-bonding patterns (DSSP).^{64,65} Theoretical circular dichroism (CD) spectra were calculated using the DichroCalc server⁶⁶ for every 10 ns of simulation, and the final representation was produced as the average from all of the simulations of each peptide. The first 100 ns of the simulation were considered as an extended equilibration phase and were discarded from the calculations of RMSF, helicity, and CD to avoid interference with the average properties of each residue evaluated.

RESULTS AND DISCUSSION

Simulated Systems. Peptides derived from RNase A with three different types of staples¹¹ and their unmodified, unstapled versions were described with two types of force fields, namely, all-atom, represented by AMBER99SB-ILDN and CHARMM36, and united-atom, represented by GROMOS54A7. The initial systems are described in Table 1. Starting from a helical conformation (HC), their ability to maintain an α -helical secondary structure was assessed; in addition, peptides starting from a linear conformation (LC) were used to evaluate the ability to fold into a helical structure and to replicate the behavior of HC peptides. Each system was simulated in triplicates of 500 ns, resulting in a 3 μ s time scale for each staple in each force field.

Peptide Folding and the Conformational Influence of Staples. In order to verify whether staples contribute to helical maintenance, we performed DSSP analyses in HC peptides (Figure 1a). The number of residues kept in a helical conformation in each stapled peptide varied according to the force field used, with GROMOS54A7 showing overall maintenance of helical content compared with the unstapled counterparts. As for the ability to fold into a helix starting from a coiled conformation, LC peptides mostly did not show an increased number of α -helical residues compared to the initial

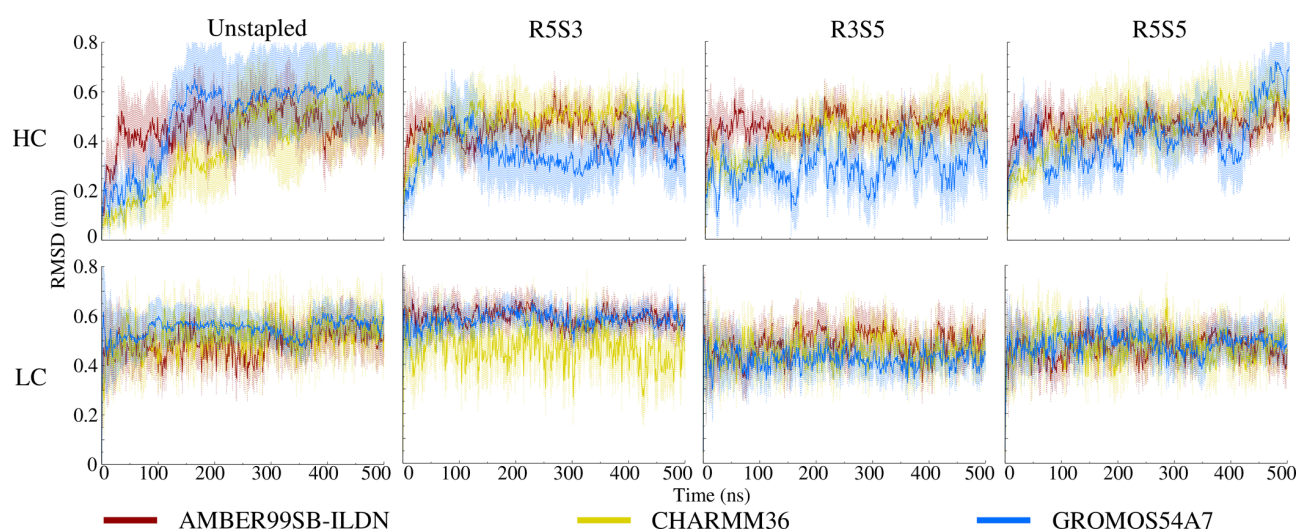


Figure 2. Changes in backbone structure in comparison with the initial structures HC and LC. Running averages on mean RMSD and standard deviations throughout the simulations are shown.

Table 2. Average Helical Content (%) and Standard Deviation Per Peptide for the Initial Helical Conformation (HC) and Linear Conformation (LC) in Experimental and Computational Assessments

| peptide | exptl (%) | AMBER99SB-ILDN | | CHARMM36 | | GROMOS54A7 | |
|---------|-----------|----------------|------------|-------------|-----------|-------------|-------------|
| | | HC (%) | LC (%) | HC (%) | LC (%) | HC (%) | LC (%) |
| U | 25 | 8.3 ± 10.5 | 3 ± 4 | 33.5 ± 21.3 | 0.8 ± 1.5 | 20.8 ± 21.1 | 0 ± 0 |
| R5S3 | 15114 | 2.9 ± 3.5 | 0.1 ± 0.1 | 0.2 ± 0.5 | 0 ± 0 | 35.6 ± 25.9 | 1.5 ± 2.9 |
| R3S5 | 55141 | 1.3 ± 1.7 | 1.3 ± 1.3 | 8.6 ± 13.8 | 0 ± 0 | 53 ± 28.3 | 49.3 ± 29.6 |
| R5S5 | 74 | 0.7 ± 0.8 | 8.7 ± 12.3 | 6.1 ± 9.5 | 1.9 ± 4.1 | 32.5 ± 25.7 | 19.5 ± 20.9 |

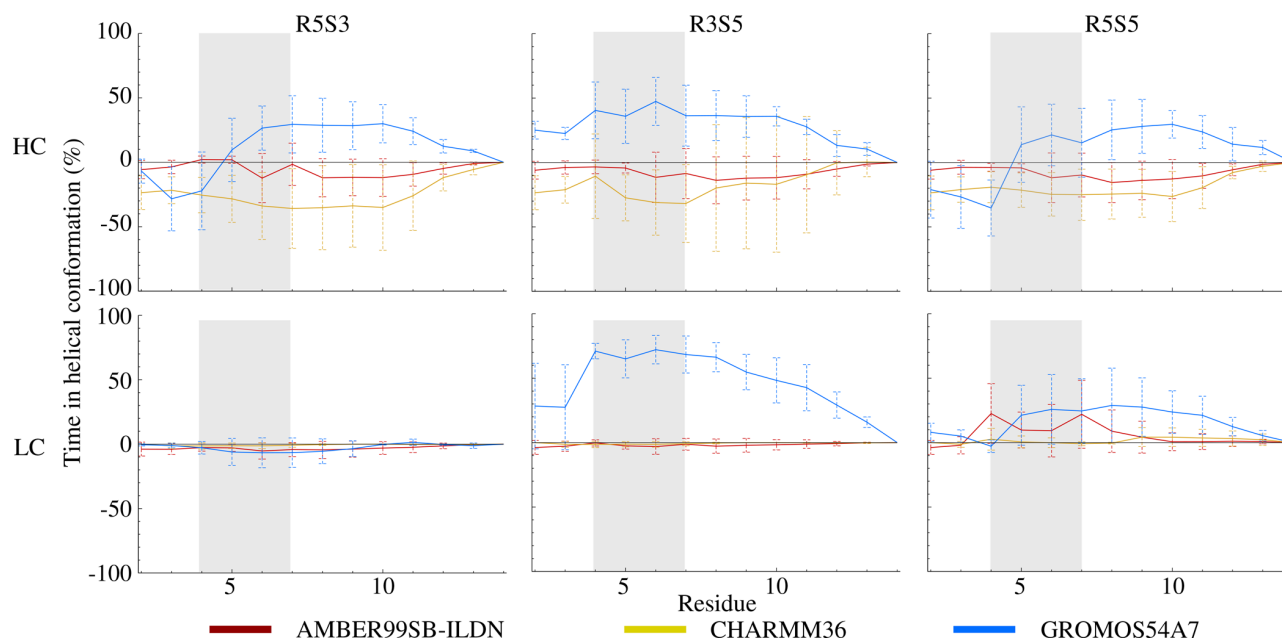


Figure 3. Residue contribution to helical conformation. The average percentage of time in a helical conformation per residue and the standard deviation is shown for each stapled peptide in relation to the unstapled version. Positive and negative values indicate that the staple acquires more or less helical structure, respectively. The area enclosed by the staple is shaded.

helix turn in both the stapled and unstapled systems, with the exception of R3S5 with GROMOS54A7 and R5S5 with both AMBER99SB-ILDN and GROMOS54A7 (Figure 1b). It appears that the coil–helix transition is harder to achieve for

most of the used force fields, with GROMOS54A7 being the only force field to show similar behavior between the HC and LC versions of R3S5 and R5S5. AMBER99SB-ILDN also showed a similar number of helical residues in the HC and LC

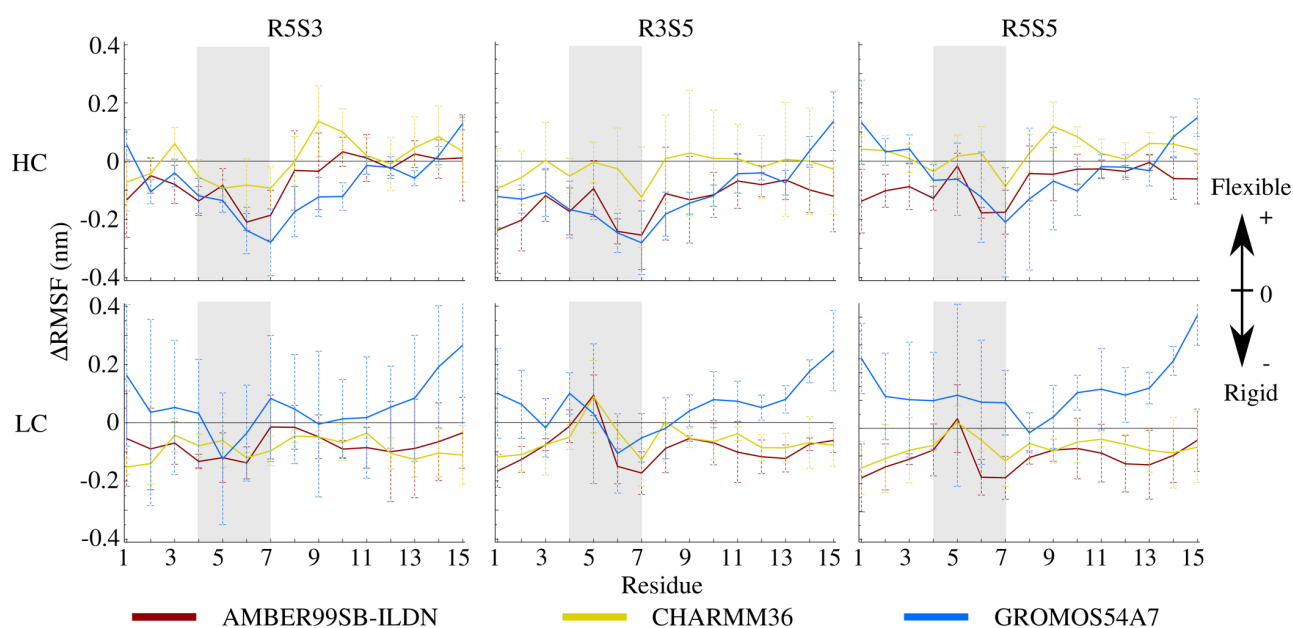


Figure 4. Differential fluctuations of stapled peptides compared with their unstapled versions. Positive values indicate that the stapled version is more flexible than the unstapled one, while negative values indicate more rigidity. The area enclosed by the staple is shaded.

versions of the same peptides, but this number was too low to account for at least one helical turn. The successive gain and loss of α -helical structure appears to support the claim that staples act as nucleators of α -helices instead of constraining a rigid structure.⁴¹ In regard to the unstapled versions of the peptides, none of them was able to maintain the initial number of residues detected as α -helices, indicating partial or total loss of secondary structure. Correlating with the higher number of helical residues maintained, the backbones of HC-stapled peptides simulated with GROMOS54A7 distanced themselves less from their initial structures compared with those using all-atom force fields (Figure 2). The same cannot be said for LC peptides, since lower values did not necessarily correlate to helix acquisition.

For the average helical content of the whole peptide (Table 2), GROMOS54A7 fits the experimentally determined values better than simulations with all-atom force fields in most systems, even if not closely in R5S3 and R5S5. The two experimental average values for R5S3 and R3S5, due to the nondetermination of *cis* and *trans* configurations,¹⁸ provide an interval of helicity achieved by simulations of R3S5 with GROMOS54A7.

As for force field performance, CHARMM36 was found to be inadequate for simulating these stapled peptides, with almost complete loss of secondary structure by 100 ns of simulation. AMBER99SB-ILDN did not show evident differences between the stapled and unstapled versions of HC peptides but was able to acquire and maintain a low helical content for most of the LC peptides. The overall performance of GROMOS54A7 allowed the acquisition and maintenance of several helical residues in most simulations, including the unstapled and R5S3 peptides, which should present loss of structure.

In order to better understand the effect of the staple on the conformation of the peptides, we analyzed the contribution of each residue to the α -helical conformation through the helicity per time percentage (Figure 3). Among the simulated force

fields, GROMOS54A7 was the only one that consistently allowed a greater helical character in all of the stapled peptides compared with their unstapled versions, only failing to do so for R5S3, which also did not enhance the helical content experimentally. It was also the only force field that presented results consistent with previous studies indicating that amino acid residues adjacent to or enclosed by the staple have a higher probability to be in a helical conformation,⁴¹ even if residue 4 is considered poorly helical. Simulations with AMBER99SB-ILDN consistently presented a low number of helical residues but showed no evident differentiation between staples. Furthermore, comparisons of RMSFs for the stapled and unstapled systems show higher rigidity on HC peptides with AMBER99SB-ILDN and GROMOS54A7 (Figure 4). LC peptides, on the other hand, show higher flexibility with GROMOS54A7, possibly allowing the exploration of broader conformational spaces, which could facilitate the adoption of secondary structures by the stapled systems.

Taken together, these analyses indicate that the maintenance of a coherent helical structure is related to the rigidity of part of the region enclosed by the staple and surrounding residues toward the middle of the peptide. Previous computational studies with RNase A showed a higher probability of an amino acid adjacent to or between the modified amino acids to be in a helical conformation.⁴¹ Such a probability would translate as lower RMSF values and helicity in the peptides R5S5 and R3S5 compared with the unstapled peptide. Indeed, this is the case for GROMOS54A7, with the exception of the R5S5 peptide. However, for a 12-carbon staple encompassing two helical turns in the stereochemical configuration *R,S*, *cis* and *trans* double bonds yielded different degrees of helix stabilization, which might be the case for R5S5 as well.¹¹ Further simulations with *trans* configurations might shed light on this issue, for they could provide enhanced rigidity that appears to be lacking in this particular peptide.

Comparison to Experimental Data. Through the use of theoretical circular dichroism prediction, we were able to

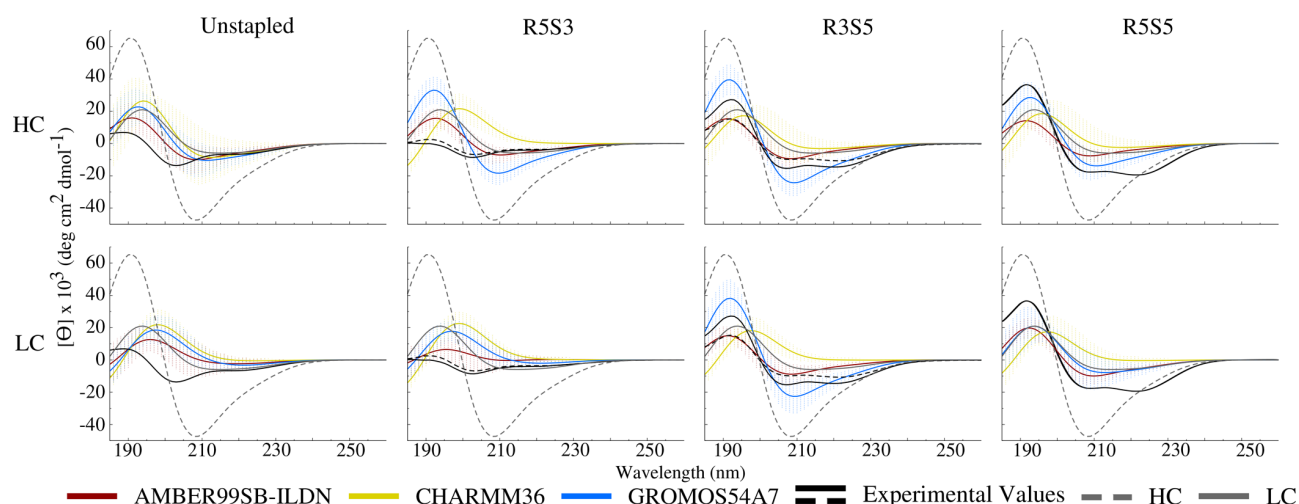


Figure 5. Validation of simulations by comparison with experimentally obtained circular dichroism (CD) spectra.¹⁸ Theoretical CD was calculated using DichroCalc for simulated systems. The spectra for the initial structures HC and LC are included for comparison.

compare the average CD profile for every peptide in our computational simulations to experimentally obtained data¹⁸ (Figure 5). The characteristic peaks of an α -helical CD spectrum at 208 and 222 nm are not well resolved in the theoretical calculations because of limitations of the algorithm, which disregards amide $n-\pi^*$ transitions, characteristic of the region at 220 nm.⁶⁷ However, the theoretical spectrum of HC still works as a guide for α -helix detection, especially because it matches the α -helical peak at 190 nm; in addition, at the wavelength of 220 nm, the accuracy of theoretical CD agrees almost quantitatively with experimental results.⁶⁶

The unstapled experimental spectrum indicates loss of secondary structure, which is also estimated for the peptide simulations, even though they are not identical. The best staple, in peptide R5S5, should have the spectrum most similar to an α -helical one, and this is met by GROMOS54A7, albeit to a lesser extent than experimental data and HC. This tendency to exhibit smaller peaks compared with experimental results was also detected in the development of *ab initio* parameters for proteins with a predominance of α -helices.⁶⁷

Stapled peptides using GROMOS54A7 were able to match the experimentally determined spectra better than those using all-atom force fields. While simulations of R3S5 with AMBER99SB-ILDN matched the spectrum with the lowest value, GROMOS54A7 was able to agree with the peak at 193 nm of both resulting spectra and to cross them at 220 nm, which coincides quantitatively with experimental results, as expected by the use of DichroCalc.⁶⁶ LC R5S5 peptides yielded similar results with both AMBER99SB-ILDN and GROMOS54A7, but the former did not show the same behavior with HC peptides.

Force Field Performance in Simulating Stapled Peptides. This study allowed for the comparison of all-atom and united-atom approaches in the description of stapled peptides. The two all-atom force fields had dramatically different results between themselves, with CHARMM36 losing all secondary structure and AMBER99SB-ILDN retaining partial helical structure. GROMOS54A7, with a united-atom approach, agreed in part with the experimental data.

AMBER99SB-ILDN showed similar low helical contents in all of the HC stapled peptides and was unable to replicate the differences between staples. However, evidence of α -helical

formation and maintenance was shown for the LC peptides R3S5 and R5S5, especially in residues enclosed by the staple, even if the results did not agree quantitatively with experimental data. While the use of a force field that tends to maintain helical structures could reproduce the experiments better, such as AMBER ff03,⁶⁸ this force field is considered less accurate than 99SB-ILDN. When comparing force fields in folding events, AMBER99SB-ILDN was able to fold both an α -helical and a β -sheet protein while ff03 was not.⁶⁹ To use a force field that overpopulates helical conformations would bias our assessment by introducing artifacts. To have an assessment of the reproducibility of the addition of stapled peptides in a robust, widely used force field such as 99SB-ILDN is valuable for future studies that may choose a more adequate force field for general situations, such as the simulation of a stapled peptide interacting with its target.

Peptides simulated with CHARMM36 could neither acquire nor maintain a helical structure for more than 100 ns, indicating their inadequacy to simulate stapled peptides in the employed time frame. This tendency to lose structure could result from the correction of CHARMM22^{70,71}/CMAP,⁷² which had the tendency to strongly maintain α -helices. The CHARMM36 version employed weakly structured peptides obtained by NMR spectroscopy as the basis for adjusting the force field parameters through optimization of CMAP and side-chain torsion potentials.⁴⁹ The use of CHARMM36 over the previous version is advised for protein simulations and was shown to be suitable for simulating α -helical nucleation,⁷³ but although it appeared to adequately describe short helix-forming peptides, the same was not observed for the larger peptides used in the current study.

