

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

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E CONFORMACIONAL
DE TOXINAS DA FAMÍLIA DAS ACTINOPORINAS**

Edson Fauth Vargas Filho

Porto Alegre – Brasil
Junho de 2010

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E CONFORMACIONAL
DE TOXINAS DA FAMÍLIA DAS ACTINOPORINAS**

Edson Fauth Vargas Filho

Dissertação de mestrado elaborada no Grupo de Bioinformática Estrutural do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob orientação do professor doutor:

Hugo Verli

Porto Alegre – Brasil

Junho de 2010

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTRAL E CONFORMACIONAL
DE TOXINAS DA FAMÍLIA DAS ACTINOPORINAS**

Edson Fauth Vargas Filho

Dissertação 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 Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Banca Examinadora:

Hugo Verli (Centro de Biotecnologia - UFRGS) (Presidente)

Carlos Termignoni (Centro de Biotecnologia - UFRGS)

Paulo A. Netz (Instituto de Química - UFRGS)

Laurent E. Dardenne (Laboratório Nacional de Computação Científica - LNCC)

Diogo R. Demartini (Centro de Biotecnologia) (Suplente)

Esta dissertação foi realizada sob a orientação do professor Doutor Hugo Verli, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, junto ao Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

FICHA CATALOGRÁFICA

FAUTH, Edson Vargas Filho.

**Caracterização Estrutural e Conformacional de Toxinas
da Família das Actinoporinas**

Rio Grande do Sul, UFRGS, Centro de Biotecnologia, 2010.

Dissertação: Mestre em Ciências (Biologia Celular e Molecular)

- | | |
|------------------------------|-------------------------------|
| 1. Dinâmica Molecular | 2. Actinoporinas |
| 3. Variáveis Físico-Químicas | 4. Toxinas Formadoras de Poro |

I. Hugo Verli

II. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Centro de Biotecnologia

III. Títulos

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe por me dar coragem para enfrentar a vida de frente, e por me fazer acreditar nos meus sonhos. Graças aos teus ensinamentos aprendi que as coisas só valem a pena quando feitas com amor.

Ao meu pai pelo exemplo de bom homem, e por todo seu apoio durante a conquista desse grande objetivo.

À minha avó que durante muito tempo me criou como filho, e hoje mesmo com seu problema de saúde ainda consegue se lembrar e me dizer: “Por que você demorou tanto? Eu estava morrendo de saudades...”

À minha namorada por me amar, e por muitas vezes entender, mesmo sem querer, que o meu trabalho estava exigindo uma dedicação maior. Amo você!

Aos meus amigos de Porto Alegre que se transformaram em minha mais nova família! Aos amigos de Passo Fundo pelo apoio e incentivo necessário a nossa evolução! Muito obrigado!

Ao professor Hugo pelos ensinamentos científicos, por estar sempre do meu lado, e por me dar força para superar todas as dificuldades encontradas.

A Fernanda Stanisçuaski por seu interesse e sinceridade ao ler meu manuscrito. Muito obrigado pelas conversas. Tuas sugestões foram muito importantes.

Ao professor Eduardo M. Cilli por ter confiado ao grupo de Bioinformática Estrutural - UFRGS o projeto inicial desse tema e por ser um parceiro na construção do conhecimento.

Ao Grupo de Bioinformática Estrutural por me receber de braços abertos, e por ser um ambiente de trabalho exemplar.

Aos amigos do Grupo de Bioinformática Estrutural, em especial: Laércio Pol-Fachin, Guilherme Menegon Giesel, Cláudia Lemelle Fernandes, Rodrigo Ligabue Braun, Clóvis Woicickoski Júnior, Liana Guimarães Sachett, Giovana Bergamini, Wagner Alexandre Lucena, Carla Gottschald Chiodi e Conrado Pedebos.

Ao CBIOT, PPGBCM, e todos seus professores pelo curso de excelência.

A banca examinadora desse trabalho por sua participação, atenção e colaboração.

À Sílvia Centeno por sua enorme gentileza e carinho, e também ao Luciano Saucedo por fazerem toda a diferença na organização das atividades do PPGBCM.

Aos colegas do PPGBCM pelo exemplo de solidariedade, transmissão de conhecimento, e vontade de transformar o nosso país em um lugar melhor. Que os ensinamentos do Prof. Leopoldo de Meis se perpetuem pela eternidade!

“Leva tempo para alguém ser bem sucedido porque o êxito não é mais do que a recompensa natural pelo tempo gasto em fazer algo direito.”

Joseph Ross

Dedico esta Dissertação as pessoas que foram especiais durante minha jornada para esta conquista.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT.....	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xv
ÍNDICE DE TABELAS.....	xviii
1. Introdução.....	1
1.1 Proteínas formadoras de poro em membrana	1
1.1.1 α -toxinas formadoras de poro (α -TFPs).....	2
1.1.2 β -toxinas formadoras de poro (β -TFPs)	3
1.1.3 Passos gerais do processo de formação de poro pelas TFPs	4
1.2 Os celenterados e os peptídeos tóxicos de anêmonas.....	4
1.3 Anêmonas e Actinoporinas	7
1.3.1 Regiões estruturalmente importantes de actinoporinas	10
1.3.2 Mecanismo de ação de actinoporinas.....	13
1.3.3 Influência de variáveis físico-químicas sobre a ação de actinoporinas	15
1.4 Caracterização de biomoléculas por Dinâmica Molecular.....	18
1.4.1 Equação de movimento	19
1.4.2 Campo de força	19
1.4.3 Transferabilidade	21
1.4.4 Condições periódicas de contorno.....	21
1.4.5 Controle da temperatura e pressão	22
1.4.6 Sistemas solvatados	22
1.4.7 Restrição dos movimentos moleculares.....	23

1.4.8	Apresentação dos resultados.....	24
1.4.9	Vantagens da utilização do GROMACS.....	24
2.	Objetivos.....	26
3.	Metodologia.....	27
3.1	Programas utilizados.....	27
3.2	Procedimentos gerais.....	27
3.3	Simulação de DM.....	28
3.3.1	Protocolo de simulação.....	28
3.3.2	Sistemas simulados.....	30
3.3.3	Validação das simulações de DM.....	31
4.	Resultados.....	32
4.1	Preâmbulo.....	32
5.	Conclusões.....	60
6.	Glossário.....	61
7.	Referências Bibliográficas.....	63
8.	Anexos.....	72
8.1	Fluxograma da abordagem utilizada para a realização deste trabalho.....	72
8.2	Arquivos para a simulação por DM em solução de ureia 10,0 M.....	73
9.	Curriculum Vitae.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS

Ct – região C-terminal da proteína

DC – Dicroísmo Circular

EF – Espectroscopia de Fluorescência

ETF – Espectroscopia por meio de Transformada de Fourier

EqtxII – Equinatoxina II

DM – Dinâmica Molecular

M - molar

ME – Microscopia Eletrônica

MM – Mecânica Molecular

μ M – micromolar

nM – nanomolar

Nt – região N-terminal da proteína

PDB – Protein Data Bank

PME – Particle-Mesh Ewald

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

StnI – Esticolisina I

StnII – Esticolisina II

SLF – Sítio de Ligação a Fosfocolina

TFP – Toxinas Formadoras de Poro

RESUMO

Proteínas citolíticas são produzidas por uma grande diversidade de organismos, dentre os quais destacam-se os cnidários. Estes organismos podem produzir uma série de toxinas que auxiliam na sua sobrevivência, liberadas por nematocistos. A maioria dos cnidários são considerados tóxicos, e mais de 32 espécies de anêmonas já foram relatadas como fonte de proteínas e peptídeos citolíticos letais. Dentre essas proteínas, o grupo mais amplo é formado pelas citolisinas conhecidas como actinoporinas, proteínas formadoras de poro em membranas que possuem potente atividade hemolítica. As bases estruturais para essa atividade mostram-se dependentes do correto enovelamento protéico, principalmente em regiões específicas que, portanto, apresentam importância funcional: o segmento N-terminal, a região rica em resíduos de triptofano e o sítio de ligação à fosfocolina. Diferentes condições em solução são capazes de influenciar a capacidade das actinoporinas de formar poro em modelos de membrana e na superfície de hemácias. Contudo, embora dados de ressonância magnética nuclear (RMN) e cristalografia tenham sido relatados para esta família de proteínas, dados estruturais e conformacionais adicionais se fazem necessários para a compreensão das razões moleculares desta atividade e, por conseguinte, para sua posterior exploração biotecnológica e terapêutica. Neste contexto, o presente trabalho tem por objetivo caracterizar a influência de diferentes fatores físico-químicos sobre o enovelamento das duas actinoporinas mais estudadas, esticolisina II (StnII) e equinatoxina II (EqtxII), empregando para tal simulações de dinâmica molecular (DM). Os resultados obtidos oferecem um melhor entendimento do efeito de altas concentrações de ureia sobre a perda de atividade hemolítica da StnII, assim como fornecem possíveis evidências para a influência de soluções ácidas sobre o enovelamento da hélice C-terminal (parte do sítio de ligação à fosfocolina). Considerando o papel dessa região no reconhecimento de fosfolipídeos de membrana, as transições conformacionais observadas podem estar relacionadas às ações biológicas desta classe de toxinas.

ABSTRACT

Cytolytic toxins are produced by many organisms, mainly including the cnidarians. These organisms are able to produce a variety of toxins that are important for their survival, delivered by nematocysts. The majority of cnidarians are considered toxic organisms and more than 32 species of sea anemones have been already reported to produce lethal cytolytic peptides and proteins. Among these toxic polypeptides, the most numerous are the cytolytins, collectively called actinoporins, potent pore-forming proteins that present hemolytic activity. The structural basis for such activity was related to their correct folding, mainly around specific regions that, however, present functional importance: the proteins N-terminal segment, a region rich in tryptophan residues and the phosphocholine-binding-site. Different solution conditions influence the pore formation capacity of the actinoporins in model lipid membranes and on the surface of red blood cells. In this way, although nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and X-ray crystallography data had been reported to this protein family, additional structural and conformational information might be necessary to understand the molecular reasons for such activity and also to improve their biotechnological and therapeutic exploration. In this context, the current work intends to characterize the influence of different physical-chemical factors in the folding of the two most studied actinoporins, Sticholysin II (StnII) and Equinatoxin II (EqtxII), applying to this molecular dynamics (MD). The obtained results provide a better understanding for the lack of StnII hemolytic activity when it is submitted to a high urea concentration, as well as possible evidences of the influence of acid solutions in the folding of the C-terminal helix (present at the phosphocholine-binding-site). Considering the role of this region in the recognition of membrane phospholipids, the observed conformational transitions may be related with the biological action of this class of toxins.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura 3D de algumas α -TFPs. Os círculos coloridos indicam a região que parece ser responsável pela inserção das toxinas em membranas. Adaptado de Parker & Feil, 2005.	2
Figura 2: Estruturas 3D de algumas β -TFPs. Adaptado de Parker & Feil, 2005.	3
Figura 3: Estruturas de RMN de algumas proteínas tóxicas obtidas de anêmonas. Adaptado de Norton, 2009.	5
Figura 4: A) <i>Actinia equina</i> e B) <i>Stichodactyla helianthus</i> . Imagens obtidas nos endereços: http://www.czinke.de/aquaristik/bilderliste.htm?ordner=wirbellose e http://reefguide.org/sunanemone.html , em 26/12/2009.	7
Figura 5: Estrutura cristalográfica da StnII em sua forma livre (PDB ID 1GWY), complexada com glicerol (PDB ID 1O71) e complexada com fosforilcolina (PDB ID 1O72). Estrutura cristalográfica da EqtxII (PDB ID 1IAZ) e sua estrutura de RMN (PDB ID 1KD6).	9
Figura 6: Representação das regiões estruturais importantes e altamente conservadas nas actinoporinas. Estrutura Cristalográfica da StnII complexada com a fosforilcolina (PDB ID 1O72). Em destaque: a região N-terminal (resíduos 1-30) e a região C-terminal (resíduos 80-175) com os aminoácidos do SLF (Ser52, Val85, Ser103, Pro105, Tyr111, Tyr131, Tyr135, Tyr136) voltados para a fosforilcolina. Adaptado de Mancheño <i>et al.</i> , 2003.	11
Figura 7: A) Poro oligomérico formado pela StnII em monocamadas de fosfolipídeos obtida por microscopia eletrônica e B) o encaixe da estrutura	

cristalográfica da StnII sobre os mapas de densidade eletrônica. Adaptado de Mancheño <i>et al.</i> , 2003.	12
Figura 8: Modelo do mecanismo de ação de actinoporinas. A) StnII em solução, seguida por sua forma B) justaposta à superfície de membranas. Esta interação permite o deslocamento da região N-terminal, dando origem ao poro apresentado em C) de forma frontal, com o monômero amarelo omitido, e em D) de cima do poro. Adaptado de Mancheño <i>et al.</i> , 2003.	13
Figura 9: Modelos de formação de poro para peptídeos com capacidade de enovelamento em α -hélice anfipática. A) Poro do tipo toroidal - peptídeos estão sempre associados com as cabeças lipídicas e o formato do poro se parecem com o de um pneu (<i>e.g.</i> melitina) B) Poro do tipo barril de estacas - peptídeos estão agregados de maneira que não há participação lipídica (<i>e.g.</i> alameticina). Adaptado de Yang <i>et al.</i> , 2001.	14
Figura 10: Funções de energia que compõem o campo de força GROMOS. De cima para baixo estão representadas as equações que descrevem o estiramento de ligações químicas, ângulos de ligação, diedros próprios, diedros impróprios e interações intermoleculares (interações eletrostáticas/Coulômbicas e interações de van der Waals, também identificadas como potencial de Lennard-Jones). Adaptado de Verli, Tese de doutorado, 2005 e van Gunsteren <i>et al.</i> , 2006.	20
Figura 11: Estrutura dos 20 aminoácidos das proteínas corporais humanas, com os grupos amina e carboxilato em condição fisiológica (pH 7.0), de acordo com os valores de pKa desses grupos em cada aminoácido. Adaptado de Lehninger, 1992.	29
Figura 12: Esquema das etapas que compõe as simulações de DM a 310 K. De 0 ps a 30 ps, uma série de etapas, de 5 ps cada, aquece lentamente o sistema em	

incrementos de 50 K. Após 30 ps, o sistema está a 310 K e se mantém nesta temperatura pelo resto da simulação. Adaptado de Verli, Tese de doutorado, 2005.

.....30

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Estruturas das actinoporinas encontradas no Protein Data Bank.....	8
Tabela 2: Regiões importantes e altamente conservadas de actinoporinas.....	10
Tabela 3: Comparação das modificações causadas por diferentes soluções na estrutura das actinoporinas StnII e EqtxII	17

1. Introdução

1.1 *Proteínas formadoras de poro em membrana*

Proteínas citolíticas são produzidas por uma grande diversidade de organismos vivos, particularmente bactérias, mas também por insetos, répteis venenosos e alguns tipos de invertebrados marinhos (Parker & Feil, 2005). Dentre as funções que essas toxinas podem ter para seu hospedeiro destaca-se a possibilidade de auxiliar na digestão ou degradação de uma ampla variedade de compostos e de atuar em ações defensivas, as quais podem ser úteis na proteção contra predadores (Parker & Feil, 2005).

Uma vez produzidas por seus organismos de origem, essas toxinas devem ser secretadas na sua forma solúvel em solvente aquoso. Entretanto, quando encontram seu alvo biológico elas se tornam insolúveis, sendo capazes de inserir-se ou translocar-se através de membranas celulares. Até o momento, mais de 300 toxinas protéicas já foram caracterizadas, e pelo menos um terço delas age por meio da perturbação da permeabilidade da membrana (Alouf, 2001). Muitas dessas toxinas parecem atuar simplesmente por sua capacidade de formar poros, fato que leva a perda da integridade celular e, eventualmente, ocasiona a morte da célula. Por outro lado, toxinas com ação intracelular necessitam atravessar a barreira imposta pelas membranas até conseguir atingir seus alvos citosólicos. Em ambas as situações, a passagem do estado solúvel para o estado inserido em membrana exige uma série de modificações conformacionais, as quais devem aumentar a exposição das regiões apolares em sua superfície a fim de permitir que tal processo aconteça (Parker & Feil, 2005).

As toxinas formadoras de poro em membrana podem ser classificadas de diferentes maneiras, como por exemplo, de acordo como o organismo que a produziu, ou por alguma característica específica que é exigida para sua atividade. Uma classificação particularmente útil foi descrita por Gouaux (1997). Esta classificação considera características estruturais das proteínas, oferecendo suporte para o uso da região potencialmente responsável por fornecer sustentação ao poro

como referência para nomear o grupo. Assim, as toxinas formadoras de poro (TFPs) podem ser divididas em toxinas de tipo alfa (α) e beta (β).

1.1.1 α -toxinas formadoras de poro (α -TFPs)

As α -TFPs são conhecidas como toxinas capazes de formar poros utilizando uma ou mais das suas estruturas em α -hélice. Possuem frequentemente um grande conteúdo deste tipo de estrutura secundária, dentro da qual uma região específica rica em α -hélice parece ser responsável por seu mecanismo de ação (Figura 1). Esse grupo inclui as seguintes toxinas: as colicinas, a exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*, algumas δ -endotoxinas (Cry), a toxina diftérica, as actinoporinas e as proteínas apoptóticas da família Bcl-2 (Parker & Feil, 2005).

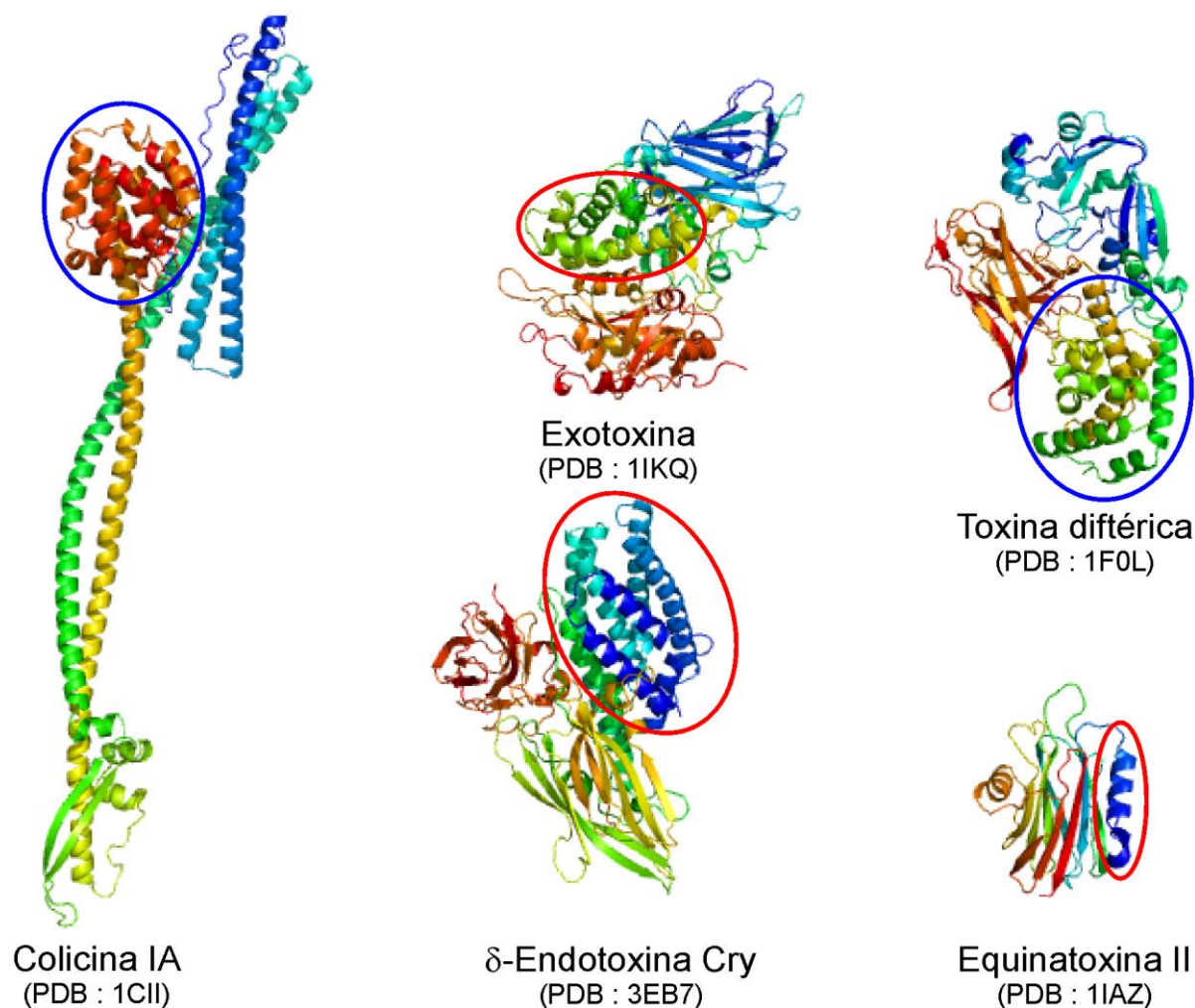


Figura 1: Estrutura 3D de algumas α -TFPs. Os círculos coloridos indicam a região que parece ser responsável pela inserção das toxinas em membranas. Adaptado de Parker & Feil, 2005.

1.1.2 β -toxinas formadoras de poro (β -TFPs)

As β -TFPs são toxinas que geralmente possuem um grande conteúdo de folhas- β . São assim denominadas por se inserirem em membranas pela organização de uma estrutura com características de barril- β (Figura 2). Inclui as seguintes toxinas: aerolisina, α -toxina de *Clostridium septicum*, α -hemolisina de *Staphylococcus aureus*, citotoxina de *Pseudomonas aeruginosa*, antígeno protetivo do antrax, algumas δ -endotoxinas (Cyt), e citolisinas dependentes de colesterol.

O conhecimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos no processo de formação de poro pelas β -TFPs sugere que elas devam compartilhar um mesmo mecanismo de ação (Parker, 2003; Parker & Feil, 2005). Adicionalmente, dentre todas as TFPs somente a α -hemolisina do *S. aureus* tem seu estado oligomérico caracterizado em resolução atômica (Álvarez *et al.*, 2009).

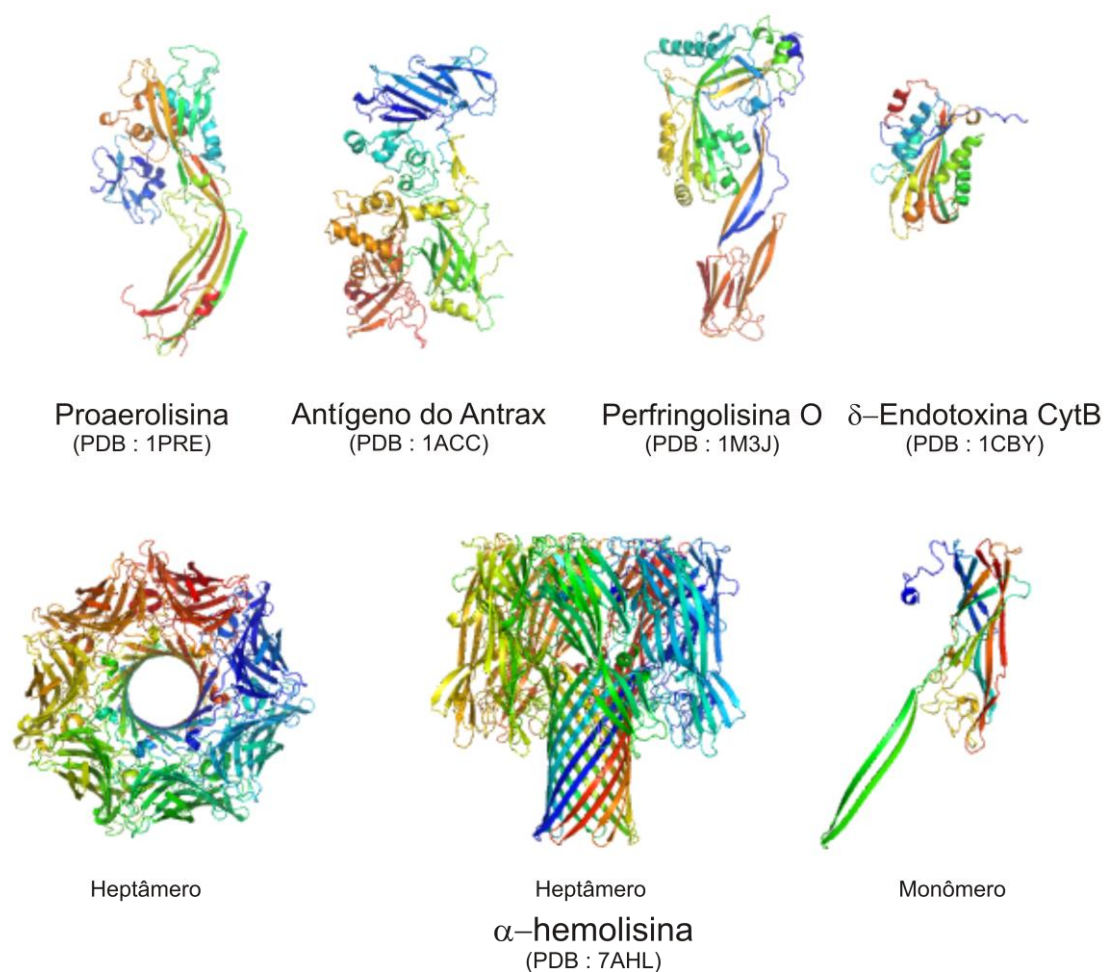


Figura 2: Estruturas 3D de algumas β -TFPs. Adaptado de Parker & Feil, 2005.

1.1.3 Passos gerais do processo de formação de poro pelas TFPs

Independente do grupo a que as TFPs pertencem, considera-se como básicos alguns passos envolvidos na geração do poro. Inicialmente, as toxinas são secretadas por seu hospedeiro e, posteriormente, seguem características específicas (ver a seguir) que as direcionam para a superfície de suas células-alvo onde devem exercer seu mecanismo de ação.

Os preceitos atuais para esse mecanismo consideram que as moléculas na superfície da célula (*e.g.* proteínas, lipídeos e açúcares) devem servir como receptores moleculares, possibilitando um ambiente favorável à concentração da toxina. Assim, as quantidades necessárias para a oligomerização podem ser alcançadas, o que constitui em si um importante fator para a oligomerização. Em outras situações, por outro lado, uma interação inicial entre a toxina e a membrana pode ser importante para a formação do complexo. Adicionalmente, mesmo que essas variáveis sejam as mais prováveis, outros fatores como a ativação de cascatas de sinalização através de membranas, não podem ser desconsiderados (Parker & Feil, 2005).

A domesticação e direcionamento desta atividade formadora de poros abre importantes perspectivas biotecnológicas (*e.g.* construção de imunotoxinas para o tratamento do câncer e de doenças parasitárias) (Tejuca *et al.*, 2009) que, contudo, têm como limitação o reduzido entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos no processo de formação do poro em membranas. Neste ínterim, diversas TFPs têm tido suas estruturas 3D determinadas com resolução atômica, proporcionando grandes avanços na compreensão dos mecanismos de ação dessas toxinas (Parker & Feil, 2005).

1.2 Os celenterados e os peptídeos tóxicos de anêmonas

As espécies do filo dos celenterados dividem-se em quatro classes: Hydrozoa (hidras e caravelas), composta por cerca de 2.700 espécies, Scyphozoa e Cubozoa (águas-vivas) com cerca de 200 espécies, e Anthozoa (anêmonas e corais), com aproximadamente 6.000 espécies (Rupert & Barnes, 1994; Moore, 2003).

Os celenterados ou cnidários são organismos predominantemente marinhos e foram os primeiros metazoários a exibir uma cavidade digestiva. Essa cavidade gastrovascular, denominada celêntero, é incompleta, pois apresenta uma única

abertura que funciona como boca e ânus (Rupert & Barnes, 1994; Moore, 2003). Todos os membros deste filo possuem, ao redor dessa abertura, tentáculos dotados de muitas células urticantes (cnidoblastos). Estas células, por sua vez, são equipadas com organelas especializadas (nematocistos) que produzem uma série de toxinas envolvidas na captura e digestão de alimentos (Rupert & Barnes, 1994; Anderluh & Macek, 2002; Moore, 2003; Norton, 2009). Assim, a digestão desses organismos começa extracelularmente, na cavidade gastrovascular, e termina no interior das células da sua gastroderme. Além da importância no suprimento e digestão de alimentos, essas toxinas também apresentam um papel importante nos mecanismos de defesa desses seres vivos (Rupert & Barnes, 1994; Anderluh & Macek, 2002; Moore, 2003).

Um dos aspectos mais interessantes sobre os cnidários é que, majoritariamente, eles são considerados como venenosos, embora poucos sejam os estudos bioquímicos e farmacológicos realizados na sua caracterização (Anderluh & Macek, 2002). Por outro lado, diversos peptídeos e proteínas tóxicas vêm sendo descritos em anêmonas (filo Cnidaria, classe Anthozoa, ordem Actiniaria) (Figura 3, Norton, 2009).

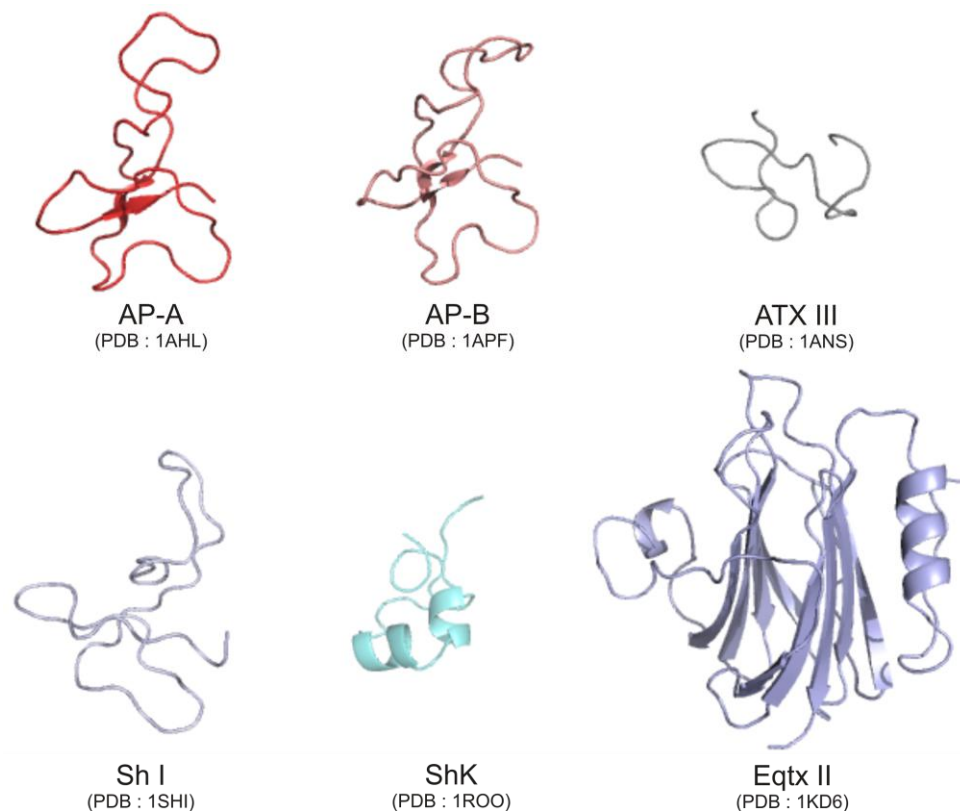


Figura 3: Estruturas de RMN de algumas proteínas tóxicas obtidas de anêmonas. Adaptado de Norton, 2009.

As toxinas protéicas obtidas de anêmonas (Figura 3) podem ser divididas em: 1) toxinas que se ligam a canais de Na⁺; 2) toxinas bloqueadoras de canais de K⁺; 3) citolisinas; 4) inibidores de proteases, e 5) toxinas similares a fatores de crescimento epidermal, entre outras (Norton, 2009). Dentre estes, os grupos de toxinas mais bem caracterizados em anêmonas são as que se ligam a canais de Na⁺ e as citolisinas.

Devido à grande variedade de citolisinas em anêmonas e ao interesse sobre os seus possíveis empregos biotecnológicos e terapêuticos, uma classificação exclusiva foi criada para facilitar sua caracterização (Anderluh & Macek, 2002). Essa classificação considera a seqüência de aminoácidos, o peso molecular e as propriedades funcionais de cada citolisina, estando dividida nos seguintes grupos:

- *Grupo I*: Citolisinas de 5-8 kDa, com ou sem atividade anti-histamínica;
- *Grupo II*: Citolisinas de ≈ 20 kDa;
- *Grupo III*: Citolisinas de 30-40 kDa, com ou sem atividade de fosfolipase A₂;
- *Grupo VI*: Citolisinas de 80 kDa, tiol-ativadas.

O *grupo I* é encontrado em diferentes espécies de anêmonas, e suas propriedades bioquímicas vêm sendo amplamente estudadas. Essas proteínas apresentam característica básica (PI ≈ 9,2), possuem resíduos de cisteína, não apresentam resíduos de triptofano e suas estruturas tridimensionais são desconhecidas. São menos ativas do que as citolisinas dos grupos II e III e apresentam especificidade por fosfatidilcolina, mas dificilmente são inibidas por pré-tratamento com esfingomiéline. Além da atividade citolítica, alguns desses peptídeos exibem atividade anti-histamínica (Anderluh & Macek, 2002).

O *grupo II* é o mais amplo em número de toxinas e o mais estudado. É formado por proteínas que não apresentam resíduos de cisteína e possuem um alto ponto isoelétrico (9,8-10,2). Essas proteínas podem ser isoladas de muitos gêneros da família Actiniidae e Stichodactylidae, e por isso são conhecidas como actinoporinas. São polipeptídios com características anfipáticas que compartilham homologia (66-85% de identidade). Não têm sua atividade hemolítica perdida em pré-tratamento com colesterol, mas são inibidas, quando pré-tratadas, com esfingomiéline (Anderluh & Macek, 2002). Pelas características dessas proteínas acredita-se que elas possuem o mesmo mecanismo de ação (ver adiante no texto) (Lanio *et al.*, 2001; Huerta *et al.*, 2001; Athanasiadis *et al.*, 2001; Hinds *et al.*, 2002; Mancheño *et al.*, 2003).

As citolisinas do *grupo III* (30-40 kDa) são tão potentes quanto as toxinas do grupo II, e a concentração necessária para sua atividade é da ordem de 1×10^{-9} molar (nM). Também são inibidas por pré-tratamentos com esfingomiélna e não perdem sua capacidade hemolítica quando pré-tratadas com colesterol. Além da atividade citolítica, algumas apresentam atividade de fosfolipase A_2 (Anderluh & Macek, 2002).

Por fim, o *grupo IV* possui apenas um membro com peso molecular de 80 kDa e demonstra especificidade por colesterol. Este tipo de citolisina pode ser ativado por compostos tíólics (e.g. ditiotreitól), e parece ter similaridade com grupos de citolisinas encontradas em bactérias (Anderluh & Macek, 2002).

1.3 Anêmonas e Actinoporinas

As anêmonas são organismos celenterados do filo Cnidaria, classe Anthozoa e ordem Actiniaria, que produzem uma grande variedade de peptídios biologicamente ativos. Entre suas espécies, mais de 32 são capazes de sintetizar peptídeos e proteínas citolíticas (Lanio *et al.*, 2001; Anderluh & Macek, 2002). O grupo mais amplo e melhor caracterizado destas citolisinas é formado pelas actinoporinas, as quais podem ser purificadas de vários gêneros da família Actiniidae e Stichodactylidae. Adicionalmente, as actinoporinas mais estudadas são a esticolisina II (StnII) e a equinatoxina II (EqtxII), obtidas das anêmonas *Stichodactyla helianthus* e *Actinia equina*, respectivamente (Lanio *et al.*, 2001; Kristan *et al.*, 2009) (Figura 4).



Figura 4: A) *Actinia equina* e B) *Stichodactyla helianthus*. Imagens obtidas nos endereços: <http://www.czinke.de/aquaristik/bilderliste.htm?ordner=wirbellose> e <http://reefguide.org/sunanemone.html>, em 26/12/2009.

A compreensão dos aspectos estruturais destas toxinas vem sendo alimentada por métodos espectroscópicos e técnicas como a espectroscopia de ressonância magnética nuclear e a cristalografia de raio-X (Norton, 2009). Neste contexto, a referência de estrutura tridimensional para esse grupo de proteínas, baseia-se nas estruturas com resolução atômica da StnII e da EqtxII, as quais compartilham 65% de identidade. Os modelos estruturais disponíveis de actinoporinas (Tabela 1) demonstram que elas são proteínas globulares em seu estado solúvel, possuem um grande conteúdo de estrutura em folhas- β na região central, uma α -hélice na porção N-terminal e outra α -hélice na região C-terminal, originando um arranjo estrutural do tipo β -sanduíche (Figura 5) (Athanasiadis *et al.*, 2001; Hinds *et al.*, 2002; Mancheño *et al.*, 2003).

Tabela 1: Estruturas das actinoporinas encontradas no Protein Data Bank.

Proteína	código PDB	resíduos	resolução (Å)	método	cadeias	referência
StnII	1GWY	175	1,71	raio-X	2	Mancheño <i>et al.</i> , 2003
StnII	1O71	175	2,26	raio-X	2	Mancheño <i>et al.</i> , 2003
StnII	1O72	175	2,41	raio-X	2	Mancheño <i>et al.</i> , 2003
EqtxII	1KD6	179	-	RMN	1	Hinds <i>et al.</i> , 2001
EqtxII	1IAZ	175	1,90	raio-X	2	Athanasiadis <i>et al.</i> , 2001

As actinoporinas são sintetizadas na forma de monômeros solúveis e permanecem em meio aquoso até sua ligação e oligomerização em membranas (Mancheño *et al.*, 2001). Sugere-se que durante a conversão do estado solúvel para o estado ligado à membrana, a toxina passe por uma grande alteração conformacional (Mancheño *et al.*, 2001). Entretanto, uma das maiores dificuldades até hoje encontradas está relacionada com a direta visualização do estado oligomérico e, conseqüentemente, da extensão destas mudanças conformacionais, uma vez que o complexo que forma o poro possui uma baixa estabilidade ao ser isolado (Mancheño *et al.*, 2003; Kristan *et al.*, 2004).

Entre os ensaios de atividade empregados na caracterização dessas toxinas, a atividade hemolítica é o que demonstra maior sensibilidade, já que consegue diferenciar a capacidade hemolítica da StnI e da StnII (91% de identidade) (Álvarez, 2009). Além disso, pré-tratamentos utilizando diferentes condições físico-químicas em solução (alta concentração salina, variação do pH e condições desnaturantes, dentre outras) são capazes de modificar a atividade hemolítica dessas toxinas e influenciam sua capacidade de formar poro em membrana (Poklar *et al.*, 1997, Álvarez *et al.*, 1998, Álvarez *et al.*, 2001, Martínez *et al.*, 2001; Mancheño *et al.*, 2001, Ulrih, *et al.*, 2004). O reconhecimento dessa informação estimulou tanto a busca por intermediários entre o estado solúvel e acoplado a membranas, quanto a determinação das regiões estruturais importantes neste processo (Poklar *et al.*, 1997; Mancheño *et al.*, 2001). Adicionalmente, experimentos avaliando mutantes de actinoporinas proporcionaram a confirmação de que regiões conservadas são essenciais para a atividade biológica desta classe de toxinas (Anderluh *et al.*, 1997; Anderluh *et al.*, 1999; Hong *et al.*, 2002; Alegre-Cebollada *et al.*, 2004; Kristan *et al.* 2004; Pazos *et al.*, 2006).