GROMOS54A7 showed the capability to both maintain and acquire α -helical structures but did not always reproduce the conformational changes reported for experimental data. The peptides R3S5 and R5S3 differ only in the position of the double bond in the hydrocarbon staple but experimentally show dramatically different profiles, with the first enhancing helical content in an RNase A-derived peptide and the latter having no effect. A possible cause for this issue is the use of too-similar parameters for both R3S5 and R5S3 that seem to favor the maintenance of α -helices. Indeed, GROMOS54A7 tends to convert 3_{10} -helices into α -helices, suggesting a

tendency to stabilize the latter.⁵⁰ On the other hand, AMBER99SB-ILDN underestimates the stability of α -helices in a 15 amino acid peptide.⁶⁹ Perhaps a better adjustment of the existing parameters to reflect experimentally obtained data would provide better results. Since several computational studies of stapled peptides have used AMBER force fields, this bias should be taken into account when interpreting the results. Furthermore, while a comparison of force fields in the description of unstapled PPIs showed agreement between computational and experimental data,⁷⁴ the same was not observed for the stapled systems, increasing the need for caution when relying on the correct force field description of stapled peptides in research of PPI modulation.

It seems that even though it does not agree with all of the data, GROMOSS4A7 still reflects the dynamics of stapled peptides better than the all-atom force fields used in this work. Besides correcting the underestimation of helical content of its predecessor 53A6,^{50,75} GROMOSS4A7 combined with the long-range electrostatic method particle mesh Ewald also reflects the unstructured behavior of intrinsically disordered peptides better than the AMBER all-atom force fields tested, indicating that it might not be an overcorrection.⁷⁶ Furthermore, a study showed that united-atom strategies might sample conformations more efficiently than all-atom models,⁷⁷ which may allow simulations to visit a higher number of conformations in the same computational time, which in turn might better reflect experimental data. In addition, united-atom models reduce the system's size without reducing its complexity, resulting in fewer nonbonded interactions and internal degrees of freedom, which in turn translates into a lower computational cost. While this might be negligible in small systems such as peptides, it allows the investigation of complex systems with several thousand atoms with high computational cost, such as PPIs.

In conclusion, we have evaluated the performance of different force fields in the description of stapled peptides. Although we did not find an absolute best force field, GROMOSS4A7 had the most adequate performance. With further enhancements and possibly the development of specific parameters, it can become a reliable tool to anticipate the structural behavior of the addition of staples to α -helices.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: hverli@cbiot.ufgrs.br. Address: Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Avenida Bento Gonçalves 9500, Prédio 43431, Sala 202, Caixa Postal 15005, CEP 91500-970 Porto Alegre-RS, Brazil.

ORCID

Hugo Verli: 0000-0002-4796-8620

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge UFRGS, CBiot, CESUP, and the funding agencies CAPES, CNPq, and FAPERGS for allowing this project to happen.

REFERENCES

- (1) Zinzalla, G.; Thurston, D. E. Targeting Protein–Protein Interactions for Therapeutic Intervention: A Challenge for the Future. *Future Med. Chem.* **2009**, *1* (1), 65–93.
- (2) Tsomaia, N. Peptide Therapeutics: Targeting the Undruggable Space. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *94*, 459–470.
- (3) Valeur, E.; Guéret, S. M.; Adihou, H.; Gopalakrishnan, R.; Lemurell, M.; Waldmann, H.; Grossmann, T. N.; Plowright, A. T. New Modalities for Challenging Targets in Drug Discovery. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, *56* (35), 10294–10323.
- (4) Sperandio, O.; Reynès, C. H.; Camproux, A.-C.; Villoutreix, B. O. Rationalizing the Chemical Space of Protein–Protein Interaction Inhibitors. *Drug Discovery Today* **2010**, *15* (5–6), 220–229.
- (5) Falchi, F.; Caporuscio, F.; Recanatini, M. Structure-Based Design of Small-Molecule Protein–Protein Interaction Modulators: The Story so Far. *Future Med. Chem.* **2014**, *6* (3), 343–357.
- (6) De Souza, E. B.; Cload, S. T.; Pendergrast, P. S.; Sah, D. W. Y. Novel Therapeutic Modalities to Address Nondrugable Protein Interaction Targets. *Neuropsychopharmacology* **2009**, *34* (1), 142–158.
- (7) Verdine, G. L.; Walensky, L. D. The Challenge of Drugging Undruggable Targets in Cancer: Lessons Learned from Targeting BCL-2 Family Members. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13* (24), 7264–7270.
- (8) Benyamini, H.; Friedler, A. Using Peptides to Study Protein–protein Interactions. *Future Med. Chem.* **2010**, *2* (6), 989–1003.
- (9) Azzarito, V.; Long, K.; Murphy, N. S.; Wilson, A. J. Inhibition of α -Helix-Mediated Protein–protein Interactions Using Designed Molecules. *Nat. Chem.* **2013**, *5* (3), 161–173.
- (10) Rezaei Araghi, R.; Keating, A. E. Designing Helical Peptide Inhibitors of Protein–Protein Interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2016**, *39*, 27–38.
- (11) Schafmeister, C. E.; Po, J.; Verdine, G. L. An All-Hydrocarbon Cross-Linking System for Enhancing the Helicity and Metabolic Stability of Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (24), 5891–5892.
- (12) Blackwell, H. E.; Grubbs, R. H. Highly Efficient Synthesis of Covalently Cross-Linked Peptide Helices by Ring-Closing Metathesis. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, *37* (23), 3281–3284.
- (13) Walensky, L. D.; Bird, G. H. Hydrocarbon-Stapled Peptides: Principles, Practice, and Progress. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (15), 6275–6288.
- (14) Kim, Y.-W.; Kutchukian, P. S.; Verdine, G. L. Introduction of All-Hydrocarbon *i,i+3* Staples into α -Helices via Ring-Closing Olefin Metathesis. *Org. Lett.* **2010**, *12* (13), 3046–3049.
- (15) Kim, Y.-W.; Verdine, G. L. Stereochemical Effects of All-Hydrocarbon Tethers in *i,i+4* Stapled Peptides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19* (9), 2533–2536.
- (16) Pham, T. K.; Yoo, J.; Kim, Y.-W. Comparison of Oct-2-Enyl and Oct-4-Enyl Staples for Their Formation and α -Helix Stabilizing Effects. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2013**, *34* (9), 2640–2644.
- (17) Bernal, F.; Tyler, A. F.; Korsmeyer, S. J.; Walensky, L. D.; Verdine, G. L. Reactivation of the p53 Tumor Suppressor Pathway by a Stapled p53 Peptide. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (9), 2456–2457.
- (18) Shim, S. Y.; Kim, Y.-W.; Verdine, G. L. A New *i,i+3* Peptide Stapling System for α -Helix Stabilization. *Chem. Biol. Drug Des.* **2013**, *82* (6), 635–642.
- (19) Chang, Y. S.; Graves, B.; Guerlavais, V.; Tovar, C.; Packman, K.; To, K.-H.; Olson, K. A.; Kesavan, K.; Gangurde, P.; Mukherjee, A.; Baker, T.; Darlak, K.; Elkin, C.; Filipovic, Z.; Qureshi, F. Z.; Cai, H.; Berry, P.; Feyfant, E.; Shi, X. E.; Horstick, J.; Annis, D. A.; Manning, A. M.; Fotouhi, N.; Nash, H.; Vassilev, L. T.; Sawyer, T. K. Stapled α -helical Peptide Drug Development: A Potent Dual Inhibitor of MDM2 and MDMX for p53-Dependent Cancer Therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110* (36), E3445–E3454.
- (20) Moellering, R. E.; Cornejo, M.; Davis, T. N.; Del Bianco, C.; Aster, J. C.; Blacklow, S. C.; Kung, A. L.; Gilliland, D. G.; Verdine, G. L.; Bradner, J. E. Direct Inhibition of the NOTCH Transcription Factor Complex. *Nature* **2009**, *462* (7270), 182–188.
- (21) Zhang, H.; Curreli, F.; Zhang, X.; Bhattacharya, S.; Waheed, A. A.; Cooper, A.; Cowburn, D.; Freed, E. O.; Debnath, A. K. Antiviral Activity of α -Helical Stapled Peptides Designed from the HIV-1 Capsid Dimerization Domain. *Retrovirology* **2011**, *8* (1), 28.
- (22) Long, Y.-Q.; Huang, S.-X.; Zawahir, Z.; Xu, Z.-L.; Li, H.; Sanchez, T. W.; Zhi, Y.; De Houwer, S.; Christ, F.; Debyser, Z.

- Neamati, N. Design of Cell-Permeable Stapled Peptides as HIV-1 Integrase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (13), 5601–5612.
- (23) Cui, H.-K.; Qing, J.; Guo, Y.; Wang, Y.-J.; Cui, L.-J.; He, T.-H.; Zhang, L.; Liu, L. Stapled Peptide-Based Membrane Fusion Inhibitors of Hepatitis C Virus. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21* (12), 3547–3554.
- (24) Bird, G. H.; Boyapalle, S.; Wong, T.; Opoku-nsiah, K.; Bedi, R.; Crannell, W. C.; Perry, A. F.; Nguyen, H.; Sampayo, V.; Devareddy, A.; Mohapatra, S.; Mohapatra, S. S.; Walensky, L. D. Mucosal Delivery of a Double-Stapled RSV Peptide Prevents Nasopulmonary Infection. *J. Clin. Invest.* **2014**, *124* (5), 2113–2124.
- (25) Gaillard, V.; Galloux, M.; Garcin, D.; Eléouët, J.-F.; Le Goffic, R.; Larcher, T.; Rameix-Welti, M.-A.; Boukadiri, A.; Héritier, J.; Segura, J.-M.; Baechler, E.; Arrell, M.; Mottet-Osman, G.; Nyanguile, O. A Short Double-Stapled Peptide Inhibits Respiratory Syncytial Virus Entry and Spreading. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61* (4), e02241-16.
- (26) Lee, J. P.; Liu, C.; Li, T.; Zhu, G.; Li, X. Development of Stapled Helical Peptides to Perturb the Cdt1-Mcm6 Interaction. *J. Pept. Sci.* **2015**, *21* (7), 593–598.
- (27) Phillips, C.; Roberts, L. R.; Schade, M.; Bazin, R.; Bent, A.; Davies, N. L.; Moore, R.; Pannifer, A. D.; Pickford, A. R.; Prior, S. H.; Read, C. M.; Scott, A.; Brown, D. G.; Xu, B.; Irving, S. L. Design and Structure of Stapled Peptides Binding to Estrogen Receptors. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (25), 9696–9699.
- (28) Sviridov, D. O.; Ikpot, I. Z.; Stonik, J.; Drake, S. K.; Amar, M.; Osei-Hwedie, D. O.; Piszczek, G.; Turner, S.; Remaley, A. T. Helix Stabilization of Amphipathic Peptides by Hydrocarbon Stapling Increases Cholesterol Efflux by the ABCA1 Transporter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *410* (3), 446–451.
- (29) Wang, Y.; Ho, T. G.; Bertinetti, D.; Neddermann, M.; Franz, E.; Mo, G. C. H.; Schendowich, L. P.; Sukhu, A.; Spelts, R. C.; Zhang, J.; Herberg, F. W.; Kennedy, E. J. Isoform-Selective Disruption of AKAP-Localized PKA Using Hydrocarbon Stapled Peptides. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9* (3), 635–642.
- (30) Bellmann-Sickert, K.; Stone, T. A.; Poulsen, B. E.; Deber, C. M. Efflux by Small Multidrug Resistance Proteins Is Inhibited by Membrane-Interactive Helix-Stapled Peptides. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290* (3), 1752–1759.
- (31) Dinh, T. T. T.; Kim, D.-H.; Lee, B.; Kim, Y.-W. De Novo Design and Their Antimicrobial Activity of Stapled Amphipathic Helices of Heptapeptides. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2014**, *35* (12), 3632–3636.
- (32) Xie, X.; Gao, L.; Shull, A. Y.; Teng, Y. Stapled Peptides: Providing the Best of Both Worlds in Drug Development. *Future Med. Chem.* **2016**, *8* (16), 1969–1980.
- (33) Tan, Y. S.; Lane, D. P.; Verma, C. S. Stapled Peptide Design: Principles and Roles of Computation. *Drug Discovery Today* **2016**, *21* (10), 1642–1653.
- (34) Xiang, M.; Cao, Y.; Fan, W.; Chen, L.; Mo, Y. Computer-Aided Drug Design: Lead Discovery and Optimization. *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2012**, *15* (4), 328–337.
- (35) Alonso, H.; Bliznyuk, A. A.; Gready, J. E. Combining Docking and Molecular Dynamic Simulations in Drug Design. *Med. Res. Rev.* **2006**, *26* (5), 531–568.
- (36) Schlick, T. *Molecular Modeling and Simulation: An Interdisciplinary Guide*; Interdisciplinary Applied Mathematics, Vol. 21; Springer: New York, 2010.
- (37) Guo, Z.; Mohanty, U.; Noehre, J.; Sawyer, T. K.; Sherman, W.; Krilov, G. Probing the α -Helical Structural Stability of Stapled p53 Peptides: Molecular Dynamics Simulations and Analysis. *Chem. Biol. Drug Des.* **2010**, *75* (4), 348–359.
- (38) Hamacher, K.; Hübsch, A.; McCammon, J. A. A Minimal Model for Stabilization of Biomolecules by Hydrocarbon Cross-Linking. *J. Chem. Phys.* **2006**, *124* (16), 164907.
- (39) Joseph, T. L.; Lane, D. P.; Verma, C. S. Stapled BH3 Peptides against MCL-1: Mechanism and Design Using Atomistic Simulations. *PLoS One* **2012**, *7* (8), e43985.
- (40) Joseph, T. L.; Lane, D.; Verma, C. S. Stapled Peptides in the p53 Pathway: Computer Simulations Reveal Novel Interactions of the Staples with the Target Protein. *Cell Cycle* **2010**, *9* (22), 4560–4568.
- (41) Kutchukian, P. S.; Yang, J. S.; Verdine, G. L.; Shakhnovich, E. I. All-Atom Model for Stabilization of α -Helical Structure in Peptides by Hydrocarbon Staples. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (13), 4622–4627.
- (42) Lama, D.; Quah, S. T.; Verma, C. S.; Lakshminarayanan, R.; Beuerman, R. W.; Lane, D. P.; Brown, C. J. Rational Optimization of Conformational Effects Induced By Hydrocarbon Staples in Peptides and Their Binding Interfaces. *Sci. Rep.* **2013**, *3* (1), 3451.
- (43) Morrone, J. A.; Perez, A.; Deng, Q.; Ha, S. N.; Holloway, M. K.; Sawyer, T. K.; Sherborne, B. S.; Brown, F. K.; Dill, K. A. Molecular Simulations Identify Binding Poses and Approximate Affinities of Stapled α -Helical Peptides to MDM2 and MDMX. *J. Chem. Theory Comput.* **2017**, *13* (2), 863–869.
- (44) Rapaport, D. C. Molecular Dynamics Simulation: A Tool for Exploration and Discovery Using Simple Models. *J. Phys.: Condens. Matter* **2014**, *26* (50), 503104.
- (45) Grönwall, C.; Ståhl, S. Engineered Affinity Proteins—Generation and Applications. *J. Biotechnol.* **2009**, *140* (3–4), 254–269.
- (46) Collier, J. H.; Segura, T. Evolving the Use of Peptides as Components of Biomaterials. *Biomaterials* **2011**, *32* (18), 4198–4204.
- (47) Holmes, T. C. Novel Peptide-Based Biomaterial Scaffolds for Tissue Engineering. *Trends Biotechnol.* **2002**, *20* (1), 16–21.
- (48) Lindorff-Larsen, K.; Piana, S.; Palmo, K.; Maragakis, P.; Klepeis, J. L.; Dror, R. O.; Shaw, D. E. Improved Side-Chain Torsion Potentials for the Amber ff99SB Protein Force Field. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2010**, *78* (8), 1950–1958.
- (49) Best, R. B.; Zhu, X.; Shim, J.; Lopes, P. E. M.; Mittal, J.; Feig, M.; MacKerell, A. D., Jr. Optimization of the Additive CHARMM All-Atom Protein Force Field Targeting Improved Sampling of the Backbone Φ , ψ and Side-Chain χ_1 and χ_2 Dihedral Angles. *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, *8* (9), 3257–3273.
- (50) Schmid, N.; Eichenberger, A. P.; Choutko, A.; Riniker, S.; Winger, M.; Mark, A. E.; van Gunsteren, W. F. Definition and Testing of the GROMOS Force-Field Versions 54A7 and 54B7. *Eur. Biophys. J.* **2011**, *40* (7), 843–856.
- (51) *The PyMOL Molecular Graphics System*; Schrödinger, LLC: New York.
- (52) Webb, B.; Sali, A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. In *Current Protocols in Bioinformatics*; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, 2014; Vol. 47, pp 5.6.1–5.6.32.
- (53) Jämbbeck, J. P. M.; Lyubartsev, A. P. Derivation and Systematic Validation of a Refined All-Atom Force Field for Phosphatidylcholine Lipids. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116* (10), 3164–3179.
- (54) Jang, H.; Michaud-Agrawal, N.; Johnston, J. M.; Woolf, T. B. How to Lose a Kink and Gain a Helix: pH Independent Conformational Changes of the Fusion Domains from Influenza Hemagglutinin in Heterogeneous Lipid Bilayers. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **2008**, *72* (1), 299–312.
- (55) Domański, J.; Stansfeld, P. J.; Sansom, M. S. P.; Beckstein, O. Lipidbook: A Public Repository for Force-Field Parameters Used in Membrane Simulations. *J. Membr. Biol.* **2010**, *236* (3), 255–258.
- (56) Kukol, A. Lipid Models for United-Atom Molecular Dynamics Simulations of Proteins. *J. Chem. Theory Comput.* **2009**, *5* (3), 615–626.
- (57) Pedebos, C.; Arantes, P. R.; Giesel, G. M.; Verli, H. In Silico Investigation of the PglB Active Site Reveals Transient Catalytic States and Octahedral Metal Ion Coordination. *Glycobiology* **2015**, *25* (11), 1183–1195.
- (58) Pronk, S.; Páll, S.; Schulz, R.; Larsson, P.; Bjelkmar, P.; Apostolov, R.; Shirts, M. R.; Smith, J. C.; Kasson, P. M.; van der Spoel, D.; Hess, B.; Lindahl, E. GROMACS 4.5: A High-Throughput and Highly Parallel Open Source Molecular Simulation Toolkit. *Bioinformatics* **2013**, *29* (7), 845–854.
- (59) Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; Hermans, J. Interaction Models for Water in Relation to Protein

Hydration. In *Intermolecular Forces*; Pullman, B., Ed.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 1981; pp 331–342.

(60) Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79* (2), 926.

(61) Hess, B.; Bekker, H.; Berendsen, H. J. C.; Fraaije, J. G. E. M. LINCS: A Linear Constraint Solver for Molecular Simulations. *J. Comput. Chem.* **1997**, *18* (12), 1463–1472.

(62) Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle Mesh Ewald: An $N \log(N)$ Method for Ewald Sums in Large Systems. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98* (12), 10089–10092.

(63) Monticelli, L.; Sorin, E. J.; Tieleman, D. P.; Pande, V. S.; Colombo, G. Molecular Simulation of Multistate Peptide Dynamics: A Comparison Between Microsecond Timescale Sampling and Multiple Shorter Trajectories. *J. Comput. Chem.* **2008**, *29* (11), 1740–1752.

(64) Kabsch, W.; Sander, C. Dictionary of Protein Secondary Structure: Pattern Recognition of Hydrogen-Bonded and Geometrical Features. *Biopolymers* **1983**, *22* (12), 2577–2637.

(65) Touw, W. G.; Baakman, C.; Black, J.; te Beek, T. A. H.; Krieger, E.; Joosten, R. P.; Vriend, G. A Series of PDB-Related Databanks for Everyday Needs. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43* (D1), D364–D368.

(66) Bulheller, B. M.; Hirst, J. D. DichroCalc–Circular and Linear Dichroism Online. *Bioinformatics* **2009**, *25* (4), 539–540.

(67) Besley, N. a.; Hirst, J. D. Theoretical Studies Toward Quantitative Protein Circular Dichroism Calculations. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (41), 9636–9644.

(68) Duan, Y.; Wu, C.; Chowdhury, S.; Lee, M. C.; Xiong, G.; Zhang, W.; Yang, R.; Cieplak, P.; Luo, R.; Lee, T.; Caldwell, J.; Wang, J.; Kollman, P. A Point-Charge Force Field for Molecular Mechanics Simulations of Proteins Based on Condensed-Phase Quantum Mechanical Calculations. *J. Comput. Chem.* **2003**, *24* (16), 1999–2012.

(69) Lindorff-Larsen, K.; Maragakis, P.; Piana, S.; Eastwood, M. P.; Dror, R. O.; Shaw, D. E. Systematic Validation of Protein Force Fields against Experimental Data. *PLoS One* **2012**, *7* (2), e32131.

(70) Mackerell, A. D.; Bashford, D.; Bellott, M.; Dunbrack, R. L.; Evansck, J. D.; Field, M. J.; Fischer, S.; Gao, J.; Guo, H.; Ha, S.; Joseph-McCarthy, D.; Kuchnir, L.; Kuczera, K.; Lau, F. T.; Mattos, C.; Michnick, S.; Ngo, T.; Nguyen, D. T.; Prodhom, B.; Reiher, W. E.; Roux, B.; Schlenkrich, M.; Smith, J. C.; Stote, R.; Straub, J.; Watanabe, M.; Wiórkiewicz-Kuczera, J.; Yin, D.; Karplus, M. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102* (18), 3586–3616.

(71) Mackerell, A. D.; Feig, M.; Brooks, C. L. Extending the Treatment of Backbone Energetics in Protein Force Fields: Limitations of Gas-Phase Quantum Mechanics in Reproducing Protein Conformational Distributions in Molecular Dynamics Simulations. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25* (11), 1400–1415.

(72) Mackerell, A. D.; Feig, M.; Brooks, C. L. Improved Treatment of the Protein Backbone in Empirical Force Fields. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (3), 698–699.

(73) Best, R. B.; Mittal, J.; Feig, M.; Mackerell, A. D. Inclusion of Many-Body Effects in the Additive CHARMM Protein CMAP Potential Results in Enhanced Cooperativity of α -Helix and β -Hairpin Formation. *Biophys. J.* **2012**, *103* (5), 1045–1051.

(74) Pantelopulos, G. A.; Mukherjee, S.; Voelz, V. A. Microsecond Simulations of MDM2 and Its Complex with p53 Yield Insight into Force Field Accuracy and Conformational Dynamics. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **2015**, *83* (9), 1665–1676.

(75) Oostenbrink, C.; Villa, A.; Mark, A. E.; van Gunsteren, W. F. A Biomolecular Force Field Based on the Free Enthalpy of Hydration and Solvation: The GROMOS Force-Field Parameter Sets 53A5 and 53A6. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25* (13), 1656–1676.

(76) Henriques, J.; Cragnell, C.; Skepö, M. Molecular Dynamics Simulations of Intrinsically Disordered Proteins: Force Field Evaluation and Comparison with Experiment. *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *11* (7), 3420–3431.

(77) Hsieh, M.-J.; Luo, R. Balancing Simulation Accuracy and Efficiency with the Amber United Atom Force Field. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114* (8), 2886–2893.

4.2 Capítulo II: Aspectos estruturais de glicocinas

4.2.1 Preâmbulo

Recentemente descobertas, as glicocinas, ou bacteriocinas glicosiladas, são surpreendentes por apresentarem uma glicosilação incomum, a S-glicosilação de cisteínas (STEPPER *et al.*, 2011). Glicosilações estão associadas à maior flexibilidade molecular e à interação entre células, podendo ter um papel crítico no reconhecimento por células-alvo. No caso de glicocina F (GccF), produzida por uma espécie de *Lactobacillus* (STEPPER *et al.*, 2011), os alvos são bactérias muito próximas da espécie produtora, funcionando como vantagem competitiva na colonização do meio, sugerindo sua utilização como conservante de produtos lácteos. Em especial, a S-glicosilação é muito mais resistente às mudanças ambientais de temperatura, pH e à quebra por glicosidases (OGA) do que a O-glicosilação (LEON *et al.*, 2017). Algumas outras questões são levantadas quanto ao comportamento estrutural das glicocinas: apesar de diferirem em apenas 5 aminoácidos, GccF e plantaricina 1 (Asm1) (HATA; TANAKA; OHMOMO, 2010) possuem estruturas dramaticamente diferentes, com a formação de hélice na primeira enquanto nenhuma estrutura secundária foi encontrada na última (NORRIS; PATCHETT, 2016). A estrutura geral de glicocinas, hélice-volta-hélice, estabilizada por duas pontes dissulfeto, também é encontrada na sublancina A (SunA), que difere de GccF na sua atividade, que é bactericida ao invés de bacteriostática (PAIK; CHAKICHERLA; HANSEN, 1998), e pela ausência de uma região desestruturada na região C-terminal (GONZALO *et al.*, 2014). Sua S-glicosilação também ocorre na volta entre as duas hélices, e, embora promíscua, tem preferência por glicose (Glc) ao invés de N-acetil-glicosamina (GlcNAc). A caracterização de ligações estáveis como a S-glicosilação como alternativa à O-glicosilação a nível molecular pode antecipar características desejáveis em âmbito biotecnológico. Além disso, o estudo de peptídeos antimicrobianos, em especial da classe das bacteriocinas, permitirá seu possível uso na indústria de conservação de alimentos e possivelmente na indústria farmacêutica. Finalmente, a utilização de métodos computacionais na obtenção de informações sobre sistemas como esse é vantajosa por não requerer o dispêndio de um grande volume de recursos.

Structural Characteristics of Glycocins: Unraveling The Contribution of S-Linked Carbohydrates and Other Structural Elements

Bianca Villavicencio and Hugo Verli*

CBiot, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

E-mail: hverli@cbiot.ufrgs.br

Phone: +55 (51) 33087770

Abstract

Glycocins are antimicrobial peptides with glycosylations, often an S-linked monosaccharide. Their recent structure elucidation has brought forth questions about their mechanisms, as well as the impact of S-glycosylation on their structural behavior. Here, we investigated structural characteristics of glycocins using a computational approach. Depending on the peptide's class (sublancin- or glycocin F-like), the sugar changes the peptide's flexibility. Also, the presence of glycosylation is necessary for the lack of structure of Asm1. The C-terminal tail in glycocinF-like peptides influenced their structured regions, acting like a regulator. These findings corroborate the versatility of these post-translational modifications, pointing towards their potential use in molecular engineering.

Introduction

The potential use of antimicrobial peptides as an answer for many modern issues, such as food preservation¹ and as an alternative to antibiotics,² has attracted a lot of research effort. The investigation of bacterial antimicrobial peptides has expanded the horizons of protein engineering, for instance with the discovery of S-glycosylated peptides produced by Lactic Acid Bacteria (LAB).³ This modification, where a monosaccharide is covalently linked to the sulphur atom of a cysteine side chain, has presented better resistance against cleavage than O-glycosylation.⁴ The discovery of S-linked sugars is associated with bacteria-produced antimicrobial peptides, or bacteriocins, leading to the creation of the subclass of glycocins (glycosylated bacteriocins). Currently, this subclass includes three peptides whose three-dimensional structure is resolved by nuclear magnetic resonance, namely Sublancin (hereafter SunA),⁵ Glycocin F (GccF),⁶ and Plantaricin Asm1 (Asm1)⁷ (Figure 1). All glycocins are short peptides with nested disulfide bridges linking two helices that are interconnected by a loop, which contains a single monosaccharide (S-linked in SunA, O-linked in GccF and Asm1). GccF and Asm1 are orthologs that strikingly differ only by 5 amino acids and by the total lack of secondary structure of the latter. Both have a very flexible C-terminal tail with an S-linked monosaccharide in the terminal cysteine.⁸ SunA has been shown to be bactericidal against several Gram positive and negative bacteria, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*,⁹ whereas GccF and Asm1 are bacteriostatic.

The emerging field of studying glycocins is still in its initial steps. The molecular and structural aspects of such peptides could be further understood by the use of computational tools, which allow the reproduction of several properties of biomolecules. Molecular Dynamics (MD) simulations might provide the means to understand the effect of S-linked sugars and other modifications in these peptides, including their role on structure stability.¹⁰ Current advances in both hardware and software have lowered computational costs, allowing simulations to reach timescales comparable to biological processes. The combination of both biological timescales and system replicas¹¹ allows for reliable structural information, which

may help shed light in the molecular works of biological systems. The data provided could help develop the use of such peptides and their structural characteristics in protein engineering. In this work, we report relevant structural aspects of glycocins using MD simulations.

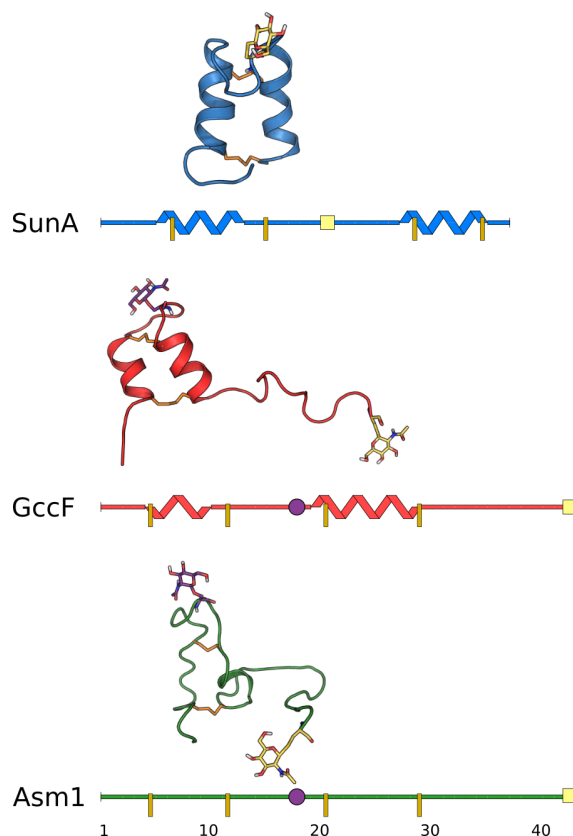


Figure 1: Glycocins with NMR-determined structure. Both three- and two-dimensional representations are shown. S-glycosylations are shown in yellow; O-glycosylations are shown in purple; disulfide bridges are shown in orange.

Results and discussion

Base behavior of glycocins

First, we aimed to confirm if our simulations matched available data on glycocins. For that, we compared the experimentally determined circular dichroism (CD) spectra of these peptides to their theoretically calculated counterparts derived from MD simulations (Figure2).

For SunA, we found no difference between the CD spectra for peptides with either glucose (Glc) or N-acetylglucosamine (GlcNAc) S-linked to C22, agreeing with experimental results⁵. For Asm1, no CD data was available. For GccF, theoretical CD³ did not match the experimental CD; however, when using the spectra of all NMR conformations as input for theoretical calculations, the average CD matched the glycosylated GccF spectrum derived from MD better. This mismatch between the experimental and theoretical spectra is possibly due to the peptide's high coil content, which does not have a unique CD signal. While DichroCalc's quality depends on the α -helical content of the query¹² and might not match the spectrum completely, it still can provide information about trends in structural content. These trends were met, at least partially, by the parameters used, and the peptides were further evaluated. With this in mind, we compared the base behavior of glycocins and their non-glycosylated counterparts.

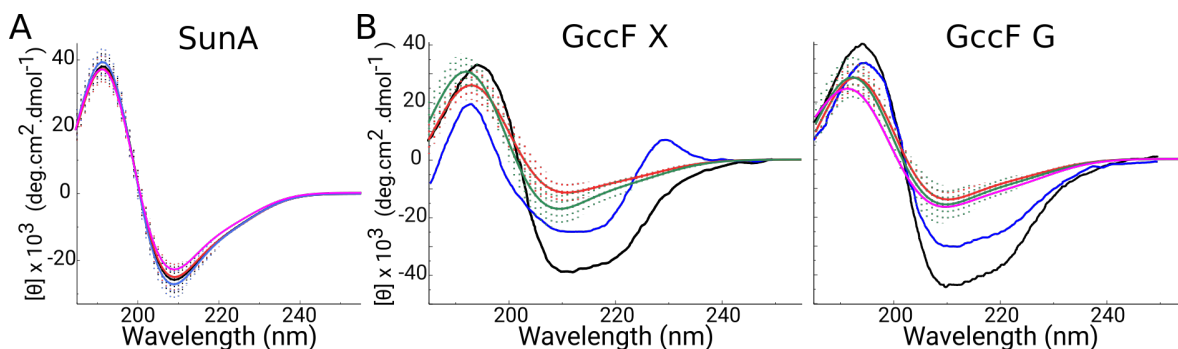


Figure 2: Experimental and theoretical CD of glycocins. A) Theoretical CD of SunA (from NMR - pink) and Sx (black), Sg (red) and Sn (blue) show no difference between them. B) Theoretical CD of deglycosylated (X) and glycosylated (G) GccF: simulated results do not agree with experimentally determined spectra, but with the theoretical CD of the experimentally determined structure of GccF. GccF (black) and GccF1-32 (blue); theoretical calculations for simulated GccF (red) and GccF1-32 (green); and for the experiment (pink).

SunA and the Goldilocks zone of interaction

The glycosyltransferase SunS has been shown to be promiscuous regarding the hexose it transfers to SunA,¹³ so we tested different S-linked monosaccharides: no monosaccharide (Sx), the normally attached Glc (Sg), and GlcNAc (Sn). We observed no significant differ-

ence in helical content per residue, regardless of modification (Figure 3A). We did, however, observe that the difference between RMSF values from Sx and both glycosylated SunA showed that Sg and Sn contained a more rigid interhelical loop, while having a more flexible structured region (Figure 3B), although being overall more stable relatively to the initial configuration (Figure 3C). Sg showed a much higher variation in the glucosylated residue, with GlcNAc granting a severe rigidity to the site that could be due to the bulkier group on the carbon 2 side chain of GlcNAc. The analysis of the interaction energy between the monosaccharide and the peptide shows a significantly higher interaction of GlcNAc and its peptide when compared to Glc (Table 1). In order to test if there was a preferential interaction of the loop and monosaccharide with one particular helix (H1 (Gln6-Ser16) or H2 (Gly25-Phe35)), defined as the helix-forming residues in the beginning of the simulation), we analyzed the specific interactions between those groups (Figure 3D). Indeed, there were overall higher interaction energies of any monosaccharide with H1, and GlcNAc more than Glc. The antimicrobial activity of SunA is higher when using glucose,¹³ which could be influenced by the interaction between glycan and helices. Since the redefinition of the carbohydrate of wildtype SunA as glycoactive,¹⁴ meaning that the sugar has to be relatively free to interact with the target, perhaps a bulkier monosaccharide (GlcNAc, for instance) might hinder the bioactive interaction with the target due to too much interaction with the peptide (Table 1). This points towards an intermediate interaction with the helices, and thus to an intermediate level of flexibility. The glucosylated SunA is slightly more active than the peptide with other hexoses linked to Cys22, as shown by antimicrobial activity assays against *B. subtilis*.¹³

Table 1: Interaction energy between sections of the glycopeptide and water.

| Interaction Energy (kJ/mol) | Glucose | GlcNAc |
|-----------------------------|------------------|------------------|
| Glycopeptide-Water | -2400.44 ± 80.15 | -2528.07 ± 80.25 |
| Glycan-Water | -116.54 ± 15.59 | -157.99 ± 19.79 |
| Peptide-Glycan | -63.66 ± 13.35 | -119.11 ± 12.92 |

Moreover, we observed a more limited exploration of the conformational space by the

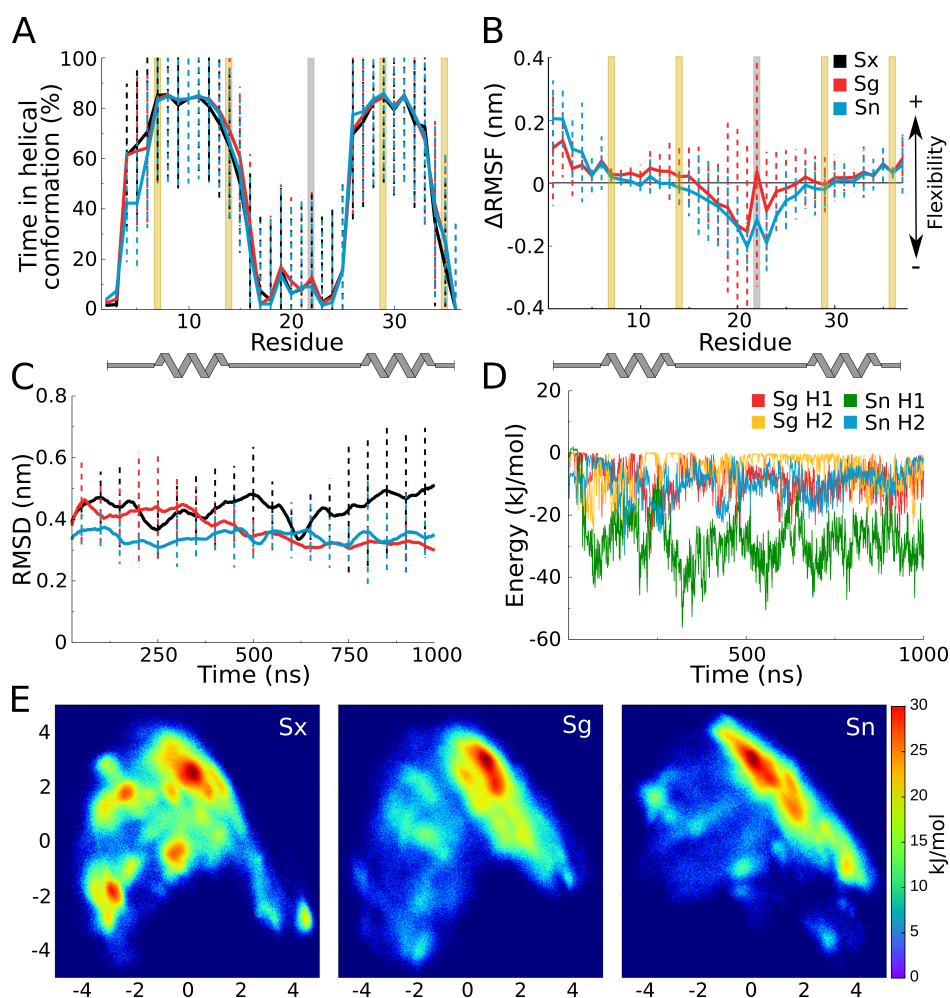


Figure 3: Sublancin glycosylation changes its behavior. A) Different glycosylations do not change helical content. B) When compared to the non-glycosylated version, Sg and Sn have a more rigid loop. C) RMSD indicates that Sx fluctuates more. D) The energy of interaction shows that the sugar interacts more with helix 1, and GlcNAc more than Glc. E) Different glycosylation status changes the exploration of the conformational space by SunA.

glycosylated peptides in a free energy landscape (FEL) analysis of the peptide's backbone. The presence of a sugar limits the occupation of the conformational space, with Sx having several minima occupied, while Sg and Sn occupy less, but steeper, minima. This relates to the increased rigidity of the whole peptide by Glc and GlcNAc, with a steeper free energy landscape for Sn (Figure 3E). This means that GlcNAc might reduce the ability of Sn to exit certain energy minima, therefore being trapped in a conformation that does not easily interact with the target.