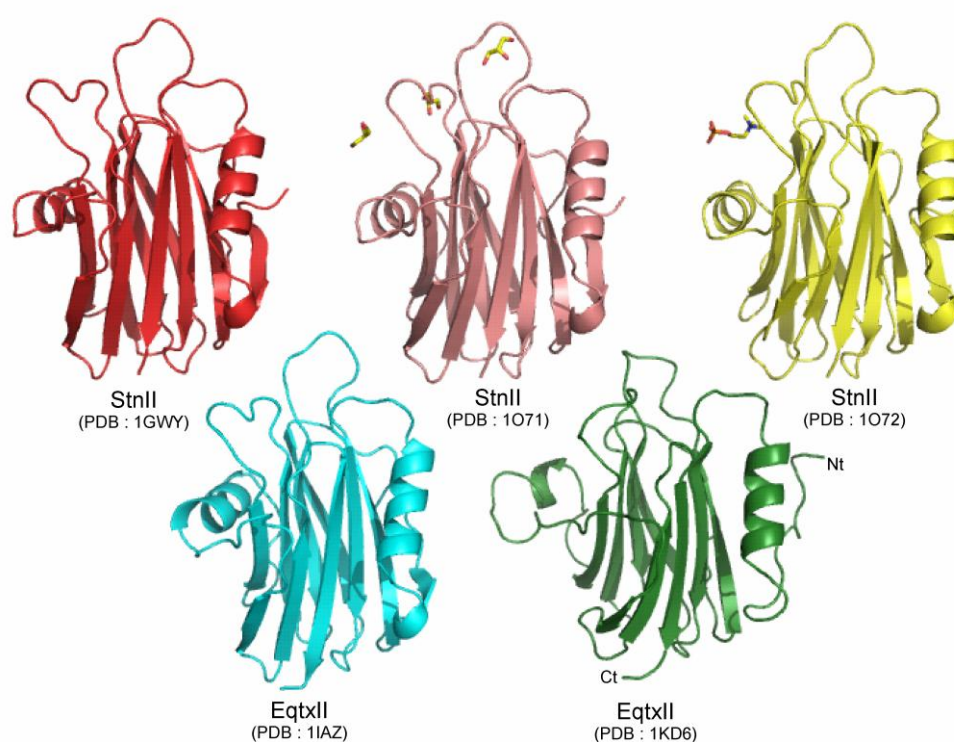


Figura 5: Estrutura cristalográfica da StnII em sua forma livre (PDB ID 1GWY), complexada com glicerol (PDB ID 1O71) e complexada com fosforilcolina (PDB ID 1O72). Estrutura cristalográfica da EqtxII (PDB ID 1IAZ) e sua estrutura de RMN (PDB ID 1KD6).

1.3.1 Regiões estruturalmente importantes de actinoporinas

Dentre as regiões conservadas nas actinoporinas relatadas como apresentando importância funcional destacam-se o segmento N-terminal, a região rica em resíduos de triptofano, e o sítio de ligação à fosfocolina (Tabela 2).

Tabela 2: Regiões importantes e altamente conservadas de actinoporinas.

Regiões	StnII	EqtxII	Homologia*
N-terminal	Ala1-Lys30	Ser1-Ile33	84%
Alça entre fitas β_6 e β_7	Tyr108-Trp115	Tyr110-Trp117	100%
α -hélice C-terminal	Gln128-Tyr136	Gln130-Tyr138	89%
Sítio de ligação à fosfocolina (SLF)	Ser52, Val85, Ser103, Pro105, Tyr111, Tyr131, Tyr135, Tyr136	Ser54, Val87, Ser105, Pro107, Tyr113, Tyr133, Tyr137, Tyr138	100%
Domínio C-terminal	Thr82-Arg175	Thr84-Ala179	93%

*Homologia representada em similaridade.

O segmento N-terminal de actinoporinas possui uma α -hélice anfipática formada pelos 30 primeiros resíduos de aminoácidos (Figura 6). É reconhecido como a única região destas moléculas envolvida em modificações conformacionais sem alterar o enovelamento em β -sanduíche desse grupo de toxinas (Mancheño *et al.*, 2003; Kristan *et al.*, 2004; Pazos *et al.*, 2006; Álvarez *et al.*, 2009), o que denota a importância de sua flexibilidade como um pré-requisito para a inserção e formação de poros por actinoporinas (Kristan *et al.*, 2004). Torna-se, portanto, essencial para a atividade hemolítica destas proteínas, embora sua deleção não afete a capacidade de actinoporinas em interagir com membrana (Anderluh *et al.*, 1997; Huerta *et al.*, 2001). Adicionalmente, ensaios de atividade hemolítica empregando apenas fragmentos correspondentes à região N-terminal, demonstraram que mesmo isolada do arcabouço protéico, essa região mantém sua atividade, ainda que em concentrações superiores (na ordem de μ M) àquelas observadas para a toxina completa (na ordem de nM) (Casallanovo *et al.*, 2006; Drechsler *et al.*, 2006; Cilli *et al.*, 2007).

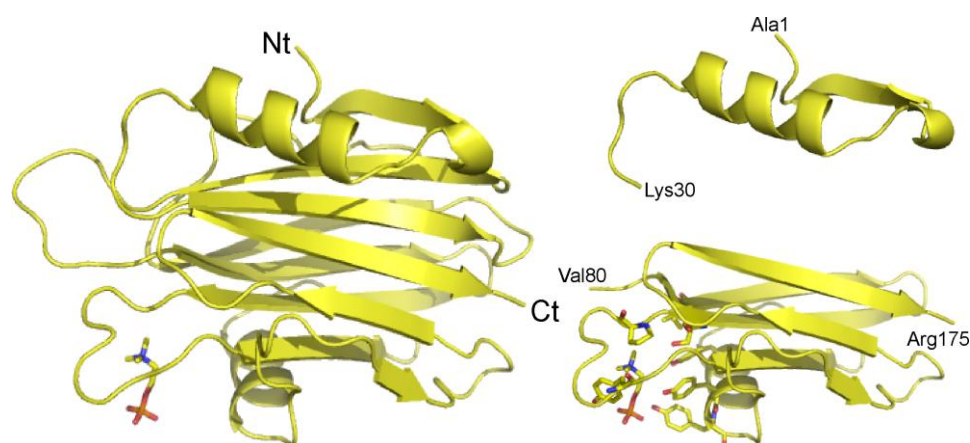


Figura 6: Representação das regiões estruturais importantes e altamente conservadas nas actinoporinas. Estrutura Cristalográfica da StnII complexada com a fosforilcolina (PDB ID 1O72). Em destaque: a região N-terminal (resíduos 1-30) e a região C-terminal (resíduos 80-175) com os aminoácidos do SLF (Ser52, Val85, Ser103, Pro105, Tyr111, Tyr131, Tyr135, Tyr136) voltados para a fosforilcolina. Adaptado de Mancheño *et al.*, 2003.

A região C-terminal de actinoporinas, além de ser rica em aminoácidos hidrofóbicos, apresenta diferentes segmentos que podem ancorar-se a membranas celulares. Entre esses, dois apresentam especial importância: a α -hélice C-terminal (localizada entre as fitas β_7 e β_8) e a região rica em resíduos de triptofano (localizada na alça entre as fitas β_6 e β_7 e início da fita β_7) (Tabela 2). Adicionalmente destaca-se que, embora estas duas regiões apresentem uma grande proximidade, apenas resíduos localizados na α -hélice C-terminal são considerados como membros do sítio de ligação à fosfocolina (SLF) (Mancheño *et al.*, 2003).

O SLF foi revelado através de experimentos de cristalografia de raio-X, onde foi possível obter o cristal da StnII complexada com um componente de fosfolípídeos de membrana, a fosforilcolina (Figura 6, Mancheño *et al.*, 2003). Isto representou uma etapa importante no estudo de actinoporinas, oferecendo uma referência estrutural para o reconhecimento proteína-lipídio (Mancheño *et al.*, 2003). Constitui-se de uma cavidade parcialmente hidrofílica (pela participação das hidroxilas fenólicas dos resíduos Tyr111, Tyr135 e Tyr136 e da cadeia lateral de Ser52 e Ser103) e hidrofóbica (pelas cadeias laterais de Val85 e Pro105, e dos anéis aromáticos de Tyr111 e Tyr135). Adicionalmente, outras regiões da porção C-terminal, como os resíduos de Trp110, Trp114, Tyr 140, Tyr153 e as alças entre as fitas β_5 e β_6 , β_8 e

β 9, β 7 e α -hélice C-terminal, além de resíduos apolares adicionais são relatadas como envolvidas na interação com a membrana e, desta forma, devem contribuir para o processo de formação do poro (Mancheño *et al.*, 2003; Kristan *et al.*, 2004).

Através da combinação de técnicas de microscopia eletrônica (ME), cristalografia de raios-X e cálculos de *docking* foi obtido um modelo de um poro formado por StnII em monocamadas fosfolipídicas (Figura 7, Mancheño *et al.*, 2003), indicando que o poro formado por actinoporinas é simétrico, provavelmente envolvendo quatro monômeros. A estrutura em β -sanduíche parece permanecer intacta, após a oligomerização, embora o segmento N-terminal e a alça entre a fita β 7 e a α -hélice C-terminal pareçam sofrer significativas mudanças conformacionais após a oligomerização. Adicionalmente, o modelo obtido sugere um deslocamento do segmento N-terminal da estrutura globular da proteína em direção à membrana, envolvendo a região dos resíduos de Ser28 e Arg29 da StnII (Mancheño *et al.*, 2003). Este perfil estrutural constitui uma proposta geral para o mecanismo de ação da família de actinoporinas (Álvarez *et al.*, 2009; Kristan *et al.*, 2009).

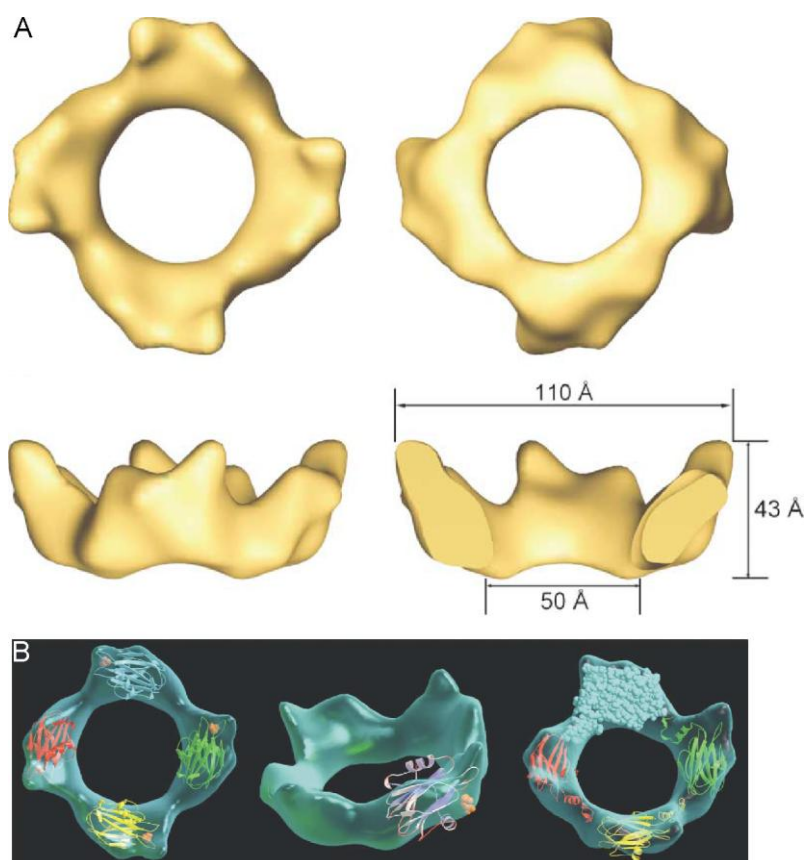


Figura 7: A) Poro oligomérico formado pela StnII em monocamadas de fosfolípidos obtida por microscopia eletrônica e B) o encaixe da estrutura cristalográfica da StnII sobre os mapas de densidade eletrônica. Adaptado de Mancheño *et al.*, 2003.

1.3.2 Mecanismo de ação de actinoporinas

O mecanismo de ação de actinoporinas é único entre as TFPs e pode ser descrito da seguinte maneira: 1) inicia-se pelo reconhecimento do alvo biológico no SLF; 2) desencadeia a exposição de resíduos na região rica em triptofanos e do restante dos resíduos apolares presentes na região C-terminal; 3) translocamento do segmento N-terminal da estrutura globular da proteína em direção à superfície da membrana; 4) quatro monômeros concentram-se nessa superfície, adquirindo um maior enovelamento em α -hélice no segmento N-terminal; 5) a inserção conjunta das extremidades N-terminais desses monômeros origina a parede do poro, do ponto de vista protéico (Hong *et al.*, 2002; Mancheño *et al.*, 2003; Kristan *et al.*, 2004). Adicionalmente, a partir dos experimentos de microscopia eletrônica e mutagênese sítio-dirigida supra-mencionados foram estabelecidos alguns pré-requisitos para esse mecanismo de ação (Mancheño *et al.*, 2003; Kristan *et al.*, 2004), dentre os quais destacam-se a flexibilidade do segmento N-terminal, a manutenção do enovelamento em β -sanduíche, a importância da região C-terminal para na atividade da proteína, e também da sua flexibilidade para permitir uma adaptação eficiente na superfície da membrana.

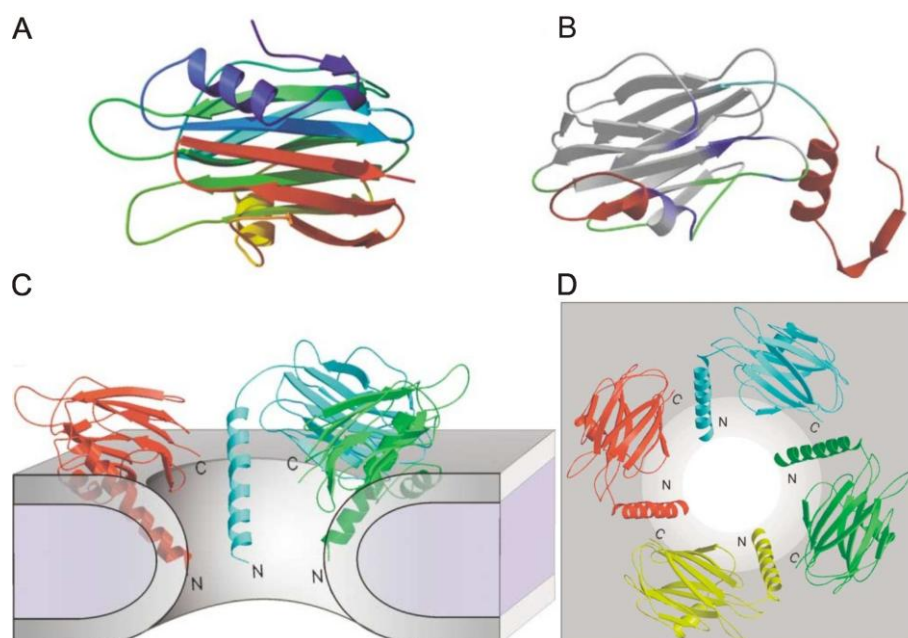


Figura 8: Modelo do mecanismo de ação de actinoporinas. A) StnII em solução, seguida por sua forma B) justaposta à superfície de membranas. Esta interação permite o deslocamento da região N-terminal, dando origem ao poro apresentado em C) de forma frontal, com o monômero amarelo omitido, e em D) de cima do poro. Adaptado de Mancheño *et al.*, 2003.

Um dos maiores impecilhos na caracterização do mecanismo de ação de actinoporinas está na dificuldade em visualizar diretamente o poro oligomérico formado, principalmente em vista da instabilidade do mesmo ao ser isolado (Kristan *et al.*, 2004). Experimentos (e.g. ME) sugerem que o poro é composto por quatro monômeros, mas o diâmetro deste poro (1-5 nm) parece ser grande demais para ser formado unicamente por quatro extremidades N-terminais de actinoporinas (Mancheño *et al.*, 2003; Kristan *et al.*, 2004). Dessa maneira, sugere-se que a formação do poro ocorra associada à perturbação dos lipídeos de membrana. Assim, a interação da toxina com a membrana promoveria o deslocamento dos lipídeos que, por sua vez, leva à formação de um poro do tipo toroidal (Figura 9) (Kristan *et al.*, 2004; Álvarez *et al.*, 2009).

O poro do tipo toroidal é formado por outros peptídeos tóxicos, como por exemplo, a melitina, peptídeo que apresenta homologia estrutural com a região N-terminal das actinoporinas (Mancheño *et al.*, 2003; Kristan *et al.*, 2004; Álvarez *et al.*, 2009). A melitina é uma toxina de 26 resíduos de aminoácidos que está presente no veneno de *Apis mellifera*, a qual foi previamente estudada por nosso grupo sob diferentes condições físico-químicas (Terra *et al.*, 2007).

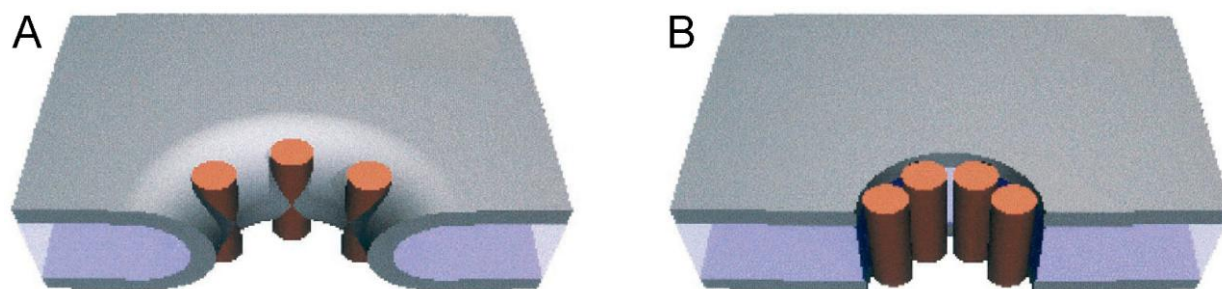


Figura 9: Modelos de formação de poro para peptídeos com capacidade de enovelamento em α -hélice anfipática. A) Poro do tipo toroidal - peptídeos estão sempre associados com as cabeças lipídicas e o formato do poro se parecem com o de um pneu (e.g. melitina) B) Poro do tipo barril de estacas - peptídeos estão agregados de maneira que não há participação lipídica (e.g. alameticina). Adaptado de Yang *et al.*, 2001.