Taken together, these results support the "protective umbrella" hypothesis, where the unconstrained glycan acts as a shield against proteolysis.⁸ If this is the case, GlcNAc would prefer to interact with one of the helices, being unable to protect the peptide and to interact with the target. The role of increasing rigidity with this modification, thus contributing to SunA's high chemical stability,¹⁵ while also having a small and relatively free sugar attached to its loop, makes this S-glycosylation a very versatile bacterial tool. We might infer that glycosylation plays a role in the stabilization of SunA's loop, while also possibly offering protection and target interaction.¹⁶

Glycocin F and its monosaccharides

To understand the influence of sugars in GccF, we compared the wildtype (Gg) to its non-glycosylated (Gx) version. Other than a slight increase of helicity in helix 1 of Gg (Figure 4A), no significant differences were observed between both versions (Figure 4B). Differential RMSF shows that the presence of the monosaccharides results in higher flexibility in the interhelical loop and helix 2, as well as in the middle of the C-terminal tail (Figure 4C). The end of the tail of Gg, however, is more rigid than Gx, indicating that the S-glycan interacts with the glycopeptide. In order to understand such rigidity, we investigated which residues were interacting with the terminal S-linked sugar. Other than forming hydrogen bonds with several amino acids that form the tail (Figure 4D), the monosaccharide also interacted with the O-linked GlcNAc in the loop. The minimum distance between the two sugars is consistently lower than 0.4 nm in all simulation replicas, indicating that they are within interacting distance for hydrogen bond formation.

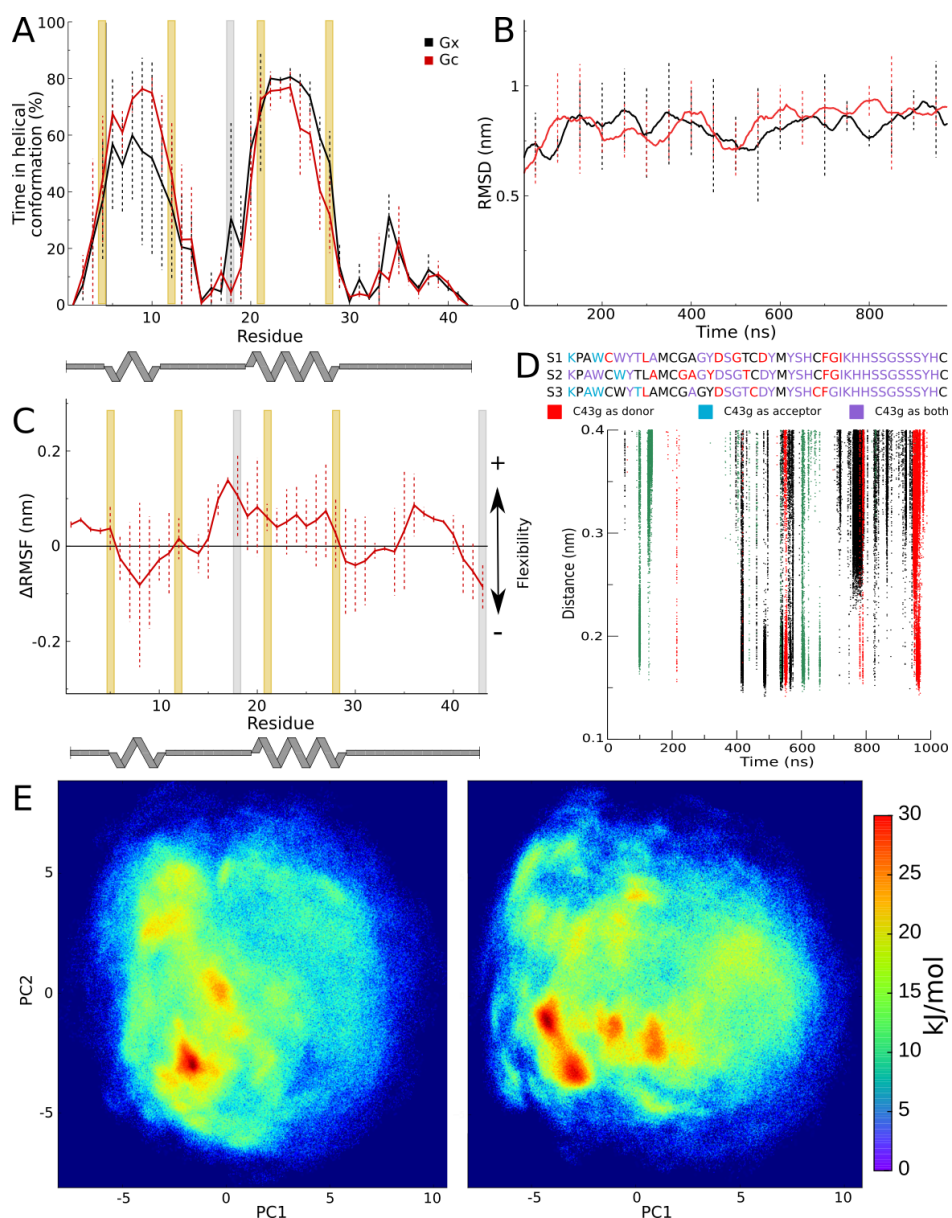


Figure 4: Behavior of GccF. A) Glycosylation mostly affects the helicity of residues from helix 1. B) RMSD is not affected by glycosylation. C) Differential RMSF shows enhanced rigidity and flexibility of the glycopeptide compared to Gx. D) Hydrogen bond formation of C43 in three independent simulations (S1-3), and every frame where the minimum distance between C43 and S18 was lower than 0.4 nm, therefore allowing the formation of hydrogen bonds (S1 black, S2 red, S3 green). E) Glycosylation shifts minima and widens free energy landscape of Gc.

Taken together, these observations indicate that GccF does not keep an "extended" tail conformation, and the sugars in its loop and tail interact. Instead of the proposed mechanism

of the terminal monosaccharide acting as a "hook" to guide the peptide to its target, perhaps the S-linked GlcNAc helps in its protection against proteases. This, however, does not make the O-linked sugar more rigid. Perhaps this means the interactions with the tail keep pulling the O-linked sugar, that does not stay put in the groove formed by residues 8, 9, 11-21 and 25⁸. This altered structural behavior is translated as a slight shift on the free energy landscape (Figure 4E), with the glycosylations granting a wider, more shallow landscape with more minima.

The homologue Asm1

In the same manner as GccF, we observed the impact of the presence of glycosylation (Ag) or lack thereof (Ax) in Asm1 (Figure 5). The sugars also confers flexibility to the peptide, and the C-terminal tail of Ag stays more flexible than Ax. The impact of the tail lowers the flexibility on helix 1 but enhances it on helix 2 and in part of the loop, making the peptide as a whole more flexible.

Asm1 and GccF are homologs that differ only by 5 amino acids, all of them in the C-terminal tail. Departing from the structure of GccF, we mutated those residues to match the sequence of Asm1 (G2Ag). In order to establish whether the glycosylation affects the loss of secondary structure of G2A, we also made a non-glycosylated version (G2Ax). While G2Ax did not lose the helical conformation from GccF, G2A decreased the percentage of time in which its residues adopted a helical conformation (Figure 5A). Furthermore, RMSF shows that S-glycosylation increases flexibility for both Asm1 and GccF, while G2A maintains its C-terminal tail more rigid than G2Ax (Figure 5B). The rest of the structure, while tending to stay flexible, varies a lot. Secondary structure over time indicates a decrease in α -helical content of G2Ag, while the same is not observed in G2Ax, Asm1 and GccF (Figure 5C).

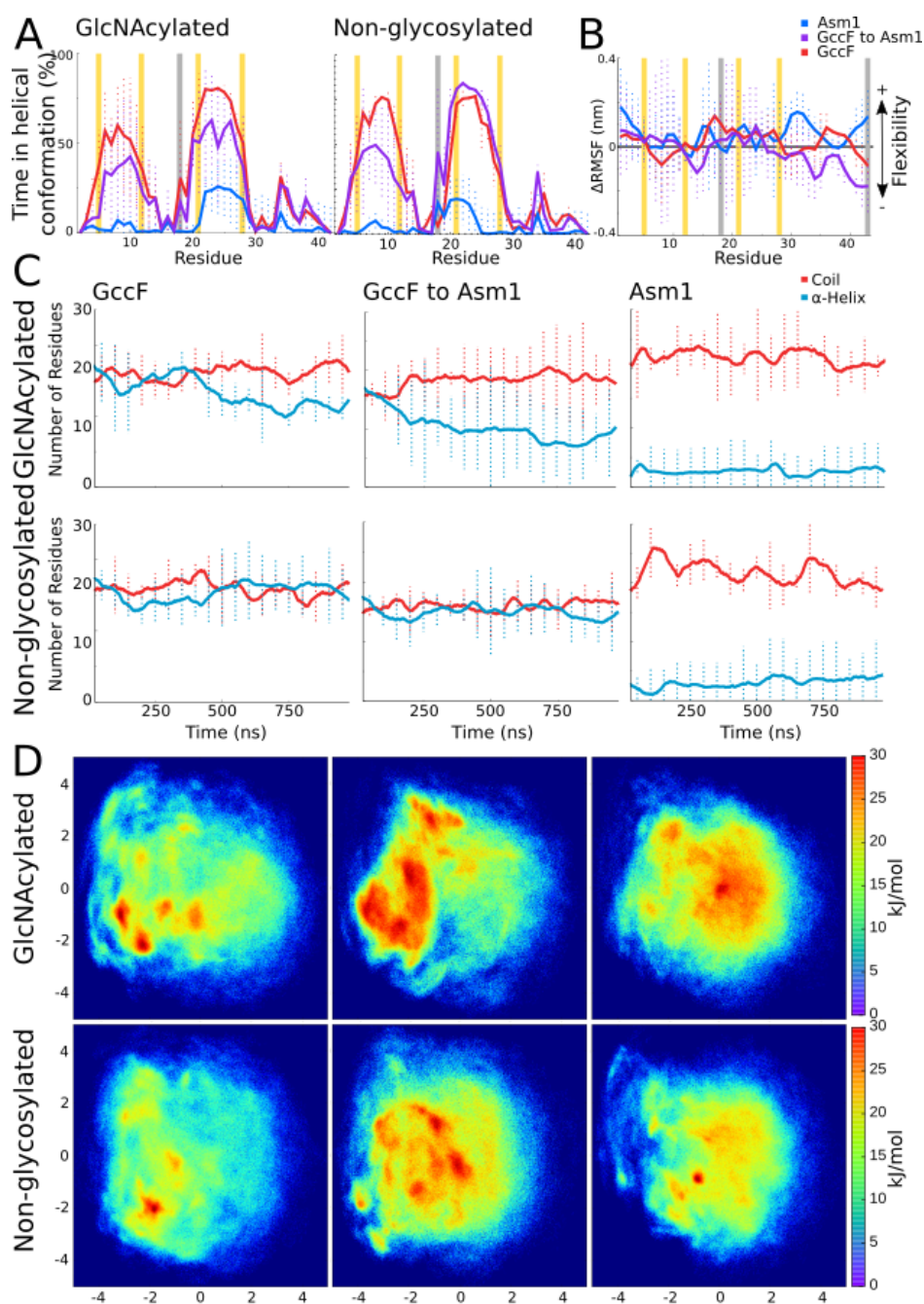


Figure 5: Glycosylation unwinds the artificially structured Asm1 (G2A). Glycosylation state affects A) helicity, B) flexibility, C) secondary structure over time, and D) exploration of the free energy landscape.

Considering the amount of coil or alpha-helix throughout the simulation, it becomes clear that the loss of structure only happens in G2Ag and not in G2Ax, indicating a role of the monosaccharide in the lack of secondary structure in Ag. In the free energy landscape, we

see that G2Ag does not keep the defined minima profile of Gg, having a much wider region of lower values, indicating the molecular rearrangement fueled by the glycan (Figure 5D). In GccF, Asm1 and G2A, glycosylation grants an overall flexibility, that impacts the exploration of conformational space, meaning that an ensemble of structures are equally favorable.

A tail's tale

To assess the impact of the C-terminal tail, we simulated the structured region of GccF (residues 1-32) independently (G1-32g and G1-32x) and compared them to the equivalent region in the full peptide (Figure 6). Moreover, we did the same for Asm1 (A1-32g and A1-32x). We observed that G1-32g is overall much more flexible than the same region in the full peptide, highlighting the stabilizing role of the C-terminal tail for the peptide. Also, the tail stabilizes the two helices by increasing the time of their constituting residues in helical conformation. The rigidity of the residues 28-30 in GccF might be important to limit the tail movement, allowing the sugar on C43 to interact with the one on S18.

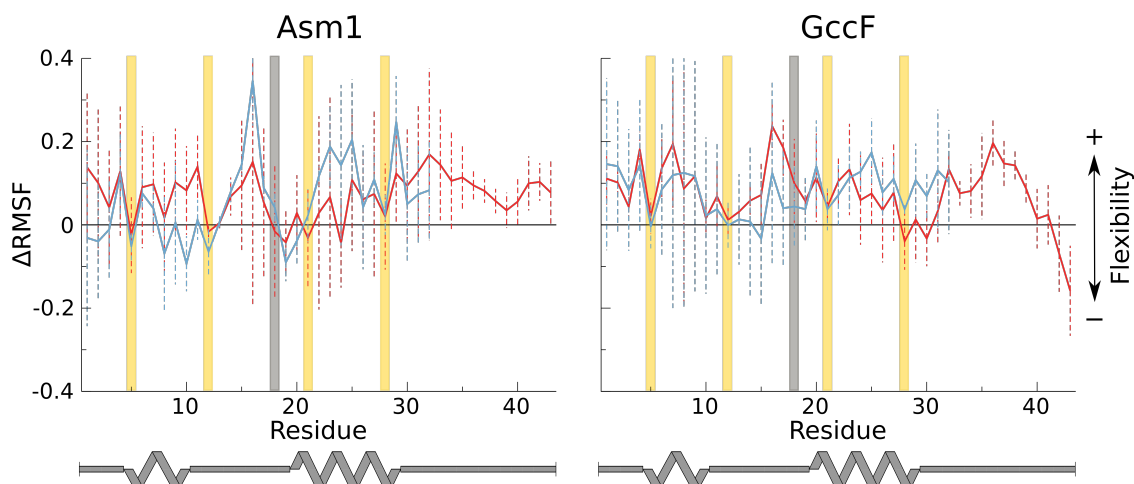


Figure 6: Impact of the C-terminal tail on A) Asm1 and B) GccF. Simulations of residues 1-32 are shown in blue, while the simulations of the whole peptides are in red.

S-glycosylation and glycocins

So far, the influence of S-glycosylation on the structure of glycocins indicate that its effects on secondary structure are subtle. This is more noticeable in the C-terminal tail and with the interactions of the two sugars in GccF and Asm1. Δ RMSF shows that S-glycosylation increases flexibility for both Asm1 and GccF, and rigidity in the interhelical loop for SunA. Currently, there are two classes of glycocins, divided in glycocin F-like and sublancin-like. Our results reflect such classification, perhaps representing two valid strategies for glycosylated peptides to adopt.

The role of the C-terminal tail seems to be to provide rigidity to the peptide, even though the tail itself should be highly flexible. The final portion of the tail interacts with the monosaccharide attached to the loop, changing the molecular interactions with the medium. Perhaps this change is responsible for the different interactions these peptides have with competing bacteria.

When mutating the structure of GccF to the sequence of Asm1, we created the mutant G2A, which, when glycosylated, was able to lose a high amount of its secondary structure. This loss of structure is also related to an increase of C-terminal rigidity. This could be related to the interaction with the glycan in the loop. The sugar might decrease stabilization, as also seen in the FEL, perhaps using the C-terminal tail as an axis to unwind itself.

Conclusions

We have assessed the behavior of S-glycosylated bacteriocins, the impact of S-glycosylation, and with different types of sugar, in the case of SunA. Computational parameters appear to reproduce the tendencies of glycocins, but attention is required due to the limitations of the method.

In general, S-glycosylation does not appear to impact in the amount of secondary structure, but it influences peptide flexibility. As for the C-terminal tail of Asm1 and GccF, we learned

that it impacts their structured region. Glycosylation of GccF to Asm1 is necessary for helical loss, possibly destabilizing the most prevalent conformations due to interactions. The interplay between carbohydrate and C-terminal tail could be responsible for the increased flexibility in Asm1 and GccF, while the rigidity observed in SunA could be due to the undisputed interaction between sugar and peptide.

The C-terminal tail of GccF and Asm1 impacts its structured region; Glycosylation of GccF to Asm1 is necessary for helical loss, possibly destabilizing the most prevalent conformations due to interactions of the tail with helix 2. The interplay between carbohydrate and C-terminal tail could be responsible for the increased flexibility in Asm1 and GccF, while the rigidity observed in SunA could be due to the undisputed interaction between sugar and peptide.

Experimental

The structures of SunA, GccF and Asm1 were obtained from RCSB PDB (2KUY,⁶ 2MIJ,¹⁷ 2MVI⁷). For each protein, all conformations were clustered and the closest to an average structure was selected for further analyses. For SunA, we used the wildtype peptide, with glucose linked to Cys22 (Sg); the peptide with glucose substituted by GlcNAc (Sn); and a non-glycosylated peptide, where the monosaccharide is substituted by a single hydrogen (Sx).

For both GccF and Asm1, we used the original peptide with GlcNAc linked to Ser18 and Cys43 (Gg and Ag, respectively); a shorter version of the peptide with only the first 32 amino acid residues (G1-32g and A1-32g); and a non-glycosylated version for each form (Gx, Ax, G1-32x, A1-32x). In addition, we mutated the residues of GccF to match those of Asm1, creating a structured Asm1 (G2A), with (G2Ag) and without (G2Ax) glycosylation.

Since GccF and Asm1 were resolved in a mixed solvent of water and acetonitrile,⁶ we parameterized the liquid in the proportions at the temperature used until the mixed solvent

in the box matched the density of the experimentally determined solvent.¹⁸ All preparations and simulations were performed using the Gromacs suite.¹⁹ In order to describe the S-glycosylation, we used the GROMOS 53A6GLYC force field.^{20,21}

Each peptide was solvated with SPC water,²² minimized using the steepest descent algorithm, slowly released from constraints at constant volume and temperature, then equilibrated for 100ns, and simulated in triplicates for 1 μ s, at an integration step of 2fs. We used LINCS²³ for bond constraints, PME²⁴ for electrostatics, a modified Berendsen thermostat,²⁵ and Parrinello-Rahman²⁶ for temperature and pressure coupling, respectively.

RMSF, helicity and DSSP were calculated excluding sugars, in order to be comparable to their non-glycosylated versions. Similarly, RMSD and PCA used the peptide's backbone as reference. RMSF was displayed as the difference between the non-glycosylated and glycosylated peptide for each replica, which were then averaged, resulting in a single curve per glycosylated peptide, with 0 being the non-glycosylated version. Therefore, positive values denote that the glycosylated peptide is more flexible than its non-glycosylated version, while values below zero denote a more rigid residue.

To improve visual communication for RMSD and DSSP, the results were displayed using running averages with a window size of 500 applied directly to the average of each triplicate on Grace.

PCA was calculated in a concatenated trajectory of 3 μ s per peptide. We calculated the covariance of different types of glycosylation and then used the eigenvectors to plot different peptides, which resulted in the exploration of the free energy landscape for every peptide compared to one another.

Acknowledgement

The authors thank CAPES, CNPq, FAPERGS and UFRGS for allowing this project to happen, in spite of the ongoing cuts in research and education by the federal government.

References

- (1) Harwood, C. R.; Mouillon, J.-m.; Pohl, S.; Arnau, J. Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group. *FEMS Microbiology Reviews* **2018**, *42*, 721–738.
- (2) Wang, S.; Wang, Q.; Zeng, X.; Ye, Q.; Huang, S.; Yu, H.; Yang, T.; Qiao, S. Use of the antimicrobial peptide sublancin with combined antibacterial and immunomodulatory activities to protect against methicillin-resistant staphylococcus aureus infection in mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2017**, *65*, 8595–8605.
- (3) Stepper, J. et al. Cysteine S-glycosylation, a new post-translational modification found in glycopeptide bacteriocins. *FEBS Letters* **2011**, *585*, 645–650.
- (4) De Leon, C. A.; Lang, G.; Saavedra, M. I.; Pratt, M. R. Simple and Efficient Preparation of O- and S-GlcNAcylated Amino Acids through InBr₃-Catalyzed Synthesis of β -N-Acetylglycosides from Commercially Available Reagents. *Organic Letters* **2018**, *20*, 5032–5035.
- (5) Hsieh, Y. S. Y.; Wilkinson, B. L.; O'Connell, M. R.; Mackay, J. P.; Matthews, J. M.; Payne, R. J.; O'Connell, M. R.; Mackay, J. P.; Matthews, J. M.; Payne, R. J. Synthesis of the Bacteriocin Glycopeptide Sublancin 168 and S-Glycosylated Variants. *Organic Letters* **2012**, *14*, 1910–1913.
- (6) Venugopal, H.; Edwards, P. J. B.; Schwalbe, M.; Claridge, J. K.; Libich, D. S.; Stepper, J.; Loo, T.; Patchett, M. L.; Norris, G. E.; Pascal, S. M. Structural, dynamic, and chemical characterization of a novel S-glycosylated bacteriocin. *Biochemistry* **2011**, *50*, 2748–2755.
- (7) Goroncy, A.; Loo, T.; Koolard, A.; Patchett, M.; Norris, G. Structural characterization of the S-glycosylated bacteriocin ASM1 from *Lactobacillus plantarum* (unpublished). <http://dx.doi.org/10.2210/pdb2MVI/pdb>. **2014**,

- (8) Norris, G. E.; Patchett, M. L. The glycocins: in a class of their own. *Current Opinion in Structural Biology* **2016**, *40*, 112–119.
- (9) Garcia De Gonzalo, C. V.; Denham, E. L.; Mars, R. A.; Stülke, J.; Van Der Donk, W. A.; Van Dijl, J. M. The phosphoenolpyruvate: Sugar phosphotransferase system is involved in sensitivity to the glucosylated bacteriocin sublancin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2015**, *59*, 6844–6854.
- (10) Schlick, T. *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*; Interdisciplinary Applied Mathematics 4; Springer New York: New York, NY, 2010; Vol. 21; p 476.
- (11) Knapp, B.; Ospina, L.; Deane, C. M. Avoiding False Positive Conclusions in Molecular Simulation: The Importance of Replicas. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2018**, *14*, 6127–6138.
- (12) Bulheller, B. M.; Rodger, A.; Hirst, J. D. Circular and linear dichroism of proteins. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2007**, *9*, 2020.
- (13) Oman, T. J.; Boettcher, J. M.; Wang, H.; Okalibe, X. N.; van der Donk, W. A. Sublancin is not a lantibiotic but an S-linked glycopeptide. *Nature Chemical Biology* **2011**, *7*, 78–80.
- (14) Biswas, S.; Garcia De Gonzalo, C. V.; Repka, L. M.; Van Der Donk, W. A. Structure-Activity Relationships of the S-Linked Glycocin Sublancin. *ACS Chemical Biology* **2017**, *12*, 2965–2969.
- (15) Paik, S. H.; Chakicherla, A.; Hansen, J. N. Identification and Characterization of the Structural and Transporter Genes for, and the Chemical and Biological Properties of, Sublancin 168, a Novel Lantibiotic Produced by *Bacillus subtilis* 168. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 23134–23142.

- (16) Defaus, S.; Gupta, P.; Andreu, D.; Gutiérrez-Gallego, R. Mammalian protein glycosylation structure versus function. *The Analyst* **2014**, *139*, 2944–2967.
- (17) Garcia De Gonzalo, C. V.; Zhu, L.; Oman, T. J.; van der Donk, W. A. NMR Structure of the S-Linked Glycopeptide Sublancin 168. *ACS Chemical Biology* **2014**, *9*, 796–801.
- (18) Huss, V.; Chevalier, J. L.; Siouffi, A. M. Diffusion coefficients in water-acetonitrile mixtures. *Journal of Chromatography* **1990**, *500*, 241–255.
- (19) Abraham, M. J.; Murtola, T.; Schulz, R.; Páll, S.; Smith, J. C.; Hess, B.; Lindahl, E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* **2015**, *1-2*, 19–25.
- (20) Pol-Fachin, L.; Rusu, V. H.; Verli, H.; Lins, R. D. GROMOS 53A6 GLYC, an improved GROMOS force field for hexopyranose-based carbohydrates. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2012**, *8*, 4681–4690.
- (21) Pol-Fachin, L.; Verli, H.; Lins, R. D. Extension and validation of the GROMOS 53A6 glyc parameter set for glycoproteins. *Journal of Computational Chemistry* **2014**, *35*, 2087–2095.
- (22) Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; Hermans, J. *Intermolecular Forces*; 1981; pp 331–342.
- (23) Hess, B.; Bekker, H.; Berendsen, H. J. C.; Fraaije, J. G. E. M. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry* **1997**, *18*, 1463–1472.
- (24) Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle Mesh Ewald: An N-log(N) Method for Ewald Sums in Large Systems. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 10089–10092.
- (25) Bussi, G.; Donadio, D.; Parrinello, M. Canonical sampling through velocity rescaling. *The Journal of Chemical Physics* **2007**, *126*, 014101.

- (26) Parrinello, M.; Rahman, A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *Journal of Applied Physics* **1981**, *52*, 7182–7190.

5 Discussão Geral

Através dos resultados demonstrados nos Capítulos I e II, esta tese buscou entender o comportamento de peptídeos semi-sintéticos (com grampos olefínicos) e naturais (com O- e S-glicosilações).

5.1 Campos de Força utilizados

No Capítulo I, três diferentes campos de força foram utilizados, o que permitiu uma análise comparativa da descrição de peptídeos grampeados. A ligação dupla entre dois carbonos presente no grampo foi descrita por parâmetros de lipídeos, mais especificamente POPG, já adequados para o AMBER99SB-ILDN (JÄMBECK; LYUBARTSEV, 2012), CHARMM36 (JANG *et al.*, 2008), e GROMOS54A7 (KUKOL, 2009). Para cada campo de força, também foi utilizado o modelo de água recomendado pelo Gromacs para cada campo de força (TIP3P (JORGENSEN *et al.*, 1983) para AMBER99SB-ILDN e CHARMM36; SPC (BERENDSEN *et al.*, 1981) para GROMOS54A7). O campo de força que melhor descreveu o efeito da adição de grampos em peptídeos foi o GROMOS54A7, reproduzindo parcialmente os dados obtidos em experimentos (SHIM; KIM; VERDINE, 2013). Os campos de força AA, comumente considerados mais confiáveis do que os UA, foram inconsistentes com os efeitos de diferentes grampos, com o CHARMM36 falhando na reprodução de todos os peptídeos grampeados. O CHARMM36 é uma versão corrigida do CHARMM27, que possuía uma propensão à manutenção de hélices- α . As correções feitas pelo CHARMM36 utilizaram peptídeos fracamente estruturados obtidos por NMR como base para o ajuste do esqueleto peptídico de resíduos de aminoácidos (BEST *et al.*, 2012), o que pode influenciar a perda de estrutura secundária observada nos peptídeos grampeados. Cabe aqui ressaltar que a reprodutibilidade de dados experimentais varia de acordo com a parametrização dos campos de força. É especialmente importante ter isso em mente quando trabalhando com moléculas que necessitam de novos parâmetros, pois a geração de topologia é uma etapa essencial para garantir simulações confiáveis e que anteciparão corretamente o comportamento molecular dos sistemas estudados. A transferabilidade de parâmetros do GROMOS, que são baseados em macromoléculas, para grupamentos diferentes pode ser desafiadora, sendo necessário estar de acordo com os descritores do campo de força (LEMKUL; ALLEN; BEVAN, 2010).

No Capítulo II, foi utilizado o campo de força GROMOS53A6-GLYC (POL-FACHIN *et al.*, 2012; POL-FACHIN; VERLI; LINS, 2014), que possui parâmetros para ligação S-glicosídica. Estes parâmetros foram desenvolvidos para refletir características medidas experimentalmente, de forma a reproduzir os efeitos da glicosilação na flexibilidade proteica. Para as glicocinas

Asm1 e GccF (e a mutante G2A), utilizamos um solvente misto com água SPC (BERENDSEN *et al.*, 1981) e 40% acetonitrila ($\text{H}_3\text{C}-\text{C}\equiv\text{N}$), de forma a reproduzir ao máximo as condições de obtenção das estruturas por RMN. No entanto, isso pode introduzir um viés por não ser um meio próximo à realidade biológica na qual os peptídeos se encontrariam. Além disso, por serem peptídeos secretados ao meio no qual se encontra a bactéria produtora, as condições que esses peptídeos enfrentam podem variar muito. Por se tratarem de LAB, os organismos produtores tendem a acidificar o meio por conta da fermentação. GccF é capaz de resistir à degradação em uma ampla variação de pH (2-10) (STEPPER *et al.*, 2011), o que sugere que a investigação do comportamento molecular de glicocinas em meio ácido possa ser uma próxima etapa de investigação.

A abordagem de átomo unido presente nos campos de força GROMOS53A6-GLYC e 54A7, em contraste com a representação de todos os átomos do sistema dos campos de força AMBER99SB-ILDN e CHARMM36, reduz o tamanho do sistema sem diminuir sua complexidade. A consequente diminuição do número de interações não-ligadas e graus de liberdade pode ser responsável por uma amostragem mais eficiente de conformações (HSIEH; LUO, 2010). No Capítulo I, o comportamento de nucleador de hélice observado nos peptídeos grampeados aponta para a capacidade do GROMOS54A7 de reproduzir a transição entre diferentes conformações (KUTCHUKIAN *et al.*, 2009), o que não foi observado para os outros campos de força. No Capítulo II, também foi possível ver a transição entre estados nas glicocinas, em especial nos mutantes G2A glicosilados e não-glicosilados, onde a presença de monossacarídeos promove o desenovelamento. Em conjunto, esses dados apontam para uma descrição adequada do perfil conformacional de peptídeos modificados. Tais resultados entram em contraste com uma recente revisão sobre simulações de peptídeos, que brevemente aborda os campos de força GROMOS como apresentando uma performance inferior a outros campos de força em uma avaliação comparativa no enovelamento e dinâmica de peptídeos (GEORGOULIA; GLYKOS, 2019).

Ainda no caso do GROMOS, as diferentes modificações tiveram efeitos distintos, bem reproduzidos pelo campo de força. Os diferentes tipos de grampo, além dos diferentes carboidratos S-ligados à subblancina, modificaram a exploração do espaço conformacional de seus respectivos peptídeos. Desta forma, estes trabalhos contribuem ao acúmulo de conhecimento sobre o enovelamento de peptídeos e a sua reprodutibilidade, pois a adequação de campos de força para a descrição do enovelamento é um dos gargalos na área da bioinformática estrutural (GEORGOULIA; GLYKOS, 2019; PIANA; KLEPEIS; SHAW, 2014). Além dos campos de força, a descrição do solvente, seja implícito ou explícito, também impacta na descrição do enovelamento (RODRIGUEZ *et al.*, 2011). Enquanto o solvente explícito descreve melhor o comportamento estrutural, ele também aumenta muito o custo computacional. O estudo de peptídeos permite a utilização de solvente explícito sem que isso acarrete em um custo

computacional proibitivo.

5.2 Efeito das modificações

Em um estudo computacional com a RNase A, verificou-se que resíduos adjacentes ao grampo tem uma probabilidade maior de encontrar-se na conformação de hélice- α quando este estiver adjacente ou englobado pelo grampo (KUTCHUKIAN *et al.*, 2009). Logo, espera-se que resíduos adjacentes ou englobados pelo grampo tenham um elevado conteúdo de hélice- α . Em trabalhos experimentais com os mesmos sistemas, o peptídeo não-modificado manteve um conteúdo médio de hélice de 25%. Em comparação, as simulações do Capítulo I mostraram uma média similar (CHARMM36 – 27,40%; GROMOS54A7 – 29,87%) ou menor (AMBER99SB-ILLDN – 10,9%) à obtida experimentalmente. Os peptídeos R3S5, R5S3 e R5S5 obtiveram um conteúdo de hélice de 55 ou 41%, 15 ou 14%, e 74%, respectivamente, com os valores não definidos para configurações cis ou trans nos grampos R3S5 e R5S3 (SHIM; KIM; VERDINE, 2013). O campo de força que mais se aproxima dos resultados obtidos experimentalmente neste quesito é o GROMOS54A7, com valores de conteúdo de hélice similares para os peptídeos não-grampeados e R3S5, embora com valores muito diferentes do experimental para os outros grampos.

Independente de campo de força, análises mostraram oscilações no conteúdo de hélice- α em todas as simulações, com perda e ganho sucessivos de voltas. Essa capacidade de adquirir e readquirir hélices- α é condizente com a proposta de que os grampos atuam como nucleadores de hélice- α , aumentando sua propensão de formar hélices, e não necessariamente mantendo uma estrutura rígida (KUTCHUKIAN *et al.*, 2009).

Para as glicocinas, diversos aspectos estruturais foram abordados. Para SunA, uma diferença sutil no açúcar ligado afetou sua flexibilidade e energia de interação com o peptídeo. A presença de açúcar em SunA altera muito seu FEL, reduzindo o número de mínimos energéticos. Em GccF, que possui duas GlcNAc, sendo uma O- e outra S-ligada, foi visto que a região C-terminal (S-glicosilada) fica mais rígida do que ficaria sem carboidratos ligados. Além disso, ambas GlcNAc ficam a uma distância que possibilita sua interação e a formação de ligações de hidrogênio, conectando regiões distantes do peptídeo. Isso pode ser corroborado pela menor flexibilidade dos peptídeos com a região 33-43, indicando que a região C-terminal tem um papel importante na dinâmica do peptídeo. GccF parece ter um comportamento distinto de SunA, com a glicosilação gerando um FEL com mais mínimos. O mesmo ocorre pra Asm1, que, quando sem açúcares, possui um mínimo energético mais definido. Adicionalmente, com a simulação de G2A e sua versão não-glicosilada, verificamos que apenas na presença de glicosilação a estrutura é perdida. Isso indica que o açúcar tem um papel na aparente falta de

estrutura secundária de Asm1, com as GlcNAc podendo interagir com algum dos aminoácidos mutados ou entre si, desenovelando as hélices.

5.3 Simulação de peptídeos por DM

Atualmente, simulações computacionais são capazes de descrever sistemas compostos por um elevado número de partículas. No estudo de peptídeos, uma das maiores contribuições da DM está na possibilidade de simular seu enovelamento de forma detalhada e em uma escala de tempo próxima à biológica (DROR *et al.*, 2012). A formação de uma hélice- α , por exemplo, fica na ordem de 100-200 ns (GARCIA; SANBONMATSU, 2002), que é facilmente acessível pela DM. Essa técnica de simulação é por vezes descrita como um “microscópio computacional”, permitindo a observação de fenômenos estruturais em uma escala de tempo e espaço que dificilmente podem ser atingidas experimentalmente (DROR *et al.*, 2012). No caso da investigação de peptídeos, que em geral possuem um tamanho que permite a simulação de condições variadas, a comparação com dados provenientes de experimentos é possível. Além disso, é possível simular réplicas dos sistemas, que reduzem a chance dos comportamentos moleculares observados serem devidos ao acaso, tornando a informação estrutural mais confiável. As análises de covariância utilizadas para gerar os FEL permitem ver que as diferentes réplicas exploraram um espaço conformacional semelhante, garantindo a robustez do dado.

Apesar das simulações de peptídeos terem seu tamanho reduzido como vantagem, com isso também vem uma alta flexibilidade e dinâmica, o que torna a descrição do seu potencial conformacional total muito difícil para DMs sem restrições. Portanto, no intuito de aumentar a amostragem conformacional, metodologias com *bias* (viés) são comumente utilizadas, como é o caso da metadinâmica, da dinâmica acelerada, e da *umbrella sampling* (GEORGOULIA; GLYKOS, 2019). No caso dos trabalhos aqui descritos, a amostragem pode ser vista através do perfil de energia livre. A informação gerada pela DM dá acesso a um conjunto de conformações que populam esse perfil, no qual as mais prevalentes tendem a ser as com menor energia livre de Gibbs. Isso se aproxima à obtenção de dados da média conformacional de um peptídeo em solução, onde parte dos componentes estará em conformações próximas à nativa. No caso das glicocinas, em muitas situações o FEL é composto por mínimos rasos, sem ter uma conformação específica associada a um mínimo energético.

O CD, que foi utilizado nos dois trabalhos como forma de validar a descrição dos peptídeos simulados, não foi de tanta ajuda quando havia a interferência de regiões desenoveladas. O DichroCalc possui a limitação de não resolver o duplo mínimo entre 200 e 230 nm característico da conformação de hélice- α através de seus parâmetros *ab initio* para o cálculo do cromóforo amida (BULHELLER; RODGER; HIRST, 2007), por não considerarem transições

$n\pi^*$ observáveis na faixa de 222 nm (BESLEY; HIRST, 1999). Na faixa de 220 nm, no entanto, a acurácia do CD teórico concorda quase quantitativamente com a calculada em experimentos (BULHELLER; RODGER; HIRST, 2007). No caso das glicocinas, e especialmente GccF e Asm1, que possuem uma quantidade significativa de resíduos sem estrutura secundária, é difícil apontar o quanto as simulações replicaram resultados experimentais. A janela de tempo de um CD é muito maior do que o tempo de simulação da ordem de microssegundos que pudemos alcançar, o que pode se traduzir em uma maior quantidade de hélice- α por haver mais tempo para sua formação.

Em suma, os trabalhos apresentados nesta tese contribuem para o entendimento da estrutura de peptídeos naturais e semi-sintéticos. Grampos olefínicos podem auxiliar no desenvolvimento de peptídeos com aplicações farmacológicas, auxiliando na manutenção da estrutura de hélice, e abrindo a possibilidade de uso na modulação de interações proteína-proteína. O estudo da S-glicosilação contribui para aumentar a caixa de ferramentas na engenharia de proteínas, impactando a flexibilidade de peptídeos. Além disso, o estudo das glicocinas contribui para o melhor entendimento estrutural de peptídeos antimicrobianos, que podem ter aplicações na indústria de alimentos como uma forma de controle microbiológico. A modulação da atividade bactericida ou bacteriostática das glicocinas pode vir a contribuir também na área da saúde, conforme foi observado com a sublancina e sua atividade contra MRSA (WANG *et al.*, 2017).

6 Conclusões

Nesta tese, foram abordadas diferentes formas em que o estudo de biomoléculas pode ser auxiliado por ferramentas computacionais em diversas escalas. Com o conhecimento gerado no decorrer desses trabalhos, foi possível:

- Capítulo I - Descrição computacional de peptídeos grampeados
 - Construir a topologia dos peptídeos grampeados nos três campos de força, utilizando parâmetros equivalentes.
 - Comparar a descrição dos diferentes peptídeos grampeados. Apesar de nenhum dos três campos de força descrever o comportamento dos peptídeos grampeados com acurácia, o GROMOS54A7 apresentou o melhor desempenho, enquanto o CHARMM36 mostrou-se inadequado para descrever tais peptídeos.
 - Descrever a ação dos grampos nos peptídeos, que parece ser de nucleação de hélice- α .
- Capítulo II - Aspectos estruturais de glicocinas
 - Analisar a S-glicosilação e seu impacto na estrutura de glicocinas, revelando seu papel na modulação da flexibilidade dos peptídeos e em sua exploração do espaço conformacional.
 - Avaliar a importância da cauda C-terminal em GccF e Asm1, garantindo a interação dos dois monossacarídeos e assim enrijecendo o peptídeo.
 - Comparar diferentes glicosilações em SunA,
 - Descrever, de forma sistemática, o comportamento estrutural de glicocinas, reforçando a divisão entre “sublancina-*like*” e “glicocina-F-*like*” e evidenciando duas estratégias distintas adotadas por essas bacteriocinas.