1.3.3 Influência de variáveis físico-químicas sobre a ação de actinoporinas

Uma das estratégias empregadas na caracterização estrutural do mecanismo de ação de actinoporinas envolve o estudo dos possíveis intermediários funcionais entre a proteína solúvel e sua forma organizada em poro membranar. Neste sentido, diversas análises espectroscópicas vêm sendo descritas em diferentes condições físico-químicas, constituindo soluções capazes de modular a atividade hemolítica de actinoporinas como StnI, StnII e EqtxII (Álvarez *et al.*, 1998, Álvarez *et al.*, 2001, Martínez *et al.*, 2001; Mancheño *et al.*, 2001, Ulrich *et al.*, 2004). Os principais resultados obtidos por estes estudos incluem:

- Análises de espectroscopia de fluorescência (EF) e dicroísmo circular (DC) mostram que pré-tratamentos em soluções concentradas de NaCl ($\approx 0,8$ M) levam a uma maior exposição dos resíduos de Lys da StnI ao solvente e a uma consequente perda de conteúdo de α -hélice, aumentando a atividade hemolítica da StnI (Álvarez *et al.*, 1998), embora não hajam dados sobre este efeito para a StnII e EqtxII;
- Análises de EF em pré-tratamentos envolvendo soluções ácidas acarretam em uma redução na exposição dos resíduos de Trp ao solvente. Em contrapartida, uma habilidade aumentada de interação com sondas hidrofóbicas foi observada. Essa alteração é reversível em condição fisiológica, e não modifica a atividade hemolítica da StnI e StnII (Álvarez *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2001; Mancheño *et al.*, 2001);
- Análises de DC em pré-tratamentos envolvendo soluções alcalinas (pH acima de 11) acarretam em mudanças no conteúdo de estrutura secundária e terciária que não são totalmente reversíveis em condição fisiológica, reduzindo expressivamente a atividade hemolítica de StnI e StnII (Álvarez *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2001);
- Análises de EF e DC em pré-tratamentos envolvendo soluções concentradas de ureia (5 a 8 M) acarretam em uma maior exposição dos aminoácidos de Trp ao solvente, mas sem alterações estruturais significativas no conteúdo de estrutura secundária da proteína. Embora não tenha sido observada perda estrutural significativa, essa solução levou à perda da atividade hemolítica da StnI e StnII (Álvarez *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2001);

- Em análises de DC em pH ácido (pH 3) a 25°C, a EqtxII mantém sua conformação nativa e sua atividade hemolítica em uma ampla faixa de concentrações de NaCl. Por outro lado, na presença de solução salina (NaCl 25 – 200 mM), ácida (pH = 3) e em altas temperaturas ($\approx 65^\circ\text{C}$) a EqtxII aumenta seu conteúdo de α -hélice mesmo assumindo um estado parcialmente desenovelado capaz de oligomerizar-se. Contudo, este estado agregado é inativo, sugerindo que a agregação seja útil somente após a interação dos monômeros com a membrana (Ulrih *et al.*, 2004).

Embora as informações reveladas por estas técnicas tenham indicado a capacidade das condições da solução em promover alterações na estrutura protéica, a ausência de informações em nível atômico dificulta a correlação destes fenômenos conformacionais a aspectos da estrutura e função protéicas de actinoporinas. Adicionalmente, estudos realizados em ambiente ácido (tabela 3), tanto para a StnII quanto para a EqtxII, sugerem que um estado parcialmente desenovelado pode ser observado nessa condição (Malavasic *et al.*, 1996; Poklar *et al.*, 1997; Mancheño *et al.*, 2001; Ulrih *et al.*, 2004). Dessa maneira, considera-se que o ambiente ácido pode induzir estados parcialmente desenovelados que mimetizam as modificações induzidas pelo ambiente ácido próximo à superfície de membranas carregadas negativamente (van der Goot *et al.*, 1991; Bychkova *et al.*, 1996; Poklar *et al.*, 1997; Mancheño *et al.*, 2001; Ulrih *et al.*, 2004).

Tabela 3: Comparação das modificações causadas por diferentes soluções na estrutura das actinoporinas StnII e EqtxII.

	Temperatura (c°)	pH	NaCl (M)	Ureia (M)	Espectroscopia de fluorescência ^a	Intensidade do sinal da sonda ^b	DC-far ^c	DC-near ^d	Atividade hemolítica	Referência
StnII	25	7,0	0-0,5	-	Não altera	Não altera	Não Altera	Não altera	-	Manchenõ <i>et al.</i> , 2001
	25	2,0	-	-	Alteração reversível	aumenta	Não Altera	Não altera	Não altera	Álvarez <i>et al.</i> , 2001
	85	2,0	0,1-0,5	-	Exposição de Trp	aumenta	Perda estrutural	Perda estrutural	-	Manchenõ <i>et al.</i> , 2001
	25	-	-	8,0	Exposição de Trp	-	Pequenas alterações	Perda estrutural	Perda	Martínez <i>et al.</i> , 2001
EqtxII	20	2,0	-	-	Exposição de Trp	aumenta	-	-	-	Malavasic <i>et al.</i> , 1996
	20	-	-	9,0	Exposição de Trp	-	-	-	-	Malavasic <i>et al.</i> , 1996
	~70	2,0-6,0	-	-	-	aumenta	Pequenas alterações	Perda estrutural	-	Poklar <i>et al.</i> , 1997

^aA intensidade do sinal fluorescente produzido pelo resíduo de triptofano (Trp) diminui quando sua exposição ao solvente aumenta.

^bA interação da sonda fluorescente anilino-naftaleno sulfonato (ANS) com sítios hidrofóbicos expostos na superfície da proteína resulta em um aumento da intensidade fluorescente produzida.

^cAnálise de Dicroísmo Circular (DC) na região de “far” (190-250 nm) indica modificações no conteúdo de estrutura secundária da proteína.

^dAnálise de DC na região de “near” (250-350 nm) indica modificações no conteúdo de estrutura terciária da proteína através do monitoramento da alteração das cadeias laterais dos resíduos aromáticos.

1.4 Caracterização de biomoléculas por Dinâmica Molecular

O uso de simulações de Dinâmica Molecular (DM) para descrever sistemas protéicos iniciou-se há aproximadamente 30 anos (van Gunsteren & Berendsen, 1990), estando hoje amplamente difundido como uma ferramenta importante para investigar a estrutura e dinâmica de diferentes tipos de biomoléculas (van Gunsteren *et al.*, 2006). Atualmente é possível realizar desde estudos de ligação de compostos às suas proteínas-alvo até a desnaturação, re-enovelamento de proteínas, formação de membranas ou micelas e o transporte através de membranas (van Gunsteren *et al.*, 2006). Apresenta-se como técnica complementar a metodologias amplamente estabelecidas, como a cristalografia de raios-X e a ressonância magnética nuclear ao permitir observar o comportamento conformacional de compostos, em nível atômico, como função do tempo e do ambiente molecular. Adicionalmente, essa característica dos cálculos de DM representa sua principal vantagem, uma vez que as informações obtidas de estudos cristalográficos estão relacionadas a uma estrutura estática em meio sólido e os estudos de RMN a uma representação média das conformações em solução. Além disso, mesmo quando os dados experimentais estão disponíveis estes podem ser insuficientes, de baixa precisão ou ainda influenciados pela condição de análise (van Gunsteren *et al.*, 2006; Andrec *et al.*, 2007).

Neste contexto, as simulações de DM para sistemas moleculares realizadas em temperaturas acima de 0 K (-273°C) requerem a geração de um grupo estatisticamente representativo de suas conformações, conhecido com “*ensemble*” (conformações que populam uma faixa de diferentes níveis de energia, onde o tamanho dessa faixa será determinado, principalmente, pela temperatura do meio). A temperatura que é em geral utilizada em DM, para avaliação dos processos biomoleculares, fica entre a temperatura ambiente e fisiológica. Além disso, como as condições do meio (*e.g.* diferentes tipos de solvente, pH e concentração salina) também podem ser mimetizadas torna-se possível acompanhar as propriedades do sistema molecular, de acordo com condições definidas, afim de verificar possíveis alterações na estrutura tridimensional de partida (*e.g.* estruturas obtidas por cristalografia, RMN e modelagem comparativa).

1.4.1 Equação de movimento

A integração da equação de movimento de Newton $d^2r_i(t)/dt^2 = F_i / m_i$, sendo $d^2r_i(t)/dt^2$ a aceleração, m_i a massa e F_i a força sobre um determinado átomo i , é a principal característica dos cálculos de DM que, quando realizada sucessivamente e sobre todos os átomos do sistema, gera uma trajetória de movimento das moléculas em estudo, ou seja, uma seqüência de diferentes posições dos átomos em função do tempo (Leach, 2001). Esta integração é realizada de forma que uma força F_i acarreta uma aceleração sobre um determinado átomo i e, em conseqüência, causa uma mudança de sua posição num intervalo de tempo Δt relativo à aceleração (estes intervalos de tempo Δt são denominados *tempo de integração*) (Leach, 2001). A escolha do tempo de integração pode variar de 0,5 a 10 fs e dependerá do sistema molecular em estudo (e.g. presença de grandes mudanças de energia, avaliação de processos extremamente rápidos, sistemas totalmente livres, presença de restrições de ligações, presença de restrições de ligação e ângulo) (Leach, 2001; Verli, métodos de mecânica molecular, 2010).

No entanto, ao considerar somente a equação de movimento de Newton, não é possível determinar a intensidade e a direção da força F_i sobre os átomos do sistema, nem sua relação com as características químicas de cada molécula em estudo (Leach, 2001). Dessa forma, tais parâmetros são calculados em função de mudanças na energia potencial entre a posição atual e a posição seguinte (a que representará o próximo passo da simulação) sobre cada átomo individualmente. Esta superfície de energia potencial representa a energia de cada molécula, sendo descrita pelo denominado *Campo de Força*.

1.4.2 Campo de força

O campo de força pode ser definido como um conjunto de funções (ilustradas na figura 10 e que são compartilhadas pelos diferentes campos de força) e parametrizações (definições de coordenadas para ligações, ângulos, diedros e cargas que são específicas de cada campo de força) usadas em cálculos de mecânica molecular (de Sant'Anna, 2002; van Gunsteren *et al.*, 2006). O campo de força GROMOS (Figura 10), por exemplo, faz parte dos pacotes de programas GROMOS e GROMACS. Este campo de força apresenta ainda diferentes parametrizações (e.g. GROMOS96 43b1, 43a1, 43a2, 53a6), relacionadas a

otimização de parâmetros específicos para determinadas moléculas (alcanos, proteínas, lipídeos) ou com o grau de complexidade do ambiente mimetizado no sistema em estudo (fase gasosa, fase líquida). A complexidade do sistema também pode ser manipulada pela utilização de outros campos de força (e.g. OPLS, MARTINI), os quais consideraram diferentes níveis de aproximação atômicos no modelo molecular (“*all-atom*”, “*united-atom*”, “*coarse-grained*”). Todos estes conjuntos de parametrizações estão disponíveis no pacote GROMACS possibilitando, assim, um certo grau de ajuste no custo computacional necessário para a avaliação das propriedades de interesse.

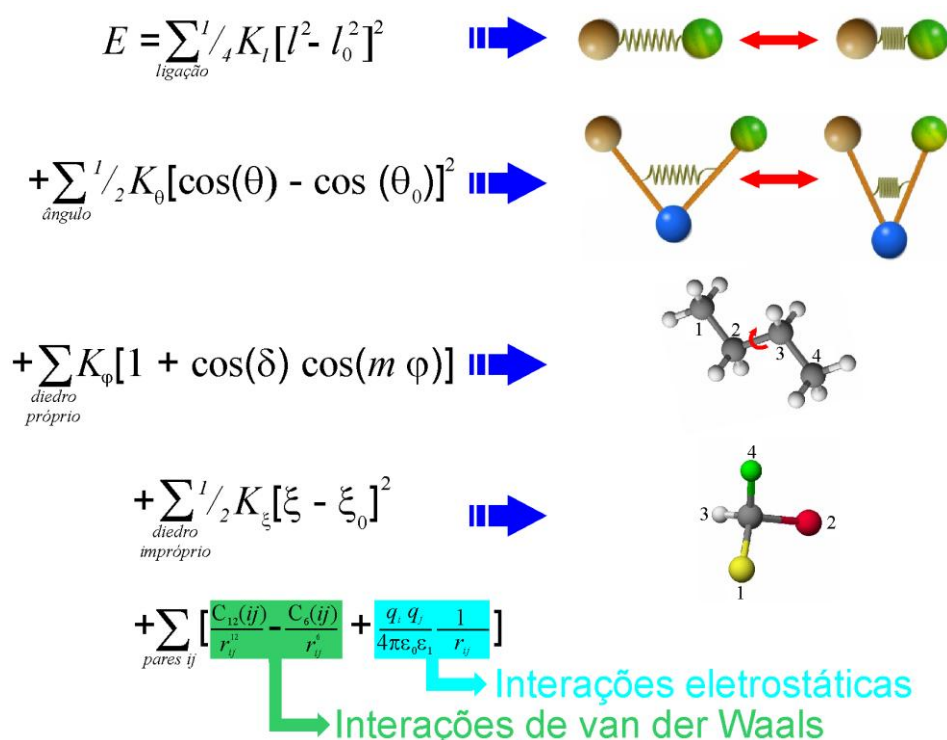


Figura 10: Funções de energia que compõem o campo de força GROMOS. De cima para baixo estão representadas as equações que descrevem o estiramento de ligações químicas, ângulos de ligação, diedros próprios, diedros impróprios e interações intermoleculares (interações eletrostáticas/Coulômbicas e interações de van der Waals, também identificadas como potencial de Lennard-Jones). Adaptado de Verli, Tese de doutorado, 2005 e van Gunsteren *et al.*, 2006.

As funções de energia que compõem o GROMOS (Figura 10) definem as energias de estiramento de ligação e de distorção de ângulo de ligação (tanto de valência quanto de diedro) de uma molécula quando comparadas com a sua

conformação não tensionada (aquela caracterizada por valores-padrão de comprimentos e de ângulos de ligação). Desta maneira, o campo de força, juntamente com termos adicionais (interação entre átomos não covalentemente ligados, efeitos eletrostáticos e de outros efeitos estruturais como por exemplo a polarizabilidade), expressam o somatório das funções de energia potencial de cada átomo e possibilitam calcular a energia do sistema de acordo com as posições dos núcleos dos átomos (Leach, 2001; van Gunsteren *et al.*, 2006).

1.4.3 Transferabilidade

A transferência de parâmetros é uma das estratégias comumente utilizadas para possibilitar a aplicação do campo de força a enorme variedade de compostos químicos existentes. Dessa maneira, é possível utilizar parâmetros previamente validados na obtenção de compostos semelhantes e estruturalmente relacionados (*e.g.* átomos, grupos de átomos em diferentes moléculas). Essa estratégia possibilita reduzir o esforço necessário a implantação de novas definições de parâmetros o que facilita a amostragem conformacional pela redução do custo computacional (van Gunsteren *et al.*, 2006).

1.4.4 Condições periódicas de contorno

Uma estratégia comumente utilizada para minimizar os efeitos de superfície em um sistema finito é realizada pela utilização de condições periódicas de contorno. Os átomos do sistema a ser simulado são colocados dentro de uma caixa triclinica em condições periódicas, tratada como se estivesse circundada por imagens idênticas, que estão transladadas em uma distância semelhante ao seu raio (R_{caixa}) nas direções X, Y e Z. Quando estratégias como “*infinite lattice sum*” são utilizadas, as interações eletrostáticas entre um átomo na caixa central e todas as suas imagens periódicas são calculadas. Entretanto, em muitos casos isso não é desejável, e somente a interação com os vizinhos mais próximos são realizadas. Dessa maneira, as interações desnecessárias podem ser evitadas pela aplicação de um raio de corte (R_{corte}), que considera interações longas na faixa de 6 - 9 Å, ao redor desse átomo central. As condições periódicas de contorno não afetam somente os cálculos das forças, mas também as posições dos átomos. Assim, uma prática comumente utilizada é manter os átomos juntos na caixa central. Dessa

maneira, quando um átomo deixa a caixa central por um lado, ele retorna com velocidade idêntica no lado oposto. É importante salientar que a periodicidade é um artefato computacional, dessa maneira seu efeito precisa ser minimizado de forma que os átomos do sistema não interajam com suas imagens periódicas. Em vista disso, o comprimento do raio da caixa deve ser duas vezes maior que o raio de corte ($R_{caixa} > 2 R_{corte}$). A observação de possíveis efeitos de distorção nas condições periódicas geralmente pode ser resolvida pela utilização de caixas com diferentes formatos e tamanhos (van Gunsteren & Berendsen, 1990).

1.4.5 Controle da temperatura e pressão

O controle de temperatura das simulações de DM geralmente é efetuado através de um processo conhecido termostato de Berendsen (Berendsen *et al.*, 1984), onde o sistema fica acoplado a um banho térmico com temperatura fixa, a qual é definida na preparação do sistema. Durante a simulação as velocidades são re-definidas a cada passo de integração, a fim de ajustar a energia cinética do sistema até a temperatura desejada (Berendsen *et al.*, 1984; Namba *et al.*, 2008). Além do termostato de Berendsen outras estratégias, como o termostato de Nosé-Hoover (Nosé, 1984) e Nosé-Poincaré (Hoover, 1985), também podem ser utilizadas. Da mesma maneira, um Borostato é utilizado para o controle da pressão. Entretanto, nesse processo as variáveis de temperatura são substituídas pela pressão, e as velocidades dos átomos pelas coordenadas atômicas. Entre os borostatos mais utilizados podem ser destacados o de Berendsen (Berendsen *et al.*, 1984) e o de Parrinello-Rahaman (Parrinello & Rahaman, 1981).

1.4.6 Sistemas solvatados

As simulações de dinâmica molecular podem ser realizadas de acordo com dois diferentes modelos de solvatação: o modelo de solvatação implícita e o modelo de solvatação explícita. No modelo de solvatação implícita as moléculas do solvente não estão explicitamente consideradas (fisicamente presentes), este tipo de modelo é geralmente aplicado a grandes sistemas moleculares já que é possível reduzir o custo computacional e ampliar a amostragem do sistema avaliado. Entretanto, em alguns casos a presença física das moléculas do solvente deve ser considerada

para descrever o fenômeno biológico de interesse. Nesses casos, o modelo de solvatação explícita é utilizado. O modelo de solvatação explícita inclui centenas ou milhares de moléculas de solvente no sistema como um componente adicional (Namba *et al.*, 2008). A consideração das moléculas do solvente ou da solução como um componente adicional possibilita a avaliar seu comportamento no decorrer da trajetória.

Como a água é um dos solventes mais importantes para o estudo de sistemas biológicos vários potenciais foram desenvolvidos para descrever suas moléculas explicitamente. Entre os modelos de água mais utilizados podem ser destacados os da família “*transferable intermolecular potentials*” (e.g. TIP3P, TIP4P e TIP5P) e os de carga pontual, SPC e SPC/E (Jorgensen *et al.*, 1983; Berendsen *et al.*, 1987).

1.4.7 Restrição dos movimentos moleculares

Os sistemas moleculares apresentam movimentos que ocorrem em diferentes escalas de tempo, considerando tanto as forças intermoleculares como as intramoleculares. Normalmente as interações intramoleculares são de ordem de magnitude superior as interações intermoleculares e assim os movimentos vibracionais muito mais rápidos que os translacionais e rotacionais (Hess *et al.*, 1997; Namba *et al.*, 2008). Essa diferença pode levar a um aumento no passo de integração, o qual exige um maior tempo de cálculo computacional. Uma das estratégias geralmente empregadas para não aumentar o tempo de cálculo é realizada por “*restraints*” dos movimentos mais rápidos (exclusão dos cálculos de interação), o que leva a um congelamento nos graus de liberdade correspondentes a esses movimentos de maior frequência (Namba *et al.*, 2008). A aplicação de “*constraints*” (uma estratégia semelhante à anterior, embora utilizada com o objetivo de estabilizar o comprimento de ligações químicas), quando aplicada em ligações peptídicas possibilitou aumentar consideravelmente a velocidade de cálculo sem que o sistema tivesse seu comportamento físico alterado (van Gunsteren & Berendsen, 1977; Hess *et al.*, 1997). Nesse contexto, várias abordagens podem ser utilizadas para a realização de restrição dos movimentos moleculares (van der Spoel *et al.*, 2002). Sendo que os algoritmos mais utilizados de “*constraints*” são o SHAKE (Ryckaert *et al.*, 1977), o RATTLE (Andersen, 1983) e o LINCS (Hess *et al.*, 1997).