7 Perspectivas

Nesta tese, foram sugeridos alguns comportamentos de peptídeos que podem se beneficiar de mais estudos. No caso dos peptídeos grampeados estudados no Capítulo I, pode-se buscar uma melhor adequação da descrição dos mesmos por campos de força de DM. A partir daí, pode-se tentar utilizar esse modelo para a predição de características decorrentes de diferentes modificações com grampos, que por sua vez pode ser levada à bancada para síntese. As aplicações de peptídeos com nucleadores de hélice são inúmeras, incluindo o uso na abordagem terapêutica de doenças relacionadas a interações proteína-proteína.

No caso das glicocinas abordadas no Capítulo II, o estudo de mais glicocinas permitirá um melhor entendimento dessa classe de AMPs. A elucidação da estrutura de mais peptídeos somará aos conhecimentos do efeito de cada modificação e região na função e atividade de glicocinas, e abre o caminho para a engenharia de peptídeos S-glicosilados.

O uso de metodologias computacionais para a pesquisa de biomoléculas também pode avançar com diversos estudos comparativos, que testem a confiabilidade da descrição de sistemas diversos, e sua comparação com dados experimentais. Um levantamento de estudos existentes pode ajudar a fazer essa tradução do experimental e computacional.

Em suma, o campo do estudo da estrutura de peptídeos ainda é jovem, e muito ainda pode ser explorado. Os efeitos de modificações na estrutura se estendem à sua função, e essa relação abre caminho para a possibilidade de modular a atividade de moléculas a partir do conhecimento gerado no estudo de peptídeos modificados.

8 Referências

- AHMED, T. A.; HAMMAMI, R. Recent insights into structure–function relationships of antimicrobial peptides. *Journal of food biochemistry*, Wiley Online Library, v. 43, n. 1, p. e12546, 2019.
- ALBERTS, B. *et al.* *Molecular Biology of the Cell*. Cambridge: Cambridge University Press, 2015. 1465 p. ISSN 1098-6596. ISBN 9788578110796.
- ALONSO, H.; BLIZNYUK, A. A.; GREASY, J. E. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. *Medicinal research reviews*, Wiley Online Library, v. 26, n. 5, p. 531–568, 2006.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, Elsevier, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.
- ALVAREZ-SIEIRO, P. *et al.* Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied microbiology and biotechnology*, Springer, v. 100, n. 7, p. 2939–2951, 2016.
- ANDREEVA, A. *et al.* Scop2 prototype: a new approach to protein structure mining. *Nucleic acids research*, Oxford University Press, v. 42, n. D1, p. D310–D314, 2013.
- ANFINSEN, C. B. Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, JSTOR, v. 181, n. 4096, p. 223–230, 1973.
- ARANTES, P. R. *Bases estruturais e dinâmicas de biomoléculas na via de N-glicosilação em Bactérias*. 221 p. Tese (Doutorado) — UFRGS, 2018.
- AZEVEDO, L. S. *et al.* Recent progress of molecular docking simulations applied to development of drugs. *Current Bioinformatics*, v. 7, n. 4, p. 352–365, 2012. ISSN 15748936.
- BAHAR, A. A.; REN, D. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 6, n. 12, p. 1543–1575, 2013.
- BARILE, E.; PELLECCIA, M. Nmr-based approaches for the identification and optimization of inhibitors of protein–protein interactions. *Chemical reviews*, ACS Publications, v. 114, n. 9, p. 4749–4763, 2014.
- BELLISSENT-FUNEL, M.-C. *et al.* Water determines the structure and dynamics of proteins. *Chemical reviews*, ACS Publications, v. 116, n. 13, p. 7673–7697, 2016.
- BERENDSEN, H. *et al.* *Intermolecular forces*, reidel, dordrecht. The Netherlands, 1981.
- BERNAL, F. *et al.* Reactivation of the p53 Tumor Suppressor Pathway by a Stapled p53 Peptide. *Journal of the American Chemical Society*, v. 129, n. 9, p. 2456–2457, mar 2007. ISSN 0002-7863.
- BESLEY, N. a.; HIRST, J. D. Theoretical Studies toward Quantitative Protein Circular Dichroism Calculations. *Journal of the American Chemical Society*, v. 121, n. 41, p. 9636–9644, oct 1999. ISSN 0002-7863.

- BEST, R. B. *et al.* Optimization of the additive charmm all-atom protein force field targeting improved sampling of the backbone ϕ , ψ and side-chain χ_1 and χ_2 dihedral angles. *Journal of chemical theory and computation*, ACS Publications, v. 8, n. 9, p. 3257–3273, 2012.
- BIRD, G. H. *et al.* Biophysical determinants for cellular uptake of hydrocarbon-stapled peptide helices. *Nature chemical biology*, Nature Publishing Group, n. August, p. 1–9, 2016. ISSN 1552-4469.
- BLUNDELL, T. L.; JHOTI, H.; ABELL, C. High-throughput crystallography for lead discovery in drug design. *Nature Reviews Drug Discovery*, Nature Publishing Group, v. 1, n. 1, p. 45–54, 2002.
- BOWIE, J. U.; LUTHY, R.; EISENBERG, D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science*, v. 253, n. 5016, p. 164–170, 1991.
- BULHELLER, B. M.; HIRST, J. D. DichroCalc—circular and linear dichroism online. *Bioinformatics*, v. 25, n. 4, p. 539–540, feb 2009. ISSN 1367-4803.
- BULHELLER, B. M.; RODGER, A.; HIRST, J. D. Circular and linear dichroism of proteins. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 9, n. 17, p. 2020–2035, 2007. ISSN 1463-9076.
- C VANDEN-EIJNDEN E, R. L. S. *Constructing the equilibrium ensemble of folding pathways from short off-equilibrium simulations*. [S.l.], 2009. Disponível em: <www.scistyle.com>.
- CHENG, Y. Single-particle cryo-em at crystallographic resolution. *Cell*, Elsevier, v. 161, n. 3, p. 450–457, 2015.
- COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriocins—a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*, Nature Publishing Group, v. 11, n. 2, p. 95, 2013.
- CRAIK, D. J. *et al.* The future of peptide-based drugs. *Chemical biology & drug design*, Wiley Online Library, v. 81, n. 1, p. 136–147, 2013.
- DAHIYA, V.; BUCHNER, J. Functional principles and regulation of molecular chaperones. In: *Advances in protein chemistry and structural biology*. [S.l.]: Elsevier, 2019. v. 114, p. 1–60.
- DAVIES, J.; DAVIES, D. Resistance origins and evolution of antibiotic. *Microbiology and Molecular Biology reviews. Microbiol Mol Biol Rev*, v. 74, n. 3, p. 417–33, 2010.
- DAWSON, N. L. *et al.* Cath: an expanded resource to predict protein function through structure and sequence. *Nucleic acids research*, Oxford University Press, v. 45, n. D1, p. D289–D295, 2016.
- DROR, R. O. *et al.* Biomolecular Simulation: A Computational Microscope for Molecular Biology. *Annual Review of Biophysics*, v. 41, n. 1, p. 429–452, jun 2012. ISSN 1936-122X.
- DUBOCHET, J. *et al.* Emerging techniques: Cryo-electron microscopy of vitrified biological specimens. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 10, n. 4, p. 143–146, 1985.
- ELLIS, R. J. Molecular chaperones: inside and outside the anfinen cage. *Current Biology*, Elsevier, v. 11, n. 24, p. R1038–R1040, 2001.
- FINN, R. D.; CLEMENTS, J.; EDDY, S. R. Hmmer web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic acids research*, Oxford University Press, v. 39, n. suppl_2, p. W29–W37, 2011.

- FJELL, C. D. *et al.* Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nature reviews Drug discovery*, Nature Publishing Group, v. 11, n. 1, p. 37–51, 2012.
- FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of b. influenzae. *British journal of experimental pathology*, Wiley-Blackwell, v. 10, n. 3, p. 226, 1929.
- FOSGERAU, K.; HOFFMANN, T. Peptide therapeutics: Current status and future directions. *Drug Discovery Today*, Elsevier Ltd, v. 20, n. 1, p. 122–128, jan 2015.
- FRAUENFELDER, H.; PETSKO, G. A.; TSENOGLOU, D. Temperature-dependent x-ray diffraction as a probe of protein structural dynamics. *Nature*, Nature Publishing Group, v. 280, n. 5723, p. 558, 1979.
- GARCIA, A. E.; SANBONMATSU, K. Y. α -helical stabilization by side chain shielding of backbone hydrogen bonds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, National Acad Sciences, v. 99, n. 5, p. 2782–2787, 2002.
- GARRETT, R.; GRISHAM, C. *Biochemistry 6th edition*. [S.l.: s.n.], 2016. P450 p. ISBN 978-0-7167-8724-2.
- GEORGOULIA, P. S.; GLYKOS, N. M. Molecular simulation of peptides coming of age: Accurate prediction of folding, dynamics and structures. *Archives of biochemistry and biophysics*, Elsevier, 2019.
- GÖBL, C.; TJANDRA, N. Application of solution nmr spectroscopy to study protein dynamics. *Entropy*, Molecular Diversity Preservation International, v. 14, n. 3, p. 581–598, 2012.
- GOMES, B. *et al.* Designing improved active peptides for therapeutic approaches against infectious diseases. *Biotechnology advances*, Elsevier, v. 36, n. 2, p. 415–429, 2018.
- GONZALO, C. V. G. D. *et al.* NMR structure of the s-linked glycopeptide sublancin 168. *ACS Chemical Biology*, American Chemical Society (ACS), v. 9, n. 3, p. 796–801, jan 2014.
- GUPTA, A. K. Origin of agriculture and domestication of plants and animals linked to early holocene climate amelioration. *CURRENT SCIENCE-BANGALORE-*, CURRENT SCIENCE ASSOC/INDIAN ACADEMY OF SCIENCES, v. 87, p. 54–59, 2004.
- GUZMÁN, F.; BARBERIS, S.; ILLANES, A. Peptide synthesis: chemical or enzymatic. *Electronic Journal of Biotechnology*, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, v. 10, n. 2, p. 279–314, 2007.
- HARPOLE, T. J.; DELEMOTTE, L. Conformational landscapes of membrane proteins delineated by enhanced sampling molecular dynamics simulations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, Elsevier, v. 1860, n. 4, p. 909–926, 2018.
- HATA, T.; TANAKA, R.; OHMOMO, S. Isolation and characterization of plantaricin ASM1: A new bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* A-1. *International Journal of Food Microbiology*, Elsevier BV, v. 137, n. 1, p. 94–99, jan 2010.
- HEBERLÉ, G.; AZEVEDO, W. F de. Bio-inspired algorithms applied to molecular docking simulations. *Current medicinal chemistry*, Bentham Science Publishers, v. 18, n. 9, p. 1339–1352, 2011.

- HIRST, J. D.; BROOKS, C. L. *Helicity, Circular-Dichroism and Molecular-Dynamics of Proteins*. 1994. 173–178 p.
- HOWL, J.; JONES, S. Insights into the molecular mechanisms of action of biopeptides: a strategy to target protein-protein interactions. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, v. 17, n. January, p. e1, jan 2015. ISSN 1462-3994.
- HSIEH, M.-J.; LUO, R. Balancing Simulation Accuracy and Efficiency with the Amber United Atom Force Field. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 114, n. 8, p. 2886–2893, mar 2010. ISSN 1520-6106.
- HUANG, J.; JR, A. D. M. Charmm36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to nmr data. *Journal of computational chemistry*, Wiley Online Library, v. 34, n. 25, p. 2135–2145, 2013.
- HUMPHREY, W. *et al.* Vmd: visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics*, Guildford: Butterworth Scientific Limited, c1983-c1996., v. 14, n. 1, p. 33–38, 1996.
- ILLERGÅRD, K.; ARDELL, D. H.; ELOFSSON, A. Structure is three to ten times more conserved than sequence—a study of structural response in protein cores. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, Wiley Online Library, v. 77, n. 3, p. 499–508, 2009.
- INGRAM, V. M. *et al.* Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. *Nature*, v. 180, n. 4581, p. 326–328, 1957.
- ITANO, H. A.; PAULING, L. Difference in Electrophoretic Behavior of Sickle Cell Hemoglobin and Normal Human Hemoglobin. *Federation Proceedings*, v. 8, n. 1, p. 209, 1949. ISSN 0014-9446.
- IZQUIERDO, E. *et al.* Enterocin 96, a novel class ii bacteriocin produced by enterococcus faecalis whe 96, isolated from munster cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, Am Soc Microbiol, v. 75, n. 13, p. 4273–4276, 2009.
- JÄMBECK, J. P.; LYUBARTSEV, A. P. Derivation and systematic validation of a refined all-atom force field for phosphatidylcholine lipids. *The journal of physical chemistry B*, ACS Publications, v. 116, n. 10, p. 3164–3179, 2012.
- JANG, H. *et al.* How to lose a kink and gain a helix: ph independent conformational changes of the fusion domains from influenza hemagglutinin in heterogeneous lipid bilayers. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, Wiley Online Library, v. 72, n. 1, p. 299–312, 2008.
- JORGENSEN, W. L. *et al.* Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics*, v. 79, n. 2, p. 926, 1983. ISSN 00219606.
- JÚNIOR, W. S. F.; ALBUQUERQUE, U. P. A theoretical review on the origin of medicinal practices in humans: echoes from evolution. *Ethnobiology and Conservation*, v. 7, 2018.
- KABSCH, W.; SANDER, C. Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, v. 22, n. 12, p. 2577–2637, dec 1983. ISSN 0006-3525.
- KAMINSKI, G. A. *et al.* Evaluation and reparametrization of the opls-aa force field for proteins via comparison with accurate quantum chemical calculations on peptides. *The Journal of Physical Chemistry B*, ACS Publications, v. 105, n. 28, p. 6474–6487, 2001.

- KELLY, S.; PRICE, N. The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. *Current Protein & Peptide Science*, v. 1, n. 4, p. 349–384, dec 2000. ISSN 13892037.
- KENDREW, J. C. *et al.* A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature*, Springer, v. 181, n. 4610, p. 662–666, 1958.
- KENDREW, J. C. *et al.* Structure of myoglobin: A three-dimensional fourier synthesis at 2 Å resolution. *Nature*, Springer, v. 185, n. 4711, p. 422–427, 1960.
- KIM, Y.-W.; GROSSMANN, T. N.; VERDINE, G. L. Synthesis of all-hydrocarbon stapled α -helical peptides by ring-closing olefin metathesis. *Nature Protocols*, Nature Publishing Group, v. 6, n. 6, p. 761–771, may 2011.
- KIRSANOV, D. *The Book of Inkscape: The Definitive Guide to the Free Graphics Editor*. [S.l.]: No Starch Press, 2009.
- KUKOL, A. Lipid models for united-atom molecular dynamics simulations of proteins. *Journal of Chemical Theory and Computation*, ACS Publications, v. 5, n. 3, p. 615–626, 2009.
- KUTCHUKIAN, P. S. *et al.* All-Atom Model for Stabilization of α -Helical Structure in Peptides by Hydrocarbon Staples. *Journal of the American Chemical Society*, v. 131, n. 13, p. 4622–4627, apr 2009. ISSN 0002-7863.
- LACERDA, A. F. *et al.* Anti-parasitic peptides from arthropods and their application in drug therapy. *Frontiers in microbiology*, Frontiers, v. 7, p. 91, 2016.
- LAIO, A.; PARRINELLO, M. Escaping free-energy minima. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, National Acad Sciences, v. 99, n. 20, p. 12562–12566, 2002.
- LARSSON, D. S.; LILJAS, L.; SPOEL, D. van der. Virus capsid dissolution studied by microsecond molecular dynamics simulations. *PLoS computational biology*, Public Library of Science, v. 8, n. 5, p. e1002502, 2012.
- LEACH, A. R. *Molecular Modelling: Principles and Applications*. [S.l.: s.n.], 2001. 396 p.
- LEELANANDA, S. P.; LINDERT, S. Computational methods in drug discovery. *Beilstein journal of organic chemistry*, Beilstein-Institut, v. 12, n. 1, p. 2694–2718, 2016.
- LEMKUL, J. A.; ALLEN, W. J.; BEVAN, D. R. Practical considerations for building gromos-compatible small-molecule topologies. *Journal of chemical information and modeling*, ACS Publications, v. 50, n. 12, p. 2221–2235, 2010.
- LEON, C. A. D. *et al.* The sulfur-linked analogue of o-GlcNAc (s-GlcNAc) is an enzymatically stable and reasonable structural surrogate for o-GlcNAc at the peptide and protein levels. *Biochemistry*, American Chemical Society (ACS), v. 56, n. 27, p. 3507–3517, jun 2017.
- LEOPOLD, P. E.; MONTAL, M.; ONUCHIC, J. N. Protein folding funnels: a kinetic approach to the sequence-structure relationship. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, National Acad Sciences, v. 89, n. 18, p. 8721–8725, 1992.
- LESK, A. M.; CHOTHIA, C. How different amino acid sequences determine similar protein structures: the structure and evolutionary dynamics of the globins. *Journal of molecular biology*, Elsevier, v. 136, n. 3, p. 225–270, 1980.

- LIGABUE-BRAUN, R. *et al.* Everyone is a protagonist: residue conformational preferences in high-resolution protein structures. *Journal of Computational Biology*, Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA, v. 25, n. 4, p. 451–465, 2018.
- LILL, M. A.; DANIELSON, M. L. Computer-aided drug design platform using PyMOL. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, v. 25, n. 1, p. 13–19, jan 2011. ISSN 0920-654X.
- LINDORFF-LARSEN, K. *et al.* Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 78, n. 8, p. 1950–1958, jun 2010. ISSN 08873585.
- MACHADO, M. R. *et al.* The sirah 2.0 force field: Altius, fortius, citius. *Journal of chemical theory and computation*, ACS Publications, v. 15, n. 4, p. 2719–2733, 2019.
- MÄDE, V.; ELS-HEINDL, S.; BECK-SICKINGER, A. G. Automated solid-phase peptide synthesis to obtain therapeutic peptides. *Beilstein journal of organic chemistry*, Beilstein-Institut, v. 10, n. 1, p. 1197–1212, 2014.
- MAHLAPUU, M. *et al.* Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, Frontiers, v. 6, p. 194, 2016.
- MAIOROV, V. N.; CRIPPEN, G. M. Significance of root-mean-square deviation in comparing three-dimensional structures of globular proteins. Elsevier, 1994.
- MAKY, M. A. *et al.* Enterocin F4-9, a novel O-linked glycosylated bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 81, n. 14, p. 4819–4826, 2015. ISSN 10985336.
- MARRINK, S. J. *et al.* The martini force field: coarse grained model for biomolecular simulations. *The journal of physical chemistry B*, ACS Publications, v. 111, n. 27, p. 7812–7824, 2007.
- MCCAMMON, J. A.; GELIN, B. R.; KARPLUS, M. Dynamics of folded proteins. *Nature*, Nature Publishing Group, v. 267, n. 5612, p. 585, 1977.
- MCNAUGHT, A. D.; A., W. *IUPAC Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed.* Blackwell Scientific Publications, 2019. ISBN 0-9678550-9-8. Disponível em: <<https://doi.org/10.1351/goldbook>>.
- MIZUGUCHI, K. Fold recognition for drug discovery. *Drug Discovery Today: Targets*, Elsevier, v. 3, n. 1, p. 18–23, 2004.
- MURATA, K.; WOLF, M. Cryo-electron microscopy for structural analysis of dynamic biological macromolecules. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1862, n. 2, p. 324–334, 2018. ISSN 0304-4165.
- NERO, T. L.; PARKER, M. W.; MORTON, C. J. Protein structure and computational drug discovery. *Biochemical Society Transactions*, Portland Press Ltd., v. 46, n. 5, p. 1367–1379, 2018.
- NORRIS, G. E.; PATCHETT, M. L. The glycocins: in a class of their own. *Current Opinion in Structural Biology*, Elsevier BV, v. 40, p. 112–119, oct 2016.
- OMAN, T. J. *et al.* Sublancin is not a lantibiotic but an S-linked glycopeptide. *Nature Chemical Biology*, v. 7, n. 2, p. 78–80, feb 2011. ISSN 1552-4450.