1.4.8 Apresentação dos resultados

Os dados obtidos de uma simulação de DM, usualmente são apresentados através da média de propriedades ao longo da trajetória. Esta, por sua vez, precisa ser longa o suficiente para produzir uma amostragem representativa do estado do sistema molecular em estudo (van Gunsteren & Berendsen, 1990; van Gunsteren *et al.*, 2006). As propriedades deste sistema molecular são definidas, portanto, como médias desta amostragem no espaço conformacional simulado. De modo geral, a validação do modelo teórico produzido reside na concordância de seus resultados com os dados de propriedades determinadas por diferentes técnicas experimentais (van Gunsteren & Berendsen, 1990; van Gunsteren *et al.*, 2006). Adicionalmente, como qualquer método (bancada ou computacional), a validade dos resultados obtidos com o modelo será julgada a partir da constatação de que ele adequadamente representa o fenômeno de interesse (van Gunsteren *et al.*, 2006).

Atualmente existem vários campos de força (e.g. OPLS, Jorgensen *et al.*, 1988, GROMOS96, van Gunsteren *et al.*, 1996, CHARMM, MacKerell *et al.*, 1998, MARTINI, Monticelli *et al.*, 2004 e AMBER, Case *et al.*, 2005), sendo a maioria deles validados no estudo de polipetídeos. Entretanto, parâmetros específicos para outras classes de biomoléculas (carboidratos, lipídios, ácidos nucleicos e compostos sintéticos) são relativamente escassos. No entanto, em decorrência de características específicas, cada um deles pode ser comportar melhor na caracterização de diferentes sistemas moleculares (van Gunsteren & Berendsen, 1990; Martín-Pastor *et al.*, 1997; Kukol, 2009; Balali-Mood *et al.*, 2009).

1.4.9 Vantagens da utilização do GROMACS

Entre as principais vantagens da utilização do pacote GROMACS destacam-se: a) em decorrência de sua velocidade, a capacidade de permitir uma ampla busca do espaço conformacional do sistema molecular em estudo em recursos computacionais limitados, b) flexibilidade quanto a sua aplicação a diferentes tipos de biomoléculas, c) a disponibilidade de diferentes campos de força, e d) ser um pacote de programas gratuito. Nesse contexto, o Grupo de Bioinformática Estrutural da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) vem investindo na aplicação e aprimoramento do campo de força GROMOS96, destacadamente a versão 43a1, afim de contribuir no entendimento da estrutura e função dos mais

variados sistemas de biomoléculas, contribuindo assim com o aprimoramento dessa metodologia (Verli & Guimarães, 2004; Becker *et al.*, 2005; Verli & Guimarães, 2005; Pol-Fachin & Verli, 2008; Giesel *et al.*, 2009, Pol-fachin *et al.*, 2009; Fernandez *et al.*, 2010).

2. Objetivos

Tendo em vista a carência de informações estruturais e dinâmicas acerca das actinoporinas, a presente dissertação visa avaliar as razões moleculares para a influência de diferentes soluções sobre atividade biológica das duas actinoporinas mais estudadas, StnII e EqtxII, empregando para tal simulações de dinâmica molecular. Adicionalmente, objetiva-se a caracterização dos eventos moleculares responsáveis pela perda da atividade hemolítica da StnII em soluções contendo alta concentração de ureia.

Assim, as seguintes metas foram estabelecidas:

- Análise do comportamento conformacional da StnII e da EqtxII em pH neutro (condição próxima ao pH fisiológico humano);
- Identificação da influência da variação do pH neutro para ácido nas propriedades estruturais e conformacionais dessas toxinas;
- Análise, em nível atômico, das razões moleculares para a perda da atividade hemolítica da StnII em soluções contendo alta concentração de ureia, concomitantemente à ausência de alterações significativas em seu conteúdo de estrutura secundária.

3. Metodologia

3.1 Programas utilizados

Os programas utilizados no presente trabalho incluem:

- Ferramentas de visualização de moléculas: VMD (Humphrey *et al.*, 1996), MolMol (Koradi *et al.*, 1996) e Molden (Schaftenaar, 1997);
- Programa para simulações de dinâmica molecular: GROMACS (Berendsen *et al.*, 1995; van der Spoel *et al.*, 2005);
- Programa para manipulação das sequências polipeptídicas: Swiss-PDB Viewer (Guex & Peitsch, 1997), Pymol (DeLano Scientific, 2002)
- Programas para análise de estrutura secundária: DSSP (Kabsch & Sander, 1983) e PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993).
- Programas para a construção dos gráficos de elipticidade em 222nm (Hirst & Brooks, 1994) e tRMSF (Verli & Guimarães, 2005): SigmaPlot (Systat Software Inc., 2009);

3.2 Procedimentos gerais

As estruturas cristalográficas da StnII e da EqtxII foram obtidas no Protein Data Bank, banco de dados de estruturas de macromoléculas biológicas, sob códigos 1GWY (Mancheño *et al.*, 2003) e 1IAZ (Athanasiadis *et al.*, 2001), respectivamente. Os monômeros de ambas as toxinas foram utilizados para o estudo.

O protocolo geral de simulação de dinâmica molecular foi baseado nos procedimentos previamente descritos por de Groot e Grubmüller (2001), o qual foi posteriormente empregado pelo Grupo de Bioinformática Estrutural da UFRGS em diversos trabalhos já publicados (Verli & Guimarães, 2005; Terra *et al.*, 2007; Verli *et al.*, 2007; Giesel *et al.*, 2008, Pol-Fachin *et al.*, 2009). Os sistemas construídos são compostos por proteínas, solvente e íons, nos quais empregou-se o pacote de simulação GROMACS 3.3.1 (Berendsen *et al.*, 1995; van der Spoel *et al.*, 2005) e o campo de força GROMOS 96 43a1 (van Gunsteren *et al.*, 1996; Scott *et al.*, 1999).

3.3 Simulação de DM

3.3.1 Protocolo de simulação

Todas as simulações foram realizadas à temperatura de 310 K e tiveram duração de aproximadamente 0,1 μ s. Cada proteína foi solvatada numa caixa triclnica utilizando condições periódicas de contorno e o modelo de água SPC (Berendsen *et al.*, 1981; Berendsen *et al.*, 1987), com distância mínima de 0,9 nm entre cada um dos lados da caixa e a superfície da proteína (adequada para proteínas globulares). Contra-íons (Cl^- ou Na^+) foram adicionados de forma a neutralizar as cargas dos sistemas. O estado de ionização dos aminoácidos em condição fisiológica humana foi ajustado para o pH neutro (pH = 7,0). Em condições ácidas (pH 3,0), o estado de protonação foi ajustado de acordo com os valores específicos de pK_a para as cadeias laterais dos aminoácidos (Figura 13). Dessa maneira, as cadeias laterais dos resíduos de aspartato, glutamato e histidina foram protonados. Adicionalmente, a StnII foi simulada em uma solução de ureia 10,0 M (Rocco *et al.*, 2008). As simulações em soluções diferentes do pH neutro foram realizadas em condições dráticas para possibilitar uma adequada caracterização da influência do meio na escala de tempo amostrada. Cada sistema (proteína + água + íons) foi então submetido à minimização de energia por aproximadamente 10.000 passos utilizando o algoritmo *Steepest Descent*. A estrutura minimizada assim obtida foi então utilizada como ponto de partida para simulações de DM. O método de LINCS (Hess *et al.*, 1997) foi aplicado na restrição de ligações covalentes de forma a permitir um passo de integração de 2 fs, enquanto as interações eletrostáticas foram calculadas utilizando o método Particle-Mesh Ewald (PME, Darden *et al.*, 1993). A temperatura e a pressão do sistema foram mantidas constantes através do acoplamento da proteína, íons e solvente a banhos externos de temperatura e pressão, utilizando constantes de acoplamento de, respectivamente, $\tau = 0,1$ ps e $\tau = 0,5$ ps (Berendsen *et al.*, 1984). A constante dielétrica do meio foi tratada como $\epsilon = 1$.

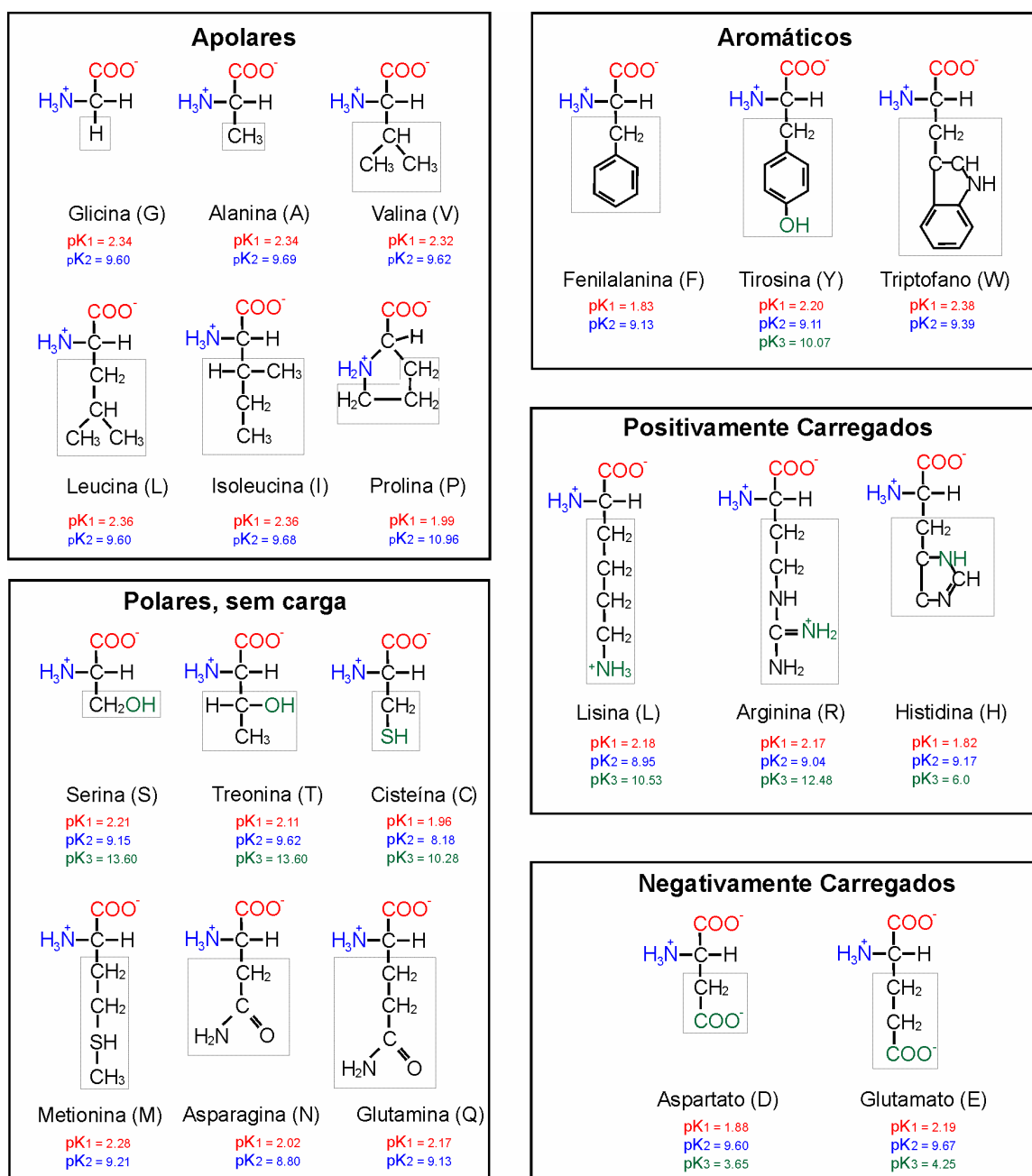


Figura 11: Estrutura dos 20 aminoácidos das proteínas corporais humanas, com os grupos amina e carboxilato em condição fisiológica (pH 7.0), de acordo com os valores de pKa desses grupos em cada aminoácido. Adaptado de Lehninger, 1992.

As simulações por DM foram divididas em duas etapas: termalização e recolhimento de dados. A *termalização* envolve o aquecimento gradativo do sistema e visa uniformizar as energias contidas na estrutura cristalográfica evitando, assim, deformações na proteína (Figura 14; Verli, 2005). Nessa etapa, o sistema é

aquecido lentamente de 50 K a 310 K, em passos de 5 ps de duração. Cada passo aumenta a temperatura em 50 K, totalizando 6 passos em 30 ps. Após a termalização do sistema, a simulação permanece na temperatura de equilíbrio (310 K) e prossegue pelo tempo estipulado para a trajetória (0,1 μ s). Essa etapa inclui uma fase inicial, que geralmente está relacionada à perda da memória do ambiente cristalográfico, e final de avaliação dos dados. Nesta última, a amostragem deve ser suficientemente ampla para evitar resultados falsos positivos e reproduzir o fenômeno biológico de interesse.

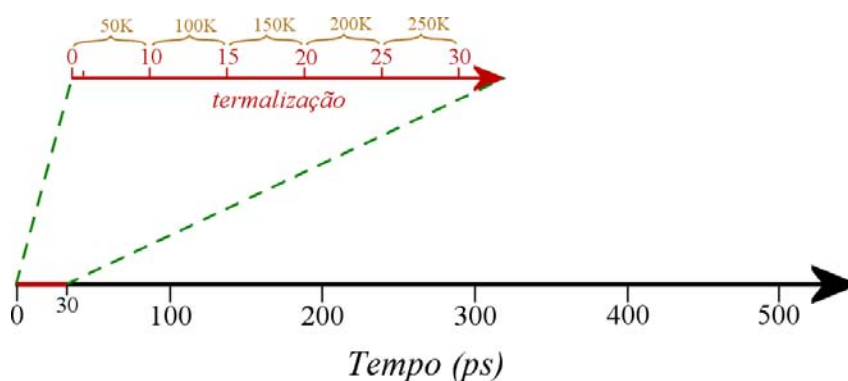


Figura 12: Esquema das etapas que compõe as simulações de DM a 310 K. De 0 ps a 30 ps, uma série de etapas, de 5 ps cada, aquece lentamente o sistema em incrementos de 50 K. Após 30 ps, o sistema está a 310 K e se mantém nesta temperatura pelo resto da simulação. Adaptado de Verli, Tese de doutorado, 2005.

3.3.2. Sistemas simulados

Baseando-se nas estruturas cristalográficas das actinoporinas StnII (1GWY) e da EqtxII (1IAZ), seis sistemas foram simulados:

- (1) EqtxII em ambiente com pH = 7,0 – a fim de avaliar seu comportamento conformacional em condições próximas ao pH fisiológico humano e para servir como referência de comportamento em relação ao pH ácido;
- (2) EqtxII em ambiente com pH = 3,0 – a fim de verificar se soluções ácidas podem afetar seu enovelamento uma vez que essa condição pode estar relacionada com diferenças existentes entre os modelos estruturais da EqtxII e com possíveis alterações em ambientes com essa característica;
- (3) StnII em ambiente com pH = 7,0 – a fim de avaliar seu comportamento conformacional nessa solução, comparar esses resultados com os dados

obtidos para a EqtxII em pH neutro e para servir como referência das demais simulações realizadas com essa proteína;

- (4) StnII em ambiente com pH = 3,0 – a fim de verificar se soluções ácidas podem afetar seu enovelamento e para comparar esses resultados com os dados obtidos para a EqtxII nessa mesma condição;
- (5) Uma nova simulação da StnII em ambiente com pH = 7,0 utilizando, como ponto de partida, a última estrutura da simulação em ambiente com pH = 3,0 – a fim de analisar o processo conformacional inverso em relação à variação do pH do meio;
- (6) StnII em solução de ureia 10,0 M – a fim de avaliar seu comportamento conformacional nessa solução já que há uma profunda perda de atividade hemolítica mesmo na ausência de alterações significativas em seu conteúdo de estrutura secundária.

3.3.3 Validação das simulações de DM

A validação dos resultados obtidos das simulações de DM foi realizada através da comparação com resultados experimentais prévios, *e.g.* estrutura cristalográfica, estrutura de RMN, dados de atividade biológica, espectroscópicos e mutagênese, assim como da observação da estabilidade dos sistemas estudados, seja pela manutenção da estrutura secundária, energia, densidade e volume.

4. Resultados

4.1 *Preâmbulo*

Os resultados obtidos serão apresentados a seguir na forma do trabalho elaborado durante a realização da presente Dissertação. Este trabalho está citado abaixo, assim como uma breve descrição.

- **Edson V. F. Fauth**, Eduardo M. Cilli, Hugo Verli: Differential Effect of Solution Conditions on the Conformation of the Actinoporins Sticholysin II and Equinatoxin II. *J. Mol. Graph. Model.*, **2010**, *em preparação*.

Este trabalho descreve o perfil conformacional das actinoporinas StnII e EqtxII em diferentes soluções utilizando simulações de DM. Além disso, as condições avaliadas apresentaram informações estruturais e conformacionais adicionais para a compreensão das razões moleculares relacionadas com a capacidade dessas toxinas de formar poro em membras.

A seguir, será apresentada a íntegra do manuscrito a ser submetido para publicação.

Differential Effect of Solution Conditions on the Conformation of the Actinoporins Sticholysin II and Equinatoxin II

Edson V. F. Fauth^a; Eduardo M. Cilli^b and Hugo Verli^{a,c*}

^aCentro de Biotecnologia - UFRGS, Porto Alegre, RS; AV Bento Gonçalves 9500, CP 15005, Porto Alegre 91500-970,RS, Brazil.

^bDepartamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química –UNESP, Araraquara, SP; Araraquara, São Paulo, SP, Brazil.

^cFaculdade de Farmácia - UFRGS, Porto Alegre, RS; AV Ipiranga 2752, Porto Alegre 90610-000,RS, Brazil.

*Corresponding author. Tel.: +55-51-3316-7770; fax: +55-51-3316-7309; E-mail address: hverli@cbiot.ufrgs.br

Abstract

Actinoporins are a family of pore-forming proteins with hemolytic activity. The structural basis for such activity appears to depend on their correct folding, mainly around specific functional regions, including a phosphocholine-binding-site, a region rich in tryptophan residues and the proteins N-terminal segment. Additionally, different solution conditions are able to influence the pore formation by actinoporins as Sticholysin II (StnII) and Equinatoxin II (EqtxII). In this context, the current work intends to characterize the influence of distinct solution conditions in the conformational behavior of these proteins, at the atomic level, through molecular dynamics (MD) simulation. The so obtained data offer structural insights into actinoporins dynamics in solution, characterizing its conformational behavior, at the atomic level, within previous experimental data on StnII and EqtxII hemolytic activities.

Keywords: Actinoporins; Pore-forming proteins; Phosphocholine binding site; Partially unfolded states; GROMACS; Molecular dynamics.

1. Introduction

Actinoporins are a family of potent pore-forming proteins produced by sea anemones (Cnidaria: Anthozoa: Actiniaria) [Anderluh & Macek, 2002; Álvarez *et al.*, 2009]. These toxins are synthesized as stable water-soluble monomers that assemble into oligomeric pore-like structures to promote lyses in target cells [Mancheño *et al.*, 2001; Mancheño *et al.*, 2003; Álvarez *et al.*, 2009]. Important examples of actinoporins include Sticholysin II (StnII) and Equinatoxin II (EqtxII), obtained from *Stichodactyla helianthus* and *Actina equine*, respectively [Lanio *et al.*, 2001; Parker & Feil, 2005; Kristan *et al.*, 2009]. These toxins have a remarkable sequence similarity (higher than 90%) and present a globular shape with a β -sandwich fold, flanked by N- and C-terminal α -helices [Huerta *et al.*, 2001; Athanasiadis *et al.*, 2001; Hinds *et al.*, 2002; Mancheño *et al.*, 2003]. Their structure and conformation have been studied by different approaches [Norton, 2009], including circular dichroism (CD) [Poklar *et al.*, 1997; Martínez *et al.*, 2001], fluorescence measurements [Malavasic *et al.*, 1996; Álvarez *et al.*, 2001], X-ray crystallography [Athanasiadis *et al.*, 2001; Mancheño *et al.*, 2003] and NMR spectroscopy [Hinds *et al.*, 2002] (Fig. S1).

Three regions of this class of proteins were observed to be functionally important for the pore-formation activity in model lipid membranes and in red blood cells, including a phosphocholine binding site (Ser52, Val85, Ser103, Pro105, Tyr111, Tyr131, Tyr135, Tyr136 in StnII and Ser54, Val87, Ser105, Pro107, Tyr113, Tyr133, Tyr137, Tyr138 in EqtxII), a region rich in tryptophan residues (Trp110, Trp114, Trp115 in StnII and Trp112, Trp116, Trp117 in EqtxII), and the proteins N-terminal segment (Ala1-Ser30 in StnII and Ser1-Ile33 in EqtxII) [Anderluh *et al.*, 1997; Hong *et al.*, 2002; Mancheño *et al.*, 2003]. It is proposed that the phosphocholine binding site is responsible for the recognition of its molecular target and to permit a stable interaction between the region rich in tryptophan residues and lipid bilayers [Hong *et al.*, 2002; Mancheño *et al.*, 2003]. Such event would be followed by an N-

terminal displacement from the protein core into the lipid bilayer as a necessary step for the formation of the functional pore [Kristan *et al.*, 2004; Casallanovo *et al.*, 2006].

The exposition of StnII and EqtxII to different solution conditions, such as preincubation in urea solution and in different pH, produce distinct effects in the hemolytic activity of these proteins, with variable degrees of conformational modifications [Malavasic *et al.*, 1996; Alvarez *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2001; Mancheño *et al.*, 2001; Ulrich *et al.*, 2004]. Additionally, previous studies reported that the main conformational differences between NMR and crystal structures of these toxins lie on the C-terminal α -helix (Gln128-Tyr136 in StnII and Gln130-Tyr138 in EqtxII) [Hinds *et al.*, 2002; Miles *et al.*, 2008; Álvarez *et al.*, 2009] present at phosphocholine binding site. As such family of proteins is considered as a potential target for biotechnological applications [Tejuca *et al.*, 2009], the current work intends to characterize the dynamics of StnII and EqtxII under distinct physical-chemical conditions as a strategy to gain insights into the structural basis for the actinoporins hemolytic activity.

2. Experimental

2.1 Nomenclature and software

The recommendations and symbols of nomenclature as proposed by IUPAC [IUPAC-IUB, 1970] were used. The MD calculations and analysis were performed using GROMACS simulation suite [van der Spoel *et al.*, 2005] and GROMOS96 43a1 force field [van Gunsteren *et al.*, 1996]. The manipulation of structures was carried out with VMD [Humphrey *et al.*, 1996], Pymol [DeLano Scientific, 2002] and Swiss PDB viewer [Guex & Peitsch, 1997]. The monitoring of secondary structure content was performed by PROCHECK [Laskowski *et al.*, 1993] and ellipticity at 222 nm [Hirst & Brooks, 1994].

2.2. Molecular dynamics simulations

The crystal structures of actinoporins StnII (PDB ID 1GWY) and EqtxII (PDB ID 1IAZ) were retrieved from Protein Data Bank and the respective monomeric forms were employed in the simulations. Each monomer was solvated in a triclinic box using periodic boundary conditions and SPC water model [Berendsen *et al.*, 1981]. Counterions were added to neutralize the systems whenever necessary. Amino acids ionization was adjusted according to solution pH. A solution of 10.0 M urea was also used for StnII simulation [Rocco *et al.*, 2008]. The employed MD protocol was based on previous studies [de Groot & Grubmüller, 2001]. The Lincs method [Hess *et al.*, 1997] was applied to constrain covalent bond lengths, allowing an integration step of 2 fs after an initial energy minimization using Steepest Descent algorithm. Electrostatic interactions were calculated with Particle Mesh Ewald method [Darden *et al.*, 1993]. Temperature and pressure were kept constant by coupling proteins, ions, and solvent to external temperature and pressure baths with coupling constants of $\tau = 0.1$ and 0.5 ps [Berendsen *et al.*, 1984], respectively. The dielectric constant was treated as $\epsilon = 1$, and the reference temperature adjusted to 310 K. The systems were slowly heated from 50 to 310 K, in steps of 5 ps, each one increasing the reference temperature by 50 K, allowing a progressive thermalization of the systems. Each simulation was then performed for 0.1 μ s, without any restraint. When necessary the conformational sampling was increased to better characterize the studied systems.

3. Results and Discussion

3.1. Simulation systems

Considering previous experimental results on actinoporins structure and conformation [Malavasic *et al.*, 1996; Poklar *et al.*, 1997; Álvarez *et al.*, 1998; Mancheño *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2001; Álvarez *et al.*, 2001, Athanasiadis *et al.*, 2001; Hinds *et al.*, 2002;

Mancheño *et al.*, 2003; Ulrich *et al.*, 2004; Miles *et al.*, 2008; Álvarez *et al.*, 2009], six systems were submitted to MD simulations: 1) EqtxII under pH = 7.0; 2) EqtxII under pH = 3.0; 3) StnII under pH = 7.0; 4) StnII under pH = 3.0; 5) StnII under pH = 7.0 starting from the last frame of the simulation at pH = 3.0; 6) StnII in 10.0 M urea solution. While systems 1-4 and 6 employed as starting geometries the respective StnII (PDB ID 1GWY) and EqtxII (PDB ID 1IAZ) crystallographic structures, system 5 was simulated using as starting geometry the last frame from system 4.

3.2. Simulation stability

As a first assessment of the overall progress of the performed simulations, the root mean square deviation (RMSD) of each system was evaluated from the respective crystallographic structure as a function of time (Fig. 1). Accordingly, the MD simulations of StnII in physiologic and acidic conditions (system 3 and 4, black and blue, respectively) were stable during up to 0.04 μ s (Fig. 1B). After this period, the deviation from starting structure increases under acid condition, which appears to be mainly related to a partial unfolding of C-terminal α -helix (Fig. 1D and Fig. S2F). On the other hand, the same secondary structure element on EqtxII appears to be less suitable for conformational modifications induced by acidic conditions (Fig. 1A, Fig. 1C and Fig. S2E), at least during the performed simulations time scale and conditions (systems 1 and 2, brown and indigo, respectively).

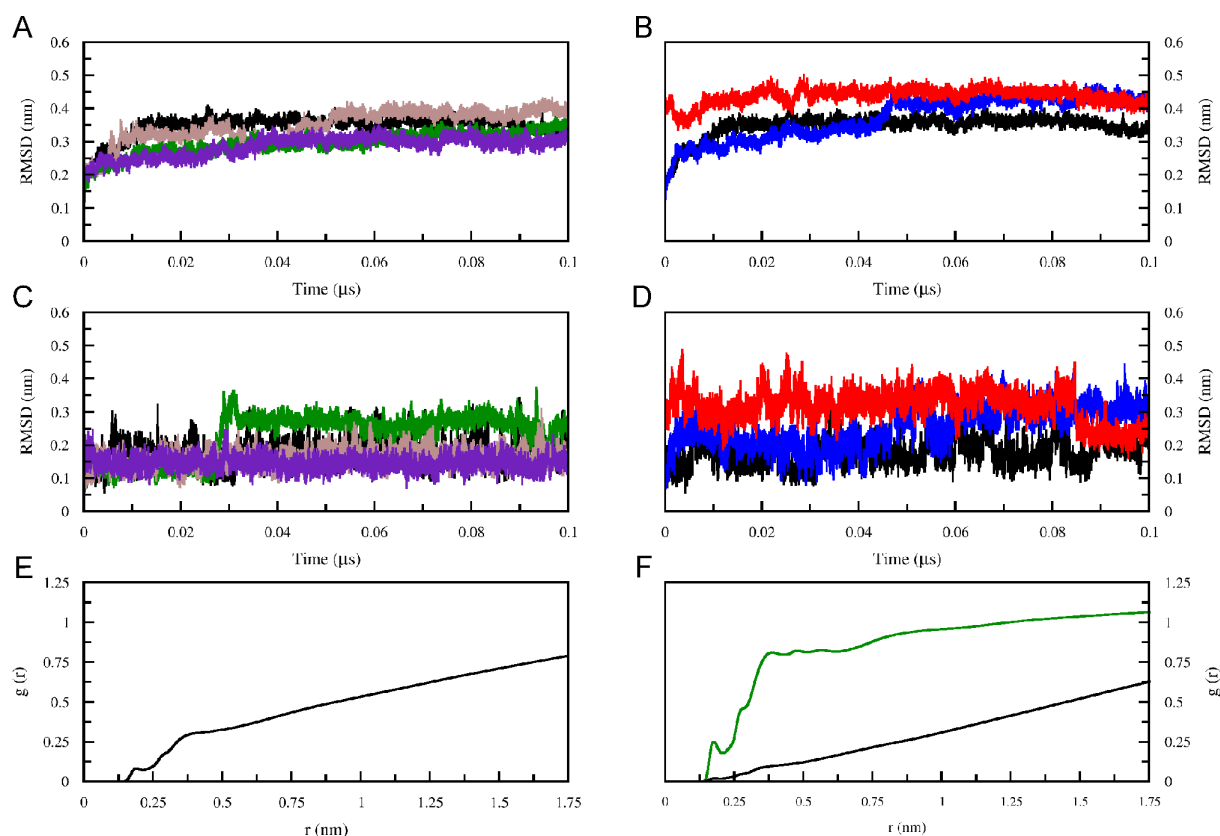


Fig1. MD analyses as a function of time for systems 1 (brown), 2 (indigo), 3 (black), 4 (blue), 5 (red), and 6 (green). All-atom RMSD from crystal structure is shown in (A) and (B) for entire protein, and in (C) and (D) for residues from the C-terminal α -helix. A comparative radial distribution function (RDF) of water molecules around StnII in System 3 and System 6 (black curve in E and F, respectively) and urea molecules around StnII in System 6 (green curve in F).

Considering the loss in secondary structure during the trajectory of StnII at $\text{pH} = 3.0$, as accompanied through pseudo dihedral ξ (Fig. S2F) and in order to further explore the influence of the simulation pH (through amino acid residues ionization) on StnII conformational stability, the last frame from the acid simulation of StnII was used to start a new simulation in physiological condition. During this simulation, the evaluation of the RMSD relative to the C-terminal α -helix accordingly indicates a return to the conformation adopted by this helix in $\text{pH} = 7.0$ (system 5, red curve in Fig. 1D and Fig. S2F for the pseudo

dihedral ξ), pointing to the reversibility of the conformational modifications observed on StnII between acid and neutral solutions.

When StnII was in a high urea concentration solution (System 6, green curve), an increasing of its hydrophilic solvent-accessible surface (SAS) was observed (Fig. S3A). However, no major difference could be observed for its RMSD (Fig. 1A), indicating that, in the simulated time scale, these conditions do not significantly affect the protein structure stability, despite of the increased deviation of its C-terminal α -helix (Fig. 1C).

3.3. Structural fluctuation

While the RMSD data presented in Figure 1 present a global perspective of the protein conformational behavior during the performed simulations, it lacks resolution at the residue level. To overcome this simplification we analyzed the relative flexibility and helical content of the actinoporins EqtxII and StnII as a function of both time and residue numbers, using the root mean square fluctuation (RMSF) and ellipticity at 222 nm, respectively [Verli & Guimarães, 2005, Verli *et al.*, 2007, Terra *et al.*, 2007, Pol-Fachin *et al.*, 2009].

Accordingly, upon acidification the loop regions connecting strands β_5 and β_6 and strands β_8 and β_9 present an increased flexibility in EqtxII and a decreased flexibility for StnII (Fig. 2B and D, respectively). On the other hand, the observed flexibility in the protein N-terminal region for both EqtxII and StnII (Figure 2) was similar during their trajectories in acid and in physiological solution.

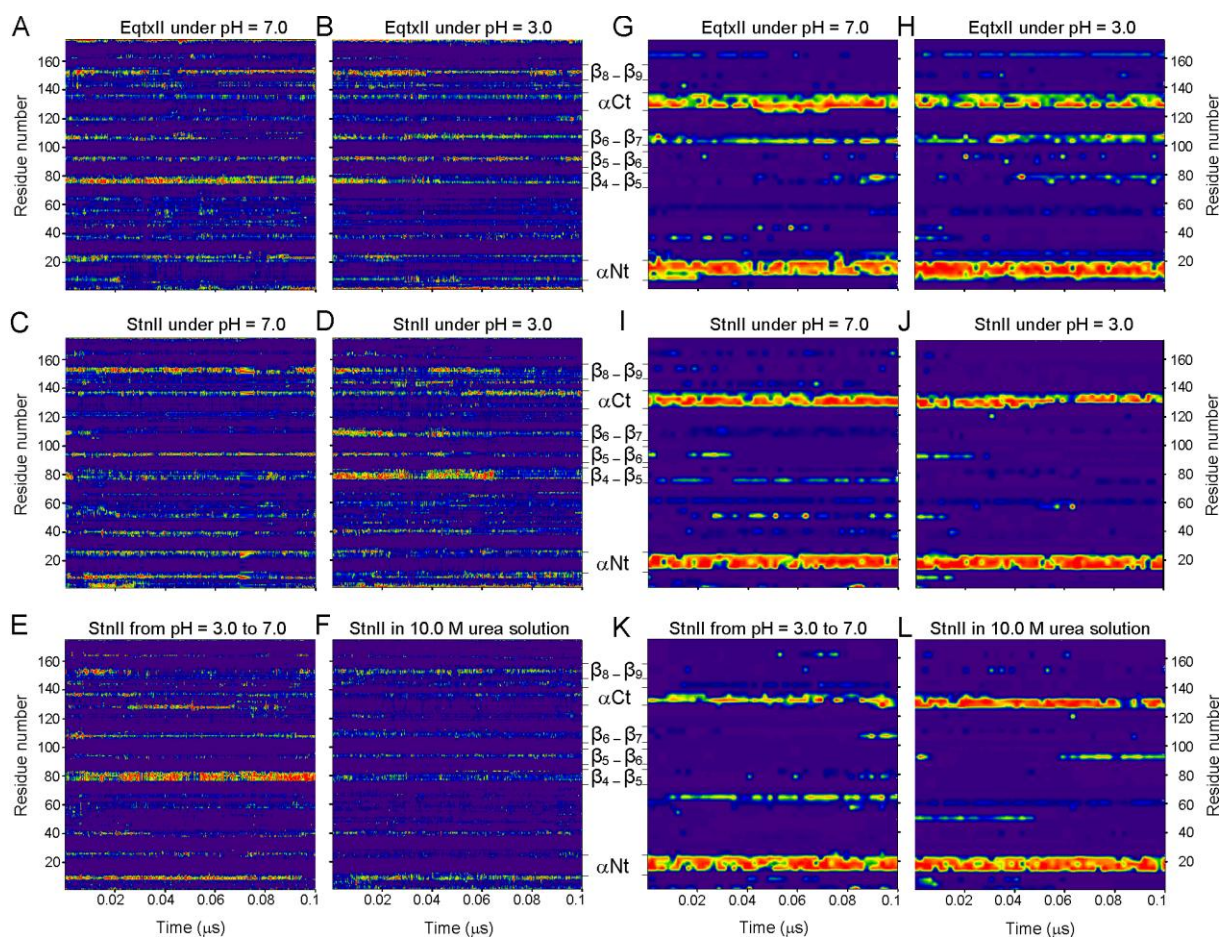


Fig2. All-atom RMSF from 0.06 to 0.14 nm for systems 1 (EqtxII under pH = 7.0, A), 2 (EqtxII under pH = 3.0, B), 3 (StnII under pH = 7.0, C), 4 (StnII under pH = 3.0, D), 5 (StnII under pH = 7.0 starting from the last frame of the simulation at pH = 3.0, E), and 6 (StnII in 10.0 M urea solution, F); and ellipticity from 0 to 80 % at 222 nm (percentage of time in which the residues present a helical character) for systems 1 (G), 2 (H), 3 (I), 4 (J), 5 (K), and 6 (L). Both analyses range from blue to red according with the increase in flexibility or helical content.

Nonetheless, flexibility similarity in acid condition was also observed between these proteins, including an increased flexibility of the loop between strands β_6 and β_7 (Fig. 2B and D, respectively). It is important to note that the loop between strands β_6 and β_7 and the beginning of strand β_7 corresponds to the region rich in tryptophan residues (Trp112, Trp116,

Trp117 in EqtxII and Trp110, Trp114, Trp115 in StnII), an essential segment for contact with the membrane [Hong *et al.*, 2002; Anderluh *et al.*, 2005]. Furthermore, this loop is located in the vicinity of phosphocholine binding site, defined by residues of StnII (Ser52, Val85, Ser103, Pro105, Tyr111, Tyr131, Tyr135, Tyr136) and EqtxII (Ser54, Val87, Ser105, Pro107, Tyr113, Tyr133, Tyr137, Tyr138). In this context, experimental data showed that acidic solutions are capable to increase the interaction between StnII and EqtxII with hydrophobic probes [Malavasic *et al.*, 1996; Álvarez *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2001] and that some pore-forming proteins may undergo partial unfolding triggered by membrane surfaces [van der Goot *et al.*, 1991; Bychkova *et al.*, 1996; Parker & Feil, 2005]. These data agree with previous works [Mancheño *et al.*, 2001; Ulrich *et al.*, 2004] that an acid condition can be employed in the study of EqtxII and StnII to mimic the conformational modifications induced by the membrane surface and suggest that acid conditions may induce a conformational state in the protein suitable for recognition of its molecular target.

Considering that the analysis of RMSD and RMSF for EqtxII (Systems 1-2) and StnII (Systems 3-4) pointed to modifications in the secondary structure content and flexibility on the C-terminal α -helix of these toxins, and in view of the important role of this secondary element to this protein family, its α -helical content was characterized through ellipticity at 222 nm as a function of time and residue numbers (percentage of time in which the residues present an helical character, Figure 2) [Hirst & Brooks, 1994]. Accordingly, the increased flexibility in this region appears to be observed also in the stability of its helical content over the simulation time for EqtxII (Fig. 2B, H, Fig. S4A and B) and for StnII (Fig. 2D and J). In addition, our results corroborate with synchrotron radiation CD analysis for EqtxII [Miles *et al.*, 2008] showing that this secondary structure may change in solution (Fig. 2G and 2H), although, in acid solution a high degree of conformational instability in the C-terminal α -helix of the protein may be observed (Fig. S4B).

When the last frame of StnII, simulated at pH = 3.0, is modified to pH = 7.0, that is, a return of StnII to a physiological pH, the beginning of the reverse process appears to occur, with a consequent decrease in flexibility and increase in helical content, close to 0.1 μ s of simulation (Fig. 2E, K and Fig. 3). Such behavior suggests that acid environments may be able to induce partially unfolded states for StnII and EqtxII, mainly in C-terminal α -helix, since the NMR structure of EqtxII was obtained in acid solution and seems to be partially unfolded when compared with all crystal structures available of actinoporins (Fig. S1). Additionally, considering the physical-chemical characteristic (i.e. dielectric constant, pH) and complex composition (i.e. lipid, protein, carbohydrate) at the membrane surface [Sui, 2000; Parker & Feil, 2005; Konkul, 2009] our results may be complementary to a recent publication [Lam *et al.*, 2009] that present MD simulations for EqtxII in DMPC membrane environment.