- OOSTENBRINK, C. *et al.* A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *Journal of computational chemistry*, v. 25, n. 13, p. 1656–76, oct 2004. ISSN 0192-8651.
- PAIK, S. H.; CHAKICHERLA, A.; HANSEN, J. N. Identification and characterization of the structural and transporter genes for, and the chemical and biological properties of, sublancin 168, a novel lantibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *Journal of Biological Chemistry*, American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB), v. 273, n. 36, p. 23134–23142, sep 1998.
- PARTHASARATHY, A.; ANANDAMMA, S. K.; KALESH, K. A. The medicinal chemistry of therapeutic peptides: Recent developments in synthesis and design optimizations. *Current medicinal chemistry*, Bentham Science Publishers, v. 26, n. 13, p. 2330–2355, 2019.
- PERUTZ, M. F. *et al.* Structure of haemoglobin: a three-dimensional fourier synthesis at 5.5-Å. resolution, obtained by x-ray analysis. *Nature*, Nature Publishing Group, v. 185, n. 4711, p. 416, 1960.
- PIANA, S.; KLEPEIS, J. L.; SHAW, D. E. Assessing the accuracy of physical models used in protein-folding simulations: quantitative evidence from long molecular dynamics simulations. *Current opinion in structural biology*, Elsevier, v. 24, p. 98–105, 2014.
- POL-FACHIN, L. *et al.* Gromos 53a6glyc, an improved gromos force field for hexopyranose-based carbohydrates. *Journal of chemical theory and computation*, ACS Publications, v. 8, n. 11, p. 4681–4690, 2012.
- POL-FACHIN, L.; VERLI, H.; LINS, R. D. Extension and validation of the gromos 53a6glyc parameter set for glycoproteins. *Journal of computational chemistry*, Wiley Online Library, v. 35, n. 29, p. 2087–2095, 2014.
- PONDER, J. W.; CASE, D. A. Force fields for protein simulations. In: *Advances in protein chemistry*. [S.l.]: Elsevier, 2003. v. 66, p. 27–85.
- POWERS, J.-P. S.; HANCOCK, R. E. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*, Elsevier, v. 24, n. 11, p. 1681–1691, 2003.
- RAMACHANDRAN, G. N. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J. Mol. Biol.*, v. 7, p. 95–99, 1963.
- RODRIGUEZ, A. *et al.* Computational study of the free energy landscape of the miniprotein cln025 in explicit and implicit solvent. *The Journal of Physical Chemistry B*, ACS Publications, v. 115, n. 6, p. 1440–1449, 2011.
- ROOMAN, M. *et al.* What is paradoxical about levinthal paradox? *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, Taylor & Francis, v. 20, n. 3, p. 327–329, 2002.
- RUYCK, J. de *et al.* Molecular docking as a popular tool in drug design, an in silico travel. *Advances and applications in bioinformatics and chemistry: AABC*, Dove Press, v. 9, p. 1, 2016.
- SANBONMATSU, K. Y.; JOSEPH, S.; TUNG, C.-S. Simulating movement of trna into the ribosome during decoding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, National Acad Sciences, v. 102, n. 44, p. 15854–15859, 2005.

- SANTOS, R. N.; FERREIRA, L. G.; ANDRICOPULO, A. D. Practices in molecular docking and structure-based virtual screening. *Methods in Molecular Biology*, v. 2, p. 1584, 2018.
- SCHAFMEISTER, C. E.; PO, J.; VERDINE, G. L. An All-Hydrocarbon Cross-Linking System for Enhancing the Helicity and Metabolic Stability of Peptides. *Journal of the American Chemical Society*, v. 122, n. 24, p. 5891–5892, jun 2000. ISSN 0002-7863.
- SCHLICK, T. *Molecular modeling and simulation: an interdisciplinary guide: an interdisciplinary guide*. [S.l.]: Springer Science & Business Media, 2010. v. 21.
- SCOTT, D. E. *et al.* Small molecules, big targets: drug discovery faces the protein–protein interaction challenge. *Nature Reviews Drug Discovery*, Nature Publishing Group, v. 15, n. 8, p. 533, 2016.
- SERDYUK, I. N.; ZACCAI, N. R.; ZACCAI, J. *Methods in molecular biophysics: structure, dynamics, function*. [S.l.]: Cambridge University Press, 2007.
- SHIM, S. Y.; KIM, Y.-W.; VERDINE, G. L. A New i, i+3 Peptide Stapling System for α -Helix Stabilization. *Chemical Biology & Drug Design*, v. 82, n. 6, p. 635–642, dec 2013. ISSN 17470277.
- SIMONS, K. T. *et al.* Assembly of protein tertiary structures from fragments with similar local sequences using simulated annealing and bayesian scoring functions. *Journal of molecular biology*, Elsevier, v. 268, n. 1, p. 209–225, 1997.
- SOLLANO, J. *et al.* The economics of drug discovery and the ultimate valuation of pharmacotherapies in the marketplace. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v. 84, n. 2, p. 263–266, 2008.
- SPOEL, D. V. D. *et al.* Gromacs: fast, flexible, and free. *Journal of computational chemistry*, Wiley Online Library, v. 26, n. 16, p. 1701–1718, 2005.
- STEPPER, J. *et al.* CysteineS-glycosylation, a new post-translational modification found in glycopeptide bacteriocins. *FEBS Letters*, Wiley-Blackwell, v. 585, n. 4, p. 645–650, jan 2011.
- STRASSER, B. J.; CHADAREVIAN, S. de. The comparative and the exemplary: revisiting the early history of molecular biology. *History of Science*, SAGE Publications Sage UK: London, England, v. 49, n. 3, p. 317–336, 2011.
- SUGITA, Y.; OKAMOTO, Y. Replica-exchange molecular dynamics method for protein folding. *Chemical Physics Letters*, v. 314, n. 1-2, p. 141–151, nov 1999. ISSN 00092614.
- VENUGOPAL, H. *et al.* Structural, dynamic, and chemical characterization of a novel S-glycosylated bacteriocin. *Biochemistry*, v. 50, n. 14, p. 2748–2755, 2011. ISSN 00062960.
- VERDINE, G. L.; HILINSKI, G. J. All-hydrocarbon stapled peptides as Synthetic Cell-Accessible Mini-Proteins. *Drug Discovery Today: Technologies*, Elsevier Ltd, v. 9, n. 1, p. e41–e47, mar 2012. ISSN 17406749.
- VERLI, H. *Bioinformática: da biologia à flexibilidade molecular*. Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014.

- VILLAVICENCIO, B.; LIGABUE-BRAUN, R.; VERLI, H. All-hydrocarbon staples and their effect over peptide conformation under different force fields. *Journal of chemical information and modeling*, ACS Publications, v. 58, n. 9, p. 2015–2023, 2018.
- WALENSKY, L. D. Activation of Apoptosis in Vivo by a Hydrocarbon-Stapled BH3 Helix. *Science*, v. 305, n. 5689, p. 1466–1470, sep 2004. ISSN 0036-8075.
- WALENSKY, L. D.; BIRD, G. H. Hydrocarbon-Stapled Peptides: Principles, Practice, and Progress. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 57, n. 15, p. 6275–6288, aug 2014. ISSN 0022-2623.
- WANG, G. *et al.* Asynchronous large-scale graph processing made easy. In: *CIDR*. [S.l.: s.n.], 2013. v. 13, p. 3–6.
- WANG, S. *et al.* Use of the antimicrobial peptide sublancin with combined antibacterial and immunomodulatory activities to protect against methicillin-resistant staphylococcus aureus infection in mice. *Journal of agricultural and food chemistry*, ACS Publications, v. 65, n. 39, p. 8595–8605, 2017.
- WANG, Y. *et al.* Isoform-Selective Disruption of AKAP-Localized PKA Using Hydrocarbon Stapled Peptides. *ACS chemical biology*, v. 9, n. 3, p. 635–42, mar 2014. ISSN 1554-8937.
- WATSON, J. D.; CRICK, F. *et al.* A structure for deoxyribose nucleic acid. Macmillan, 1953.
- WEBB, B.; SALI, A. Comparative protein structure modeling using modeller. *Current protocols in bioinformatics*, Wiley Online Library, v. 47, n. 1, p. 5–6, 2014.
- WUTHRICH, K. Protein structure determination in solution by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Science*, American Association for the Advancement of Science, v. 243, n. 4887, p. 45–50, 1989.
- XIANG, M. *et al.* Computer-aided drug design: lead discovery and optimization. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, Bentham Science Publishers, v. 15, n. 4, p. 328–337, 2012.
- YANG, X. *et al.* Discovery and annotation of small proteins using genomics, proteomics, and computational approaches. *Genome Research*, v. 21, n. 4, p. 634–641, apr 2011. ISSN 1088-9051.
- ZETTLMEISSL, G.; RUDOLPH, R.; JAENICKE, R. Reconstitution of lactic dehydrogenase. noncovalent aggregation vs. reactivation. 1. physical properties and kinetics of aggregation. *Biochemistry*, ACS Publications, v. 18, n. 25, p. 5567–5571, 1979.

9 Apêndices

Durante o período deste doutorado, foram realizados trabalhos em forma de colaboração com outros grupos de pesquisa. A primeira página das publicações resultantes, bem como dos manuscritos submetidos a revistas científicas, seguem em ordem cronológica. Os artigos na íntegra estão disponíveis na URL e QR code abaixo.



<https://qrgo.page.link/NErBs>

Em colaboração com o grupo da Profa. Dra. Karen Haag, do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, participei da análise de dados do sequenciamento da microbiota de barbeiros (Hemiptera: Reduviidae) infectada com *Trypanosoma cruzi*. Este trabalho resultou na publicação do artigo "Triatomine bugs, their microbiota and *Trypanosoma cruzi*: asymmetric responses of bacteria to an infected blood meal" na revista *Parasites & Vectors*.

Em uma série de colaborações com o grupo do Prof. Dr. Ricardo Menegatti, do Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal na Universidade Federal de Goiás, foi feita a avaliação de compostos bioativos através da metodologia de atracamento molecular: LQFM030, com atividade antitumoral; LQFM091 e LQFM102, com atividade antiinflamatória; e LQFM032, com atividade antihipertensiva. Estas colaborações resultaram na publicação de quatro artigos: "Induction of apoptosis in Ehrlich ascites tumour cells via p53 activation by a novel small-molecule MDM2 inhibitor – LQFM030", na revista *Journal of Pharmacy and Pharmacology*; "Pharmacological evaluation and molecular docking of new di-*tert*-butylphenol compound, LQFM-091, a new dual 5-LOX/COX inhibitor", na revista *European Journal of Pharmaceutical Sciences*; "Molecular docking and pharmacological/toxicological assessment of a new compound designed from celecoxib and paracetamol by molecular hybridization", na revista *Inflammopharmacology*; e "Novel choline analog 2-(4-((1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)methyl)piperazin-1-yl)ethan-1-ol

produces sympathoinhibition, hypotension, and antihypertensive effects”, na revista *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*.

Em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Itabajara Vaz Jr., do Centro de Biotecnologia da UFRGS, foram construídos modelos de glutathione S-transferase de forma a predizer os epítomos de células B compartilhados entre várias espécies de carrapatos. O trabalho foi submetido para a revista *Ticks and Tick-Borne Diseases* com o título “Prediction, mapping and validation of tick glutathione S-transferase B-cell epitopes”.

Com o grupo do Prof. Dr. José M. Estevez da Fundación Instituto Leloir, na Argentina, investigou-se o papel da O-glicosilação na estrutura de um peptídeo relacionado ao crescimento de pelos radiculares em *Arabidopsis thaliana*. O artigo foi aceito para publicação na revista *New Phytologist* sob o título de “A cell surface arabinogalactan-peptide influences root hair cell fate”.

RESEARCH

Open Access



Triatomine bugs, their microbiota and *Trypanosoma cruzi*: asymmetric responses of bacteria to an infected blood meal

Sebastián Díaz¹, Bianca Villavicencio², Nathália Correia³, Jane Costa³ and Karen L. Haag^{1,2,4*}

Abstract

Background: Triatomine bugs (Hemiptera: Reduviidae) are vectors of the flagellate *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. The study of triatomine gut microbiota has gained relevance in the last years due to its possible role in vector competence and prospective use in control strategies. The objective of this study is to examine changes in the gut microbiota composition of triatomines in response to a *T. cruzi*-infected blood meal and identifying key factors determining those changes.

Results: We sampled colony-reared individuals from six triatomine vectors (*Panstrongylus megistus*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma brasiliensis*, *T. infestans*, *T. juazeirensis* and *T. sherlocki*) comparing experimentally *T. cruzi* strain 0354-challenged and non-challenged insects. The microbiota of gut and gonad tissues was characterized using high throughput sequencing of region V3-V4 of bacterial 16S rRNA gene. The triatomine microbiota had a low intra-individual diversity, and a high inter-individual variation within the same host species. *Arsenophonus* appeared as the dominant triatomine bacterial symbiont in our study (59% of the total 16S coverage), but there were significant differences in the distribution of bacterial genera among vectors. In *Rhodnius prolixus* the dominant symbiont was *Pectobacterium*.

Conclusions: *Trypanosoma cruzi*-challenge significantly affects microbiota composition, with challenged vectors harbouring a significantly more diverse bacterial community, both in the gut and the gonads. Our results show that blood-feeding with *T. cruzi* epimastigotes strongly affects microbiota composition in a species-specific manner. We suggest that triatomine-adapted enterobacteria such as *Arsenophonus* could be used as stable vectors for genetic transformation of triatomine bugs and control of Chagas disease.

Keywords: Triatomine bugs, Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, *Arsenophonus*, Microbiota, Metabarcoding, 16 rRNA

Background

Microorganisms living in the midgut of insect vectors have an important role in modulating vector competence, which is the ability to acquire, maintain and transmit pathogens [1]. Microorganisms may interfere with vector competence either by direct interaction with parasites and competition for resources in the gut, or indirectly by inducing vector anti-parasitic activity and humoral immune

defence factors [2–5]. Furthermore, some symbiotic bacteria can be genetically modified to express anti-parasitic molecules or proteins that reduce insect fitness, as shown for *Anopheles* mosquitoes and *Glossina* tsetse flies in which transformed *Pantoea* and *Sodalis* symbionts were introduced, respectively [6, 7].

Triatomine bugs are vectors of the protozoan parasite *T. cruzi*, which causes Chagas disease. About 6 to 7 million people are estimated to be infected worldwide, mostly in Latin America where the disease is endemic [8]. In later years, *T. cruzi* became a public health concern also in the United States and other non-endemic countries, mostly due to human immigration from areas of endemicity [9–11]. It has been suggested that transmission might be controlled through the vector microbiota,

* Correspondence: karen.haag@ufrgs.br

¹Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

²Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



Induction of apoptosis in Ehrlich ascites tumour cells via p53 activation by a novel small-molecule MDM2 inhibitor – LQFM030

Mariana F. da Mota^{a,b}, Alane P. Cortez^a, Polyana L. Benfica^a, Bruna dos S. Rodrigues^a, Thalyta F. Castro^a, Larissa M. Macedo^c, Carlos H. Castro^c, Luciano M. Lião^d, Flávio S. de Carvalho^{d,f}, Luiz A. S. Romeiro^e, Ricardo Menegatti^f, Hugo Verli^g, Bianca Villavicencio^g and Marize C. Valadares^{a*}

^aLaboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular, FarmaTec, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, UFG, Goiânia, GO, Brazil

^bLab. de Biologia e DNA Forense da Polícia Técnico-Científica de Goiás, GO - Brazil, Universidade Federal de Goiás, UFG, Goiânia, GO, Brazil,

^cDepartamento de Fisiologia e Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, UFG, Goiânia, GO, Brazil, ^dInstituto de Química, Universidade Federal de Goiás, UFG, Goiânia, GO, Brazil, ^eFaculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, UNB, Brasília, DF, Brazil, ^fLaboratório de Química Farmacêutica Medicinal (LQFM), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, UFG, Goiânia, GO, Brazil and ^gCentro de Biotecnologia, Universidade Federal de Rio Grande do Sul, UFRS, Porto Alegre, RS, Brazil

Keywords

Ehrlich ascites tumor; LQFM030; MDM2; Nutlins; p53

Correspondence

Marize C. Valadares, Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Praça Universitária 1166, 74605 220 Goiânia, GO, Brazil.
E-mail: marizecv@ufg.br

Received October 1, 2015

Accepted April 30, 2016

doi: 10.1111/jphp.12573

Abstract

Objective The activation of the p53 pathway through the inhibition of MDM2 has been proposed as a novel therapeutic strategy against tumours. A series of cis-imidazoline analogues, termed nutlins, were reported to displace the recombinant p53 protein from its complex with MDM2 by binding to MDM2 in the p53 pocket, and exhibited an antitumour activity both *in vitro* and *in vivo*. Thus, the purpose of this study was to evaluate the antitumour properties of LQFM030 (2), a nutlin analogue created by employing the strategy of molecular simplification.

Methods LQFM030 (2) cytotoxicity was evaluated in Ehrlich ascites tumour (EAT) cells, p53 wild type, by the trypan blue exclusion test, and the mechanisms involved in EAT cell death were investigated by light and fluorescence microscopy, flow cytometry, real-time PCR and Western blotting.

Key findings Our results demonstrate that LQFM030 has dose-dependent antiproliferative activity and cytotoxic activity on EAT cells, induces the accumulation of p53 protein and promotes cell cycle arrest and apoptosis. p53 gene transcription was unaffected by LQFM030 (2); however, MDM2 mRNA increased and MDM2 protein decreased.

Conclusions These results suggest that the small-molecule p53 activator LQFM030 (2) has the potential for further development as a novel cancer therapeutic agent.

Introduction

The activation of the p53 pathway via the inhibition of MDM2 has been proposed as a novel therapeutic strategy. In fact, studies have shown that the disruption of the p53–MDM2 interaction by different macromolecular approaches or by the suppression of MDM2 expression can lead to the activation of p53 and tumour growth inhibition.^[1–3]

p53 is an important defence against cancer because it controls the transition of cells from the G1 to S phase and also induces cell cycle arrest and apoptosis.^[4,5] Due to its

potent tumour suppressor role, the p53 pathway is usually altered in tumour cells. Indeed, inactivating mutations in p53 gene are found in approximately 50% of all human cancers; in the remaining cancers in which the p53 is not mutated, the function of the p53 pathway is often inhibited via other mechanisms, including the increased expression of MDM2 (a negative regulator of p53). The fact that the p53 signalling pathway is inactivated in virtually all cancers has drawn great attention from the worldwide cancer research community for targeting the p53 pathway for the development of improved cancer therapies.^[2] Thus,



Pharmacological evaluation and molecular docking of new di-*tert*-butylphenol compound, LQFM-091, a new dual 5-LOX/COX inhibitor



Roberta Campos Lino^a, Daiany Priscila Bueno da Silva^b, Iziara Ferreira Florentino^b, Dayane Moreira da Silva^b, José Luís Rodrigues Martins^b, Daniel da Costa Batista^b, Karla Carneiro de Siqueira Leite^c, Bianca Villavicencio^d, Géssica A. Vasconcelos^e, Andreia Luiza Pereira Silva^g, Renato Ivan de Ávila^g, Hugo Verli^d, Marize Campos Valadares^g, Eric de Souza Gil^c, Boniek G. Vaz^e, Luciano M. Lião^f, Ricardo Menegatti^c, Elson Alves Costa^{h,*}

^a Post-Graduate Program in Pharmaceutical Innovation, Faculty of Pharmacy, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil

^b Post-Graduate Program in Biological Sciences, Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás, Campus Samambaia, Goiânia, GO, Brazil

^c Laboratory of Medicinal Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil

^d Center of Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul, RS, Brazil

^e Chemistry Institute, Laboratory of Chromatography and Mass Spectrometry, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil

^f Chemistry Institute, Federal University of Goiás, Campus Samambaia, Goiânia, GO, Brazil

^g Laboratory of Pharmacology and Cell Toxicology, Faculty of Pharmacy, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil

^h Department of Pharmacology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás, Campus Samambaia, Goiânia, GO, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Analgesic
Anti-inflammatory
Anti-oxidants
Cytokines
Cyclo-oxygenase
Lipoxygenase

ABSTRACT

Dual 5-LOX/COX inhibitors are potential new dual drugs to treat inflammatory conditions. This research aimed to design, synthesis and to evaluate the anti-inflammatory and antinociceptive effects of the new compound, which is derived from nimesulide and darbufelone lead compounds. The new dual inhibitor 5-LOX/COX has the possible advantage of gastrointestinal safety. A voltammetric experiment was conducted to observe the drug's antioxidative effect. A formalin test, a hot plate test and carrageenan-induced mechanical hyperalgesia were employed to evaluate the analgesic nature of LQFM-091. To evaluate anti-inflammatory activity, we measured edema, leukocyte count, myeloperoxidase activity and cytokines levels in carrageenan-induced inflammation tests. We elucidated the underlying mechanisms by assessing the interaction the with COXs and LOX enzymes by colorimetric screening assay and molecular docking. The lethal dose (LD₅₀) was estimated using 3T3 Neutral Red Uptake assay. Our results indicate that the LQFM-091 prototype is a powerful antioxidant, as well as able to inhibit COX-1, COX-2 and LOX activities. LQFM091 was classified in GHS category 4 (300 < LD₅₀ < 2000 mg/Kg). This prototype showed analgesic activity in the formalin test and decreased carrageenan-induced mechanical hyperalgesia. Furthermore, LQFM-091 reduced the paw edema induced by carrageenan and reduced the leukocyte count, myeloperoxidase activity, TNF- α and IL-1 β levels in the pleural exudate. Another interesting finding was the absence of gastrointestinal lesions. These data indicate that LQFM-091 produced antinociceptive and anti-inflammatory effects while maintaining gastrointestinal safety. Furthermore, this compound presented a safe toxicological profile. Blocked COXs and LOX enzymes are important targets for manipulating the mechanism of this compound.