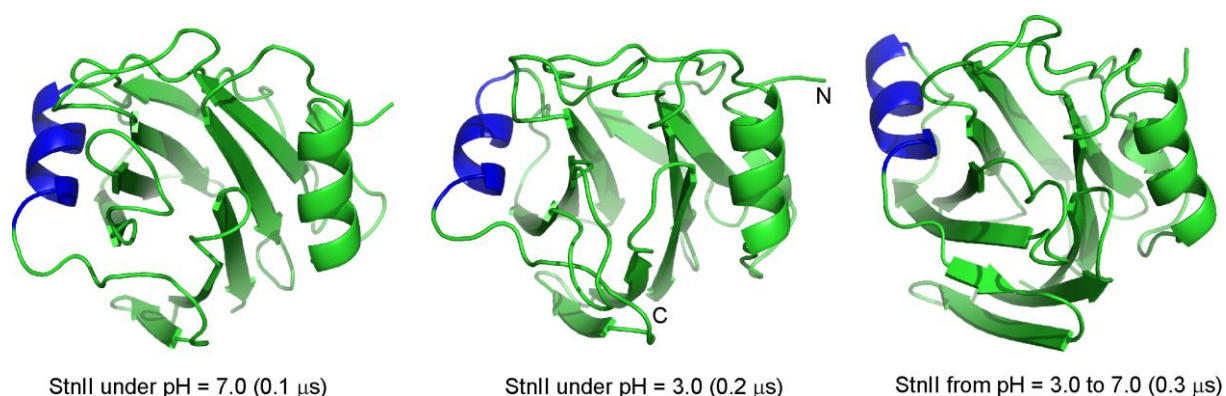


Fig3. Conformational transitions of StnII over 0.3 μ s MD simulation as a function of solution pH.

In opposition to its behavior in acidic medium, the simulation of StnII in a 10.0 M urea solution (System 6) presented a lower flexibility for the entire protein (Fig. 2F), which appears to be the reason for the small deviation on RMSD and Rg from the starting structure (green curve in Fig. 1A and Fig. S3B). Furthermore, a comparison of radial distribution function of the solvent around the protein, when in neutral condition and in 10.0 M urea solution (Fig. 1E and F, respectively), indicates that the water solvation shells of StnII are

modified by influence of the high urea concentration (black curve in Fig. 1F). By the observed increasing of its hydrophilic SAS in relation to the starting X-ray-derived model (Fig. S3A), it may be postulated that such reduction in flexibility may be caused by an increased number of hydrogen bond interactions between hydrophilic residues of the protein and the urea molecules that accumulate around it (green curve in Fig. 1F, Fig. S3D and Fig. S5).

3.4. Structural reasons for the lack of StnII hemolytic activity in urea solution

Changes in structures of EqtxII and StnII caused by different denaturation conditions (that is, pre-incubation and incubation in extremely acid and alkaline solutions or in increasing concentration of strong denaturant agents such as guanidine hydrochloride and urea) were used to find partially unfolded states related with their putative mechanism of action and so to postulate which modifications should be associated to the pore formation in model lipid membranes and in red blood cells [Belmonte *et al.*, 1993; Malavasic *et al.*, 1996; Álvarez *et al.*, 1998; Álvarez *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2001]. Considering this context, experimental results indicate that conformational modifications induced by changing the pH are much smaller than changes caused by urea [Malavasic *et al.*, 1996; Álvarez *et al.*, 2001]. In addition, the most clear experimental data associated with these modifications were presented by fluorescent measurements, for which both EqtxII and StnII had their structures affected by an increased exposition in their Trp residues to aqueous solution [Malavasic *et al.*, 1996; Álvarez *et al.*, 2001]. Such exposition highly reduced the hemolytic activity of StnII without, however, major modifications in its secondary structure content [Martínez *et al.*, 2001].

Our results in the MD simulation of StnII in 10.0 M urea solution (System 6) are in agreement with previous far-UV CD spectrum [Martínez *et al.*, 2001] since this trajectory did not present major modifications in the protein secondary structure in the simulated time scale.

Additionally, our results also agree with fluorescence data available, as the interaction energy analyses between these residues and solution molecules in system 6 was increased in almost two times in comparison with others systems (Table 1). Furthermore, when this analysis was performed for those residues that participate in the phosphocholine binding site, a similar behavior could be seeing for Pro105, Tyr111, Tyr135 and Tyr136 (Table 1). Since the Tyr135 and Tyr136 residues compose the C-terminal α -helix of StnII, this last data may be related of the increased deviation previously present in figure 1C (green curve).

Table 1. Interaction energy analysis between Trp and phosphocholine binding site residues of actinoporins with solution molecules present on each condition.

		Average interaction energy (kJ/mol) ^a						
		System 1 (pH = 7.0)	System 2 (pH = 3.0)	StnII	System 3 (pH = 7.0)	System 4 (pH = 3.0)	System 5 (pH = 3.0 to 7.0)	System 6 (10.0 M urea)
Trp residues	EqtxII							
	Trp45	-6.6 ± 6.6	-7.1 ± 5.8	Trp43	-5.4 ± 4.7	-14.9 ± 8.7	-15.8 ± 7.9	-22.6 ± 14.0
	Trp112	-72.9 ± 26.7	-89.7 ± 14.2	Trp110	-78.7 ± 11.8	-84.6 ± 15.8	-63.3 ± 16.3	-146.9 ± 16.5
	Trp116	-27.9 ± 9.7	-26.9 ± 8.9	Trp114	-31.9 ± 9.9	-29.8 ± 12.9	-24.1 ± 6.6	-41.2 ± 13.8
	Trp117	-6.2 ± 5.7	-6.4 ± 5.6	Trp115	-4.9 ± 7.2	-10.9 ± 8.2	-16.4 ± 9.1	-36.2 ± 13.1
	Trp149	-58.9 ± 11.8	-53.8 ± 12.5	Trp146	-60.8 ± 13.9	-59.3 ± 12.4	-69.6 ± 11.7	-100.5 ± 12.5
Phosphocholine binding site	Ser54	-42.8 ± 16.8	-50.9 ± 12.5	Ser52	-64.0 ± 17.8	-50.8 ± 17.9	-49.1 ± 17.8	-49.3 ± 14.5
	Val87	-6.0 ± 2.5	-5.1 ± 2.3	Val85	-7.7 ± 6.2	-9.4 ± 7.8	-5.4 ± 3.2	-9.2 ± 3.3
	Ser105	-20.2 ± 17.8	-17.9 ± 14.4	Ser103	-30.8 ± 14.4	-28.9 ± 14.6	-39.7 ± 11.8	-32.1 ± 12.4
	Pro107	-13.2 ± 4.1	-10.4 ± 3.2	Pro105	-9.5 ± 3.7	-12.8 ± 5.1	-8.6 ± 7.7	-25.7 ± 8.7
	Tyr113	-71.3 ± 24.9	-77.6 ± 19.2	Tyr111	-75.5 ± 16.4	-84.9 ± 23.6	-62.1 ± 19.5	-135.8 ± 17.9
	Tyr133	-43.8 ± 13.7	-39.5 ± 13.6	Tyr131	-27.9 ± 20.9	-53.2 ± 16.0	-69.0 ± 20.7	-58.7 ± 13.8
	Tyr137	-64.6 ± 20.8	-68.8 ± 19.1	Tyr135	-81.1 ± 16.8	-83.6 ± 17.9	-63.3 ± 22.3	-110.2 ± 21.2
	Tyr138	-98.7 ± 16.5	-100.7 ± 16.5	Tyr136	-81.4 ± 24.2	-98.7 ± 17.9	-84.1 ± 24.7	-162.0 ± 22.2

^aAverage values from the sum of Coulomb and Lennard-Jones components over the 0.1 μ s MD simulation.

Analyses to verify if protein residues were preferentially interacting with urea molecule were also performed by measuring the interaction energy between protein residues and the solution molecules individually. The results obtained (Table 2) are in agreement with the data present in Figure 1F and Figure S3D, as illustrated in the figure S5, which suggest that the recognition of molecular target by StnII should not be favorable in this condition.

Table 2. Interaction energy analysis between Trp and phosphocoline binding site residues of StnII with solution molecules present in a 10.0 M urea solution.

		Average interaction energy (kJ/mol)		
		Water	System 6 urea	Solution
Trp residues	Trp43	-1.7 ± 3.1	-20.9 ± 13.9	-22.6 ± 14.0
	Trp110	-27.4 ± 13.1	-119.4 ± 22.0	-146.9 ± 16.5
	Trp114	-4.8 ± 5.2	-36.4 ± 14.1	-41.2 ± 13.8
	Trp115	-1.7 ± 3.1	-35.6 ± 13.5	-36.2 ± 13.1
	Trp146	-11.7 ± 10.5	-88.8 ± 16.9	-100.5 ± 12.5
Phosphocoline binding site	Ser52	-10.1 ± 13.3	-39.2 ± 15.5	-49.3 ± 14.5
	Val85	-1.2 ± 1.6	-7.9 ± 3.2	-9.2 ± 3.3
	Ser103	-11.5 ± 15.2	-20.6 ± 14.0	-32.1 ± 12.4
	Pro105	-1.2 ± 1.8	-24.4 ± 9.1	-25.7 ± 8.7
	Tyr111	-31.2 ± 20.5	-104.5 ± 22.0	-135.8 ± 17.9
	Tyr131	-15.8 ± 17.1	-42.9 ± 20.2	-58.7 ± 13.8
	Tyr135	-27.0 ± 19.3	-83.2 ± 26.4	-110.2 ± 21.2
	Tyr136	-36.9 ± 20.9	-125.1 ± 28.2	-162.0 ± 22.2

^aAverage values from the sum of Coulomb and Lennard-Jones components over the 0.1 μ s MD simulation.

Altogether, considering the necessary interaction with the membrane surface, for which the phosphocoline binding site may have a important role, and the need of flexibility for the mechanism of action from actinoporins, it appears that urea may modulate StnII hemolytic activity by hampering its ability to interact with membrane surfaces and also to cause a molecular rigidity which may inhibit the conformational changes associated to the membrane pore formation.

4. Conclusions

In the current work a series of MD simulations of actinoporins EqtxII and StnII were performed in different solution conditions in order to support a characterization of the proteins structure, conformation and dynamics according to environmental conditions at the atomic level.

These calculations point to a role of solvation effects of urea in modulating hemolytic activity of StnII, in the absence of a major loss in secondary structure content. Additionally,

considering that some pore-forming proteins may bind as a monomer and then undergo partial unfolding triggered by a local acid pH near negatively charged membrane surfaces [van der Goot *et al.*, 1991; Bychkova *et al.*, 1996; Parker & Feil, 2005], our results agree with previous studies [Mancheño *et al.*, 2001; Ulrich *et al.*, 2004] that an acid condition can be employed in the study of EqtxII and StnII to mimic the effect of a membrane surface. In this way, our results shows that during the simulations in acid condition the folded structure of StnII undergo a conformational modification, resembling the unfolded NMR conformation of EqtxII. Such partially unfolding was observed to be reversible and mainly focused in a functionally important region of these proteins. Altogether, it may be expected that a deeper comprehension of these phenomena could contribute in future explorations of biological properties of actinoporins in the rational design of new bioactive compounds.

Aknolegments

We thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq #472174/2007-0), Ministério de Ciência e Tecnologia, and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Ministério da Educação, Brasília, DF, Brazil, for their financial support and fellowships.

References

- [1] C. Álvarez, M.E. Lanio, M. Tejuca, D. Martínez, F. Pazos, A.M. Campos, M. V. Encinas, T. Pretiñes, S. Schreier, E.A. Lissi, The role of ionic strength on the enhancement of the hemolytic activity of sticholysin I, a cytolysin from *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* 36 (1998) 165-178.
- [2] C. Álvarez, I.F. Pazos, M.E. Lanio, D. Martínez, S. Schreier, F. Casallanovo, A. M., Camos, and E. Lissi, Effect of pH on the conformation, interaction with membranes and

- hemolytic activity of sticholysin II, a pore forming cytolysin from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* 39 (2001) 539-553.
- [3] C. Álvarez, J.M. Mancheño, D. Martínez, M. Tejuca, F. Pazos, and M.E. Lanio, Sticholysins, two pore-forming toxins produced by the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*: their interaction with membranes. *Toxicon* 54 (2009) 1135-1147.
- [4] G. Anderluh, J. Pungercar, I. Krizaj, B. Strukelj, F. Gubensek, and P. Maček, N-terminal truncation mutagenesis of equinatoxin II, a pore-forming protein from the sea anemone *Actinia equina*. *Protein Eng.* 10 (1997) 751-755.
- [5] G. Anderluh and P. Maček, Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). *Toxicon* 40 (2002) 111-124.
- [6] G. Anderluh, A. Razpotnik, Z. Podlesek, P. Maček, F. Separovic, and R.S. Norton, Interaction of the eukaryotic pore-forming cytolysin equinatoxin II with model membranes: ^{19}F NMR studies. *J.Mol.Biol.* 347 (2005) 27-39.
- [7] A. Athanasiadis, G. Anderluh, P. Maček, and D. Turk, Crystal structure of the soluble form of equinatoxin II, a pore-forming toxin from the sea anemone *Actinia equina*. *Structure* 9 (2001) 341-346.
- [8] G. Belmonte, C. Pederzoli, P. Maček, and G. Menestrina, Pore formation by the sea anemone cytolysin equinatoxin II in red blood cells and model lipid membranes. *J. Membr. Biol.* 131 (1993) 11-22.
- [9] H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postman, W.F. van Gunsteren, J. Hermans, Interaction models for water in relation to protein hydration. In: *Intermolecular forces*, B. Pullman, Ed., Dordrecht: Reidel, Netherland, 1981, pp. 331-342.
- [10] H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postma, A. DiNola, and J.R.J. Haak, Molecular-dynamics with coupling to an external bath. *Chem. Phys.* 81 (1984) 3684–3690.

- [11] V.E. Bychkova, A.E. Dujsekina, S.I. Klenin, E.I. Tiktopulo, V.N. Uversky, and O.B. Ptitsyn, Molten globule-like state of cytochrome c under conditions simulating those near the membrane surface. *Biochemistry* 35 (1996) 6058-6063.
- [12] F. Casallanovo, F.J.F. de Oliveira, F.C. de Souza, U. Ros, Y. Martínez, D. Penton, M. Tejuca, D. Martínez, F. Pazos, T.A. Pertinhez, A. Spisni, E.M. Cilli, M.E. Lanio, C. Álvarez, and S. Schreier, Model peptides mimic the structure and function of the N-terminus of the pore-forming toxin sticholysin II. *Biopolymers* 84 (2006) 169-180.
- [13] T. Darden, D. York, and L.J. Pedersen, Particle mesh Ewald – an $N \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. *Chem. Phys.* 98 (1993) 10089-10092.
- [14] W.L. Delano, The Pymol Molecular Graphics System, Delano Scientific, Sao Carlos, CA, USA, 2002. <http://www.pymol.org>.
- [15] B.L. de Groot and H. Grubmüller, Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF. *Science* 294 (2001) 2353-2357.
- [16] R.S. de Witte and E.J. Shakhnovich, Pseudodihedrals: simplified protein backbone representation with knowledge-based energy. *Protein Sci.* 3 (1994) 1570-1581.
- [17] N. Guex and M.C. Peitsch, Swiss-model and the Swis Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18 (1997) 2714-2723. <http://www.expasy.org/spdbv>.
- [18] B. Hess, H. Bekker, J.C. Berendsen, and J.G.E.M. Fraaije, LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem.* 18 (1997) 1463-1472.
- [19] M.G., Hinds, W. Zhang, G. Anderluh, P. E. Hansen and R.G. Norton, Solution structure of the eukaryotic pore-forming cytolysin equinotoxin II: Implications for pore formation. *J. Mol. Biol.* 315 (2002) 1219-1229.
- [20] J. D. Hirts and C.L. Brooks III, Helicity, circular dichroism and molecular dynamics of protein. *J. Mol. Biol.* 243 (1994) 173-178.

- [21] Q. Hong, I. Gutiérrez-Aguirre, A. Barlič, P. Malovrh, K. Kristan, Z. Podlesek, P. Maček, D. Turk, J.M. González-Mañas, J. H. Lakey, and G. Anderluh, Two-step membrane binding by equinatoxin II, a pore-forming toxin from the sea anemone, involves an exposed aromatic cluster and a flexible helix. *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 41916-41924.
- [22] V. Huerta, V. Morera, Y. Guanche, G. China, L.J. Gonzalez, L. Betancourt, D. Martínez, C. Álvarez, M.E. Lanio, and V. Besada, Primary structure of two cytolysin isoforms from *Stichodactyla helianthus* differing in their hemolytic activity. *Toxicon* 39 (2001) 1253-1256.
- [23] W. Humphrey, A. Dalke, and K. Schulten, VMD - Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graph. Model.* 14 (1996) 33-38. <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd>.
- [24] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. Abbreviations and symbols for description of conformation of polypeptides chains. *J. Mol. Biol.* 52 (1970) 1-17.
- [25] K. Kristan, Z. Podlesek, V. Hojnik, I. Gutiérrez-Aguirre, G. Gunčar, D. Turk, J.M. González-Mañas, J.H. Lakey, and P. Maček, Pore formation by equinatoxin, a eukaryotic pore-forming toxin, requires a flexible N-terminal region and a stable β -sandwich. *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 46509-46517.
- [26] C.K. Kristan, G. Viero, M. Dalla Serra, P. Maček, and G. Anderluh, Molecular mechanism of pore formation by actinoporins. *Toxicon* 54 (2009) 1125-1134.
- [27] A. Kukol, Lipid models for united-atom molecular dynamics simulations of proteins. *J. Chem. Theory Comput.* 5 (2009) 615-626.
- [28] Y.H. Lam, A. Hung, R.S. Norton, F. Separovic, and A. Watts, Solid-state NMR and simulation studies of equinatoxin II N-terminus interaction with lipid bilayers. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 78 (2009) 858-872.

- [29] M.E. Lanio, V. Morera, C. Álvarez, M. Tejuca, T. Gómez, F. Pazos, V. Besada, D. Martínez, V. Huerta, G. Padrón, and M.A. Cháves, Purification and characterization of two hemolysins from *Stichodactyla Helianthus*. *Toxicon* 39 (2001) 187-194.
- [30] A. Laskowski, M.W. MacArthur, D.S. Moss, and J.M. Thornton, PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Crystallogr.* 26 (1993) 283-291.
- [31] M. Malavasic, N. Poklar, P. Macek, and G. Vesnaver, Fluorescence studies of the effect of pH, guanidine hydrochloride and urea on equinatoxin II conformation. *Biochim. Biophys. Acta* 1280 (1996) 65-72.
- [32] J.M. Mancheño, V. De Los Ríos, A.M. Del Pozo, M.E. Lanio, M. Oñaderra, and J.G. Gavilanes, Partially folded states of the cytolytic protein Sticholysin II. *Biochim. Biophys. Acta.* 545 (2001) 122-131
- [33] J.M. Mancheño, J. Martin-Benito, M. Martinez-Ripoll, J.G. Gavilanes, and J.A. Hermanoso, Crystal and electron microscopy structures of sticholysin II actinoporin reveal insights into the mechanism of membrane pore formation. *Structure* 11 (2003) 1319-1328.
- [34] D. Martínez, A.M. Campos, F. Pazos, C. Álvarez, M.E. Lanio, F. Casallanovo, S. Schreier, R.K. Salinas, C. Vergara, and E. Lissi, Properties of St I and St II, two isotoxins isolated from *Stichodactyla helianthus*: a comparison. *Toxicon* 39 (2001) 1547 - 1560.
- [35] A.J. Miles, A. Drechsler, K. Kristan, G. Anderluh, R.S. Norton, B.A. Wallace, and F. Separovic, The effects of lipids on the structure of the eukaryotic cytolytic equinatoxin II: a synchrotron radiation circular dichroism spectroscopic study. *Biochim. Biophys. Acta.* 1778 (2008) 2091-2096.
- [36] R.S. Norton, Structures of sea anemones toxins. *Toxicon* 54 (2009) 1075-1088
- [37] M.W. Parker and S.C. Feil, Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 88 (2005) 91-142.