1. Introduction

Inflammation is a physiological response that begins immediately after tissue injury, and its main goal is to remove the pathogenic agent and to restore the tissue (Sousa et al., 2013). However, a prolonged inflammation may contribute to the pathogenesis of many chronic diseases of inflammatory origin (Gilroy et al., 2004).

In the inflammatory process, activation of cascade of arachidonic acid occurs that leads the production of several inflammatory mediators takes place through the action of cyclooxygenase (COX), lipoxygenase (LOX) and cytochrome P450s (CYP) enzymes (Dennis and Norris, 2015).

Cyclooxygenase is the key enzyme in the biosynthesis of prostaglandins (PGs) (González-Pérez and Clària, 2007). There are also LOX,

* Corresponding author.

E-mail address: xico@ufg.br (E.A. Costa).



ORIGINAL ARTICLE

Molecular docking and pharmacological/toxicological assessment of a new compound designed from celecoxib and paracetamol by molecular hybridization

Daiany P. B. da Silva¹ · Iziara F. Florentino¹ · Dayane M. da Silva¹ · Roberta C. Lino¹ · Carina S. Cardoso¹ · Lorrane K. S. Moreira¹ · Géssica A. Vasconcelos² · Daniela C. Vinhal³ · Anna C. D. Cardoso⁴ · Bianca Villavicencio⁵ · Hugo Verli⁵ · Boniek G. Vaz² · Luciano M. Lião² · Luiz C. da Cunha³ · Ricardo Menegatti⁴ · Elson A. Costa¹

Received: 3 April 2018 / Accepted: 9 July 2018
© Springer Nature Switzerland AG 2018

Abstract

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs are commonly used worldwide; however, they have several adverse effects, evidencing the need for the development of new, more effective and safe anti-inflammatory and analgesic drugs. This research aimed to design, synthesize and carry out a pharmacological/toxicological investigation of LQFM-102, which was designed from celecoxib and paracetamol by molecular hybridization. To evaluate the analgesic effect of this compound, we performed formalin-induced pain, hot plate and tail flick tests. The anti-inflammatory effect of LQFM-102 was evaluated in carrageenan-induced paw oedema and pleurisy tests. The biochemical markers indicative of toxicity—AST, ALT, GSH, urea and creatinine—as well as the index of gastric lesion after prolonged administration of LQFM-102 were also analyzed. In addition, the interaction of LQFM-102 with COX enzymes was evaluated by molecular docking. In all experimental protocols, celecoxib or paracetamol was used as a positive control at equimolar doses to LQFM-102. LQFM-102 reduced the pain induced by formalin in both phases of the test. However, this compound did not increase the latency to thermal stimuli in the hot plate and tail flick tests, suggesting an involvement of peripheral mechanisms in this effect. Furthermore, LQFM-102 reduced paw oedema, the number of polymorphonuclear cells, myeloperoxidase activity and TNF- α and IL-1 β levels. Another interesting finding was the absence of alterations in the markers of hepatic and renal toxicity or lesions of gastric mucosa. In molecular docking simulations, LQFM-102 interacted with the key residues for activity and potency of cyclooxygenase enzymes, suggesting an inhibition of the activity of these enzymes.

Keywords Gastric toxicity · Hepatotoxicity · Cytokines · Celecoxib · Paracetamol · LQFM-102

Introduction

Despite the notorious adverse effects mainly related to gastrointestinal tract and renal dysfunction, the nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) constitute a class of medications most commonly used worldwide (Sostres

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10787-018-0516-7>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Elson A. Costa
xico@ufg.br

¹ Laboratory of Pharmacology of Natural and Synthetic Products, Department of Pharmacology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás, Campus Samambaia - ICB 2 - Sala 216, CP 131, Goiânia, GO CEP 74001-970, Brazil

² Chemistry Institute, Federal University of Goiás, Campus Samambaia, Goiânia, GO, Brazil


³ Nucleus of Studies and Research Toxicopharmacological, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil

⁴ Laboratory of Medicinal Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Federal University of Goiás, Campus Samambaia, Goiânia, GO, Brazil

⁵ Center of Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil



Novel choline analog 2-(4-((1-phenyl-1*H*-pyrazol-4-yl)methyl)piperazin-1-yl)ethan-1-ol produces sympathoinhibition, hypotension, and antihypertensive effects

Ricardo Menegatti¹ · Flávio S. Carvalho¹ · Luciano M. Lião² · Bianca Villavicencio³ · Hugo Verli³ · Aline A. Mourão⁴ · Carlos H. Xavier⁴ · Carlos H. Castro⁴ · Gustavo R. Pedrino⁴ · Octavio L. Franco⁵ · Iransé Oliveira-Silva⁶ · Nicole M. Ashpole⁷ · Osmar Nascimento Silva⁵  · Elson A. Costa⁸ · James O. Fajemiroye^{4,6}

Received: 2 January 2019 / Accepted: 29 March 2019 / Published online: 2 May 2019

© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

The search for new drugs remains an important focus for the safe and effective treatment of cardiovascular diseases. Previous evidence has shown that choline analogs can offer therapeutic benefit for cardiovascular complications. The current study investigates the effects of 2-(4-((1-phenyl-1*H*-pyrazol-4-yl)methyl)piperazin-1-yl)ethan-1-ol (LQFM032) on cardiovascular function and cholinergic-nitric oxide signaling. Synthesized LQFM032 (0.3, 0.6, or 1.2 mg/kg) was administered by intravenous and intracerebroventricular routes to evaluate the potential alteration of mean arterial pressure, heart rate, and renal sympathetic nerve activity of normotensive and hypertensive rats. Vascular function was further evaluated in isolated vessels, while pharmacological antagonists and computational studies of nitric oxide synthase and muscarinic receptors were performed to assess possible mechanisms of LQFM032 activity. The intravenous and intracerebroventricular administration of LQFM032 elicited a temporal reduction in mean arterial pressure, heart rate, and renal sympathetic nerve activity of rats. The cumulative addition of LQFM032 to isolated endothelium-intact aortic rings reduced vascular tension and elicited a concentration-dependent relaxation. Intravenous pretreatment with L-NAME (nitric oxide synthase inhibitor), atropine (nonselective muscarinic receptor antagonist), pirenzepine, and 4-DAMP (muscarinic M1 and M3 subtype receptor antagonist, respectively) attenuated the cardiovascular effects of LQFM032. These changes may be due to a direct regulation of muscarinic signaling as docking data shows an interaction of choline analog with M1 and M3 but not nitric oxide synthase. Together, these findings demonstrate sympathoinhibitory, hypotensive, and antihypertensive effects of LQFM032 and suggest the involvement of muscarinic receptors.

Keywords Choline analog · Muscarinic receptor · Nitric oxide synthase · Sympathoinhibition

✉ Osmar Nascimento Silva
osmar.silva@catolica.edu.br

✉ James O. Fajemiroye
olulolo@yahoo.com

¹ Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO 74605-170, Brazil

² Chemistry Institute, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO 74001-970, Brazil

³ Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 91500-970, Brazil

⁴ Department of Physiology, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO 74001-970, Brazil

⁵ S-Inova Biotech, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, MS 79117-900, Brazil

⁶ UniEvangélica, Centro Universitário de Anápolis, Anápolis, GO 75083-515, Brazil

⁷ Department of BioMolecular Sciences, Division of Pharmacology, School of Pharmacy, University of Mississippi, University, MS 38677-1848, USA

⁸ Department of Pharmacology, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO 74001-970, Brazil

1
2
3 1 **Prediction, mapping and validation of tick glutathione S-transferase B-cell epitopes**
4 2

5 3 **Authors:**
6

7 4 Charles Ndawula Jr^{a,1}, Marina Amaral Xavier^{a,1}, Bianca Villavicencio^a, Fernanda Cortez Lopes^a, Maria
8 5 Aparecida Juliano^d, Luís Fernando Parizi^a, Hugo Verli^a, Itabajara da Silva Vaz Jr^{a,c}, Rodrigo Ligabue-
9 6 Braun^{a,b}
10
11

12 7
13 8 ^aCentro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil
14

15 9 ^bDepartamento de Farmacociências, Universidade Federal das Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto
16 10 Alegre, RS, Brazil
17

18 11 ^cFaculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil
19

20 12 ^dDepartamento de Biofísica, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo,
21 13 SP, Brazil
22

23 14
24 15 1 These authors contributed equally to the work.
25
26

27 16
28 17 **Correspondence to:** Itabajara da Silva Vaz Jr.
29

30 18 **Email:** itabajara.vaz@ufrgs.br
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56



DR JOSÉ MANUEL ESTEVEZ (Orcid ID : 0000-0001-6332-7738)

Article type : Rapid Report

Rapid report

A cell surface arabinogalactan-peptide influences root hair cell fate

Cecilia Borassi^{1,#}, Javier Gloazzo Dorosz^{1,#,*}, Martiniano M. Ricardi^{2,#}, Mariana Carignani Sardoy¹, Laercio Pol Fachin³, Eliana Marzol¹, Silvina Mangano¹, Diana Rosa Rodríguez García¹, Javier Martínez Pacheco¹, Yossmayer del Carmen Rondón Guerrero¹, Silvia M. Velasquez^{1,**}, Bianca Villavicencio⁴, Marina Ciancia⁵, Georg Seifert⁶, Hugo Verli⁴ & José M. Estevez^{1,7,†}

¹Fundación Instituto Leloir, Av. Patricias Argentinas 435, Buenos Aires CP C1405BWE, Argentina.

²Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIByNE-CONICET), Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular (FBMC), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires C1428EGA, Argentina.

³Centro Universitário CESMAC, Maceió, 57051160, Brazil.

⁴Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul CP 15005, Porto Alegre 91500-970 RS, Brazil.

⁵Universidad de Buenos Aires, Facultad de Agronomía, Departamento de Biología Aplicada y Alimentos, Cátedra de Química de Biomoléculas, Buenos Aires, Argentina and CONICET-Universidad de Buenos Aires, Centro de Investigación de Hidratos de Carbono (CIHIDECAR), C1428EGA, Buenos Aires, Argentina.

⁶University of Natural Resources and Life Science, BOKU Vienna, Department of Applied Genetics and Cell Biology, Muthgasse 11 A-1190, Vienna, Austria.

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1111/nph.16487

This article is protected by copyright. All rights reserved

10 Curriculum Vitæ

VILLAVICENCIO, B.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul · Av. Bento Gonçalves, 9500
Centro de Biotecnologia · 43421/202 · 91509900 · Porto Alegre, RS
bia.villavicencio@gmail.com · <http://lattes.cnpq.br/2206226220996619>

DADOS PESSOAIS

Nome completo: Bianca Villavicencio

Telefone para contato: +55 (51) 981917173

Nascimento: 01/01/1990, Bento Gonçalves - RS, Brasil

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2016 – ATUAL

DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

PPGBCM – UFRGS - PORTO ALEGRE, BR
VERLI

ORIENTAÇÃO: HUGO

“Avaliação Computacional do Efeito de Modificações na Estrutura de Peptídeos”

2014 – 2016

MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

PPGBCM – UFRGS – PORTO ALEGRE, BR
VERLI

ORIENTAÇÃO: HUGO

“Predição *in silico* do Efeito de Grampos Olefínicos em Peptídeos como Estratégia ao Planejamento Racional de Compostos Bioativos”

2009 – 2013

GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PUCRS – PORTO ALEGRE, BR
AZEVEDO JR

ORIENTAÇÃO: WALTER F. DE

PERÍODO SANDUÍCHE

POMONA COLLEGE – CLAREMONT, US
CAVALCANTI

ORIENTAÇÃO: ANDRE R. O.

2019

PRÊMIO MELHOR PÔSTER, ÁREA DE BIOLOGIA COMPUTACIONAL

48° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular

2013

MELHOR ALUNO DO CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)

2009

ARTIGOS PUBLICADOS E ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO

BORASSI, C.; GLOAZZO DOROSZ, J.; RICARDI, M. M.; CARIGNANI SARDOY, M.; POL-FACHIN, L.; MARZOL, E.; MANGANO, S.; RODRÍGUEZ GARCIA, D. R.; MARTÍNEZ PACHECO, J.; DEL CARMEN RONDÓN GUERRERO, Y.; VELASQUEZ, S. M.; **VILLAVICENCIO, B.**; CIANCIA, M.; SEIFERT, G.; VERLI, H.; ESTEVEZ, J. M. A cell surface arabinogalactan peptide influences root hair cell fate. *NEW PHYTOLOGIST* (no prelo).

MENEGATTI, R.; CARVALHO, F. S.; LIÃO, L. M.; **VILLAVICENCIO, B.**; VERLI, H.; MOURÃO, A. A.; XAVIER, C. H.; CASTRO, C. H.; PEDRINO, G. R.; FRANCO, O. L.; OLIVEIRA-SILVA, I.; ASHPOLE, N. M.; SILVA, O. N.; COSTA, E. A.; FAJEMIROYE, J. O. Novel choline analog 2-(4-((1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)methyl)piperazin-1-yl)ethan-1-ol produces sympathoinhibition, hypotension, and antihypertensive effects. *NAUNYN-SCHMIEDEBERGS ARCHIVES OF PHARMACOLOGY*, v. 392, p. 1071-1083, 2019.

VILLAVICENCIO, B.; LIGABUE-BRAUN, R.; VERLI, H. All-Hydrocarbon Staples and Their Effect over Peptide Conformation Under Different Force Fields. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 58, p. 2015-2023, 2018.

DA SILVA, D. P. B.; FLORENTINO, I. F.; DA SILVA, D. M.; LINO, R. C.; CARDOSO, C. S.; MOREIRA, L. K. S.; VASCONCELOS, G. A.; VINHAL, D. C.; CARDOSO, A. C. D.; **VILLAVICENCIO, B.**; VERLI, H.; VAZ, B. G.; LIÃO, L. M.; DA CUNHA, L. C.; MENEGATTI, R.; COSTA, E. A. Molecular docking and pharmacological/toxicological assessment of a new compound designed from celecoxib and paracetamol by molecular hybridization. *INFLAMMOPHARMACOLOGY*, 2018.

LINO, R. C.; DA SILVA, D. P. B.; FLORENTINO, I. F.; DA SILVA, D. M.; MARTINS, J. L. R.; BATISTA, D. C.; LEITE, K. C. S.; **VILLAVICENCIO, B.**; VASCONCELOS, G. A.; SILVA, A. L. P.; DE ÁVILA, R. I.; VERLI, H.; VALADARES, M. C.; GIL, E. S.; VAZ, B. G.; LIÃO, L. M.; MENEGATTI, R.; COSTA, E. A. Pharmacological evaluation and molecular docking of new di- tert -butylphenol compound, LQFM-091, a new dual 5-LOX/COX inhibitor. *EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES*, v. 106, p. 231-243, 2017.

DÍAZ, S.; **VILLAVICENCIO, B.**; CORREIA, N.; COSTA, J.; HAAG, K. L. Triatomine bugs, their microbiota and *Trypanosoma cruzi*: asymmetric responses of bacteria to an infected blood meal. *Parasites & Vectors*, v. 9, p. 636, 2016.

DA MOTA, M. F.; CORTEZ, A. P.; BENFICA, P. L.; RODRIGUES, B. S.; CASTRO, T. F.; MACEDO, L. M.; CASTRO, C. H.; LIÃO, L. M.; DE CARVALHO, F. S.; ROMEIRO, L. A. S.; MENEGATTI, R.; VERLI, H.; **VILLAVICENCIO, B.**; VALADARES, M. C. Induction of apoptosis in Ehrlich ascites tumour cells via p53 activation by a novel small-molecule MDM2 inhibitor - LQFM030. *JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACOLOGY*, v. 68, p. 1143-1159, 2016.

AZEVEDO, L. S.; MORAES, F. P.; XAVIER, M. M.; PANTOJA, E. O.; **VILLAVICENCIO, B.**; FINCK, J. A.; PROENÇA, A. M.; ROCHA, K. B.; AZEVEDO JR., W. F. Recent Progress of Molecular Docking Simulations Applied to Development of Drugs. *Current Bioinformatics*, v. 7, p. 352-365, 2012.

ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS

3ª edição da Escola Gaúcha de Bioinformática - EGB 2019

UFRGS - Porto Alegre – RS, BR

2ª edição da Escola Gaúcha de Bioinformática - EGB 2017

UFRGS - Porto Alegre – RS, BR

RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSO

Villavicencio, B., Verli, H. Structural Characteristics of Glycocins: Unraveling The Contribution of S-Linked Carbohydrates and Other Structural Elements. In: 48ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, Águas de Lindoia - SP. Livro de programa e resumos da 48ª Reunião Anual da SBBq, p.83, 2019.

Villavicencio, B., Verli, H. Structural Assessment of Glycocins and Their S-linked Carbohydrates. In: 47ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, Joinville – SC. Livro de programa e resumos da 48ª Reunião Anual da SBBq, p. 98, 2018.

Villavicencio, B., Verli, H. Structural Evaluation of the Computational Description of Glycocins and Their S-linked Carbohydrates. In: X Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada, e IV Encontro Latino-Americano de Microbiologia Aplicada, Porto Alegre – RS. Anais do X Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada / IV Encontro Latino-Americano de Microbiologia Aplicada, BI018, 2017.

Villavicencio, B., Ligabue-Braun, R., Verli, H. Molecular Dynamics of Stapled Peptides. In: 23rd Congress of the International Union for Biochemistry and Molecular Biology – IUBMB, and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology – SBBq, Foz do Iguaçu - PR. Livro de programa e resumos da 23rd IUBMB Congress and 44th Annual Meeting of SBBq, p.157, 2015.

Villavicencio, B., Ligabue-Braun, R., Verli, H. Molecular Dynamics of Stapled Peptides. In: I Escola Gaúcha de Bioinformática - Porto Alegre – RS. Pôster, 2015.

Villavicencio, B., Ligabue-Braun, R., Verli, H. Parametrização de estabilizadores conformacionais com potencial biotecnológico. In: VII Escola de Modelagem Molecular em Sistemas Biológicos - Petrópolis - RJ. Pôster, 2014.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2015

GENOMICS BOOTCAMP WORKSHOP

PPGBM – UFRGS - PORTO ALEGRE, BR

2013 – 2014

ESTÁGIO - CLONAGRO COMÉRCIO E PRODUÇÃO VEGETAL LTDA

PORTO ALEGRE, BR