- [38] N. Poklar, J. Lah, M. Salobir, P. Maček, and G. Vesnaver, pH and temperature-induced molten globule-like denatured states of equinatoxin II: a study by UV-melting, DSC, Far- and Near-UV CD spectroscopy, and ANS fluorescence. *Biochemistry* 36 (1997) 14345-14352.
- [39] L. Pol-Fachin, C.L. Fernandes and H. Verli, GROMOS96 43a1 performance on the characterization of glycoprotein conformational ensembles through molecular dynamics simulations. *Carbohydr. Res.* 344 (2009) 491-500.
- [40] A.G. Rocco, L. Mollica, P. Ricchiuto, A.M. Baptista, E. Gianazza, and I. Eberini, Characterization of the protein unfolding processes induced by urea and temperature. *Biophys. J.* 94 (2008) 2241–2251.
- [41] S. Sui, Membrane-induced conformational changes of proteins. *Adv. Colloid. Interface Sci.* 85 (2000) 257-267.
- [42] M. Tejuca, G. Anderluh, M. Dalla Serra, Sea anemone cytolytins as toxic components of immunotoxins. *Toxicon* 54 (2009) 1206-1214.
- [43] R.M.S. Terra, J.A. Guimarães, and H. Verli, Structural and functional behavior of biologically active monomeric melittin. *J. Mol. Graph. Model.* 25 (2007) 767-727.
- [44] N.P. Ulrih, G. Anderluh, P. Macek, and T.V. Chalikian, Salt-induced oligomerization of partially folded intermediates of equinatoxin II. *Biochemistry* 43 (2004) 9536-9545.
- [45] F.G. van der Goot, J.M. Gonzales-Manas, J.H. Lakey, and F.A. Pattus, ‘molten-globule’ membrane-insertion intermediate of the pore-forming domain of colicin A, *Nature* 354 (1991) 408-410.
- [46] D. van der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A.E. Mark, and H.J.C.J. Berendsen, GROMACS: fast, flexible and free. *J. Comput. Chem.* 26 (2005) 1701–1718.

- [47] W.F. van Gunsteren, S.R. Billeter, A.A. Eising, P.H. Hünenberger, P. Krüeger, A.E. Mark, W.R.P. Scott, and I.G. Tironi, Biomolecular simulation: the GROMOS96 manual and user guide, Vdf Hochschulverlag, AG Zurich: Switzerland, 1996.
- [48] H. Verli, and J.A. Guimarães, Insights into the induced fit mechanism in antithrombin-heparin interactions using molecular dynamics simulations. *J. Mol. Graph. Model.* 24 (2005) 203-212.
- [49] H. Verli, A. Calazans, R. Brindeiro, A. Tanuri, and J.A. Guimarães, Molecular dynamics analysis of HIV-1 matrix protein: Clarifying differences between crystallographic and solution structures. *J. Mol. Graph. Model.* 26 (2007) 62-68.

Supplementary data

Differential Effect of Solution Conditions on the Conformation of the Actinoporins Sticholysin II and Equinatoxin II

Edson V. F. Fauth^a; Eduardo M. Cilli^b and Hugo Verli^{a,c*}

^aCentro de Biotecnologia - UFRGS, Porto Alegre, RS; AV Bento Gonçalves 9500, CP 15005, Porto Alegre 91500-970,RS, Brazil.

^bDepartamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química –UNESP, Araraquara, SP; Araraquara, São Paulo, SP, Brazil.

^cFaculdade de Farmácia - UFRGS, Porto Alegre, RS; AV Ipiranga 2752, Porto Alegre 90610-000,RS, Brazil.

*Corresponding author. Tel.: +55-51-3316-7770; fax: +55-51-3316-7309; E-mail address: hverli@cbiot.ufrgs.br

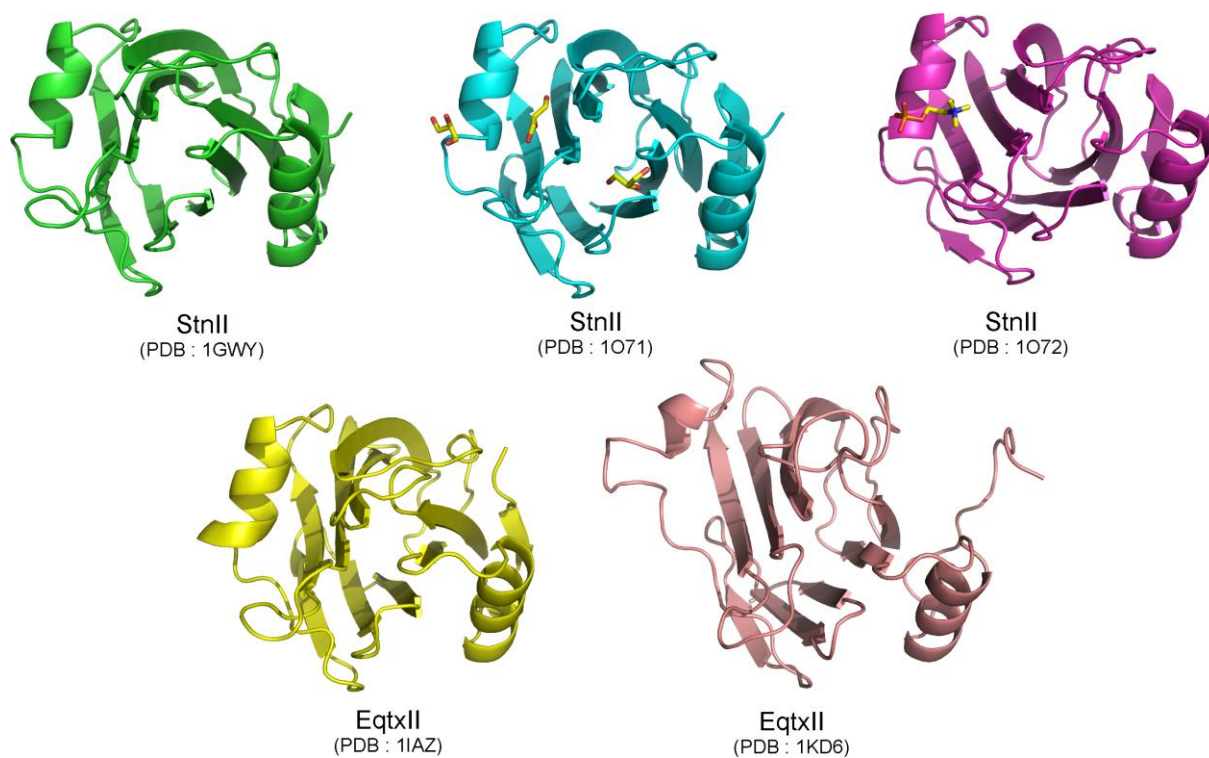


Figure S1: Comparison between all atomic structures of the entire actinoporins available. Crystal structure of StnII (PDB ID 1GWY), crystal structure of StnII complex with glycerol (PDB ID 1O71) and crystal structure of StnII complex with phosphorylcholine (PDB ID 1O72). Crystal structure of EqtxII (PDB ID 1IAZ) and NMR structure of EqtxII (PDB ID 1KD6).

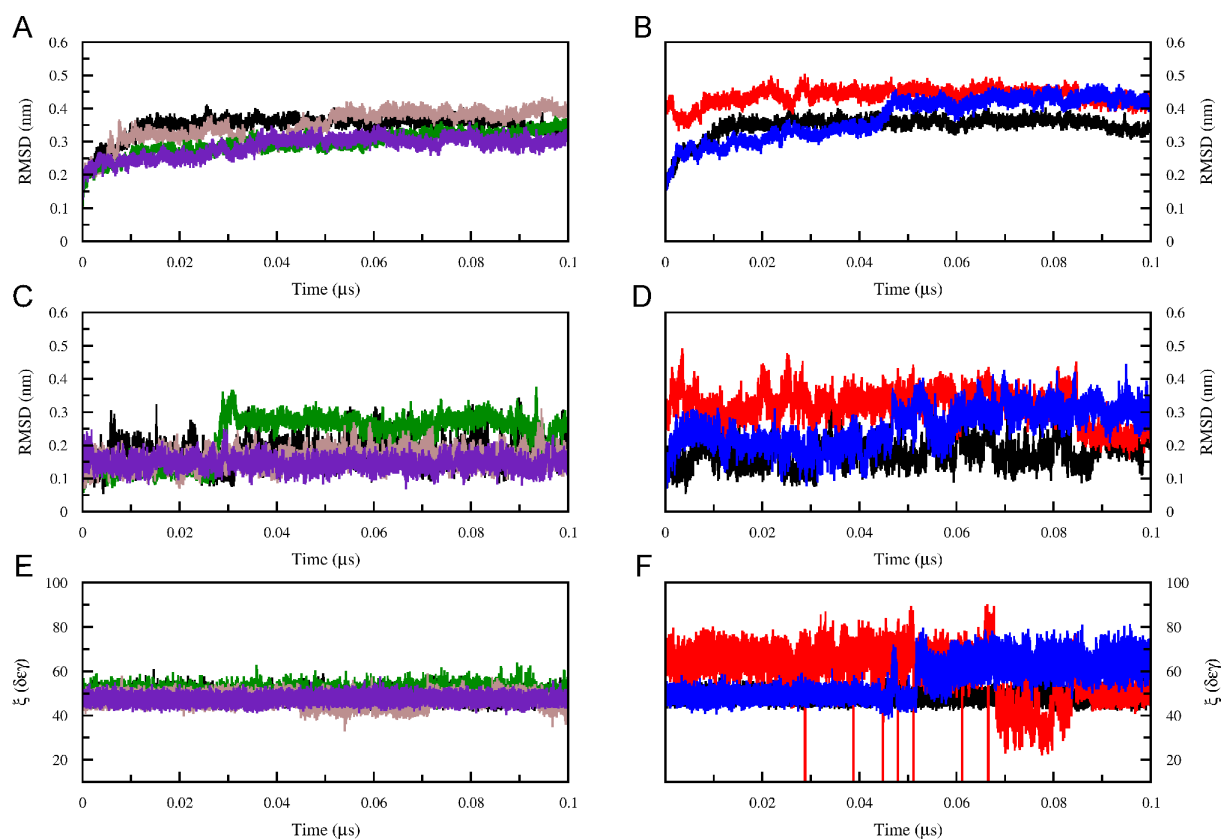


Figure S2: MD analyses as a function of time in relation to the starting X-ray-derived model for System 1 (brown), System 2 (indigo), System 3 (black), System 4 (blue), System 5 (red), and System 6 (green) considering the following properties: root mean square deviation (RMSD) for entire protein (A) and (B), and for residues of C-terminal α -helix (C) and (D). Average pseudo dihedral ξ (i.e. the dihedral formed by 4 consecutive α -carbon atoms $C_{\alpha i}$, $C_{\alpha i+1}$, $C_{\alpha i+2}$ and $C_{\alpha i+3}$) over residues of C-terminal α -helix (E) and (F), for which the reference value for a α -helical content is around 45° (see Section 3.1 for further details).

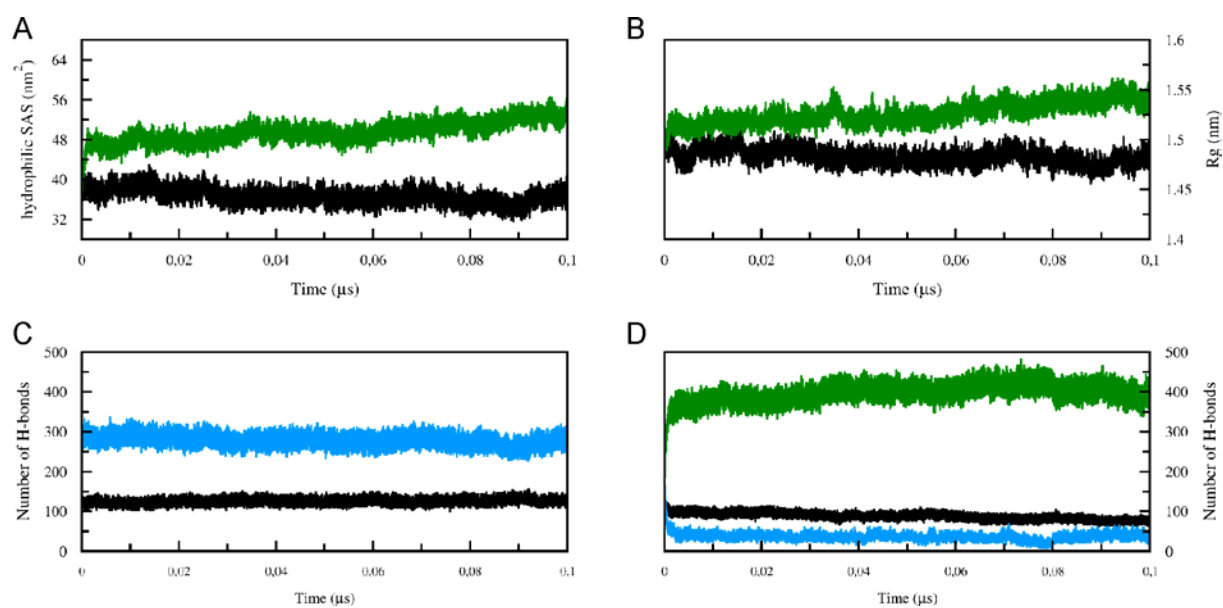


Figure S3: MD analyses as a function of time in relation to the starting X-ray-derived model considering the following properties: (A) hydrophilic solvent-accessible surface (SAS) and (B) gyration radius (R_g) for System 3 (black curve) and 6 (green curve), and the number of hydrogen bonds interactions between protein-protein (black curve) and protein-water (light blue curve) in System 3 (C) and 6 (D), and protein-urea (green curve) in System 6 (D).

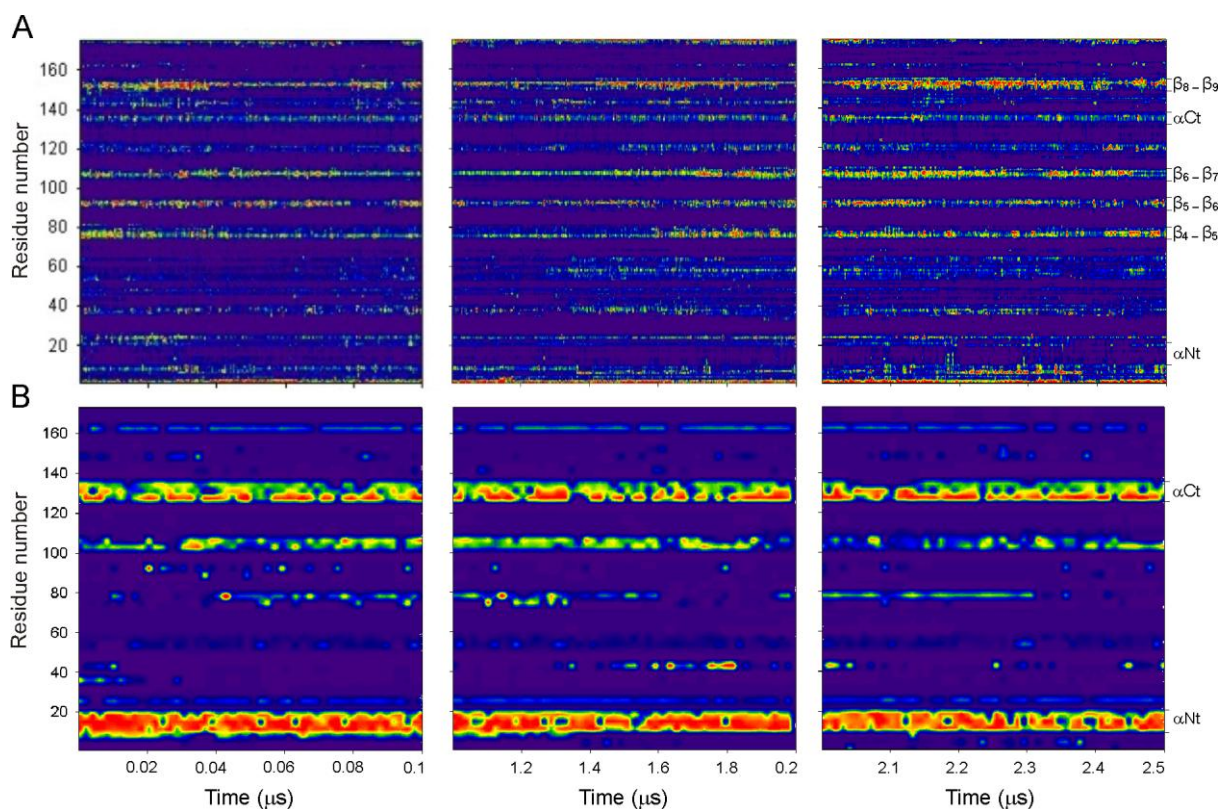


Figure S4: (A) All-atom root mean square fluctuation (RMSF) from 0.06 to 0.14 nm for EqtXII in acid solution (System 2) over the 0.25 μs simulation as a function of both time and residue numbers are presented together with its corresponding (B) ellipticity from 0 to 80 % at 222 nm (percentage of time in which the residues present a helical character). Both analyses range from blue to red according with the increase in flexibility or helical content.

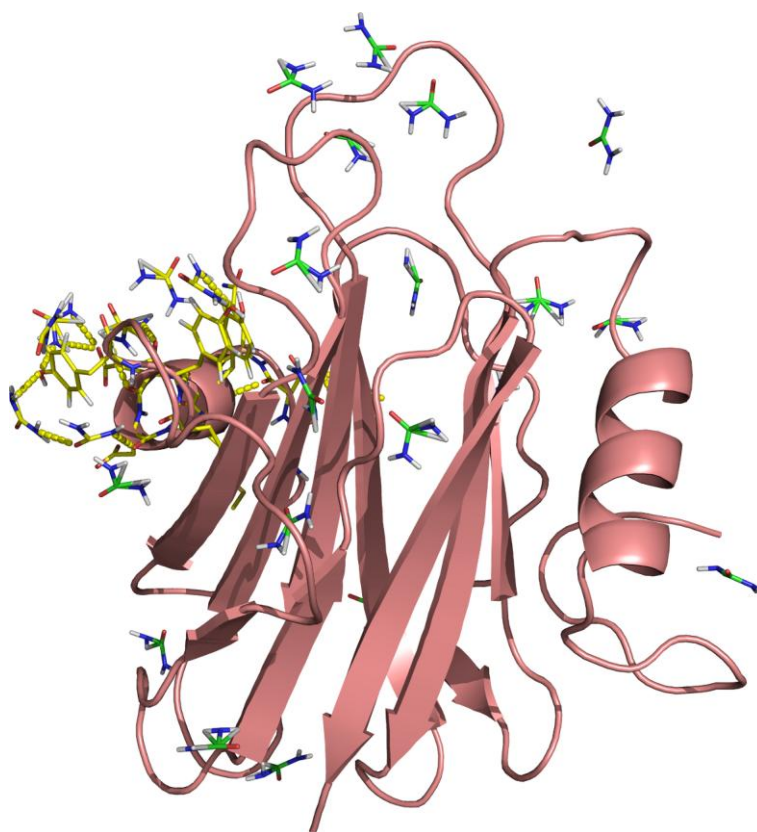


Figure S5: Illustration of the of hydrogen bonds interactions between hydrophilic residues in the C-terminal α -helix of StnII (i.e. Tyr135 and Tyr136) and urea molecules that accumulates around it.

5. Conclusões

A partir dos objetivos traçados, o presente trabalho permitiu:

- Avaliar o perfil conformacional das actinoporinas com estrutura 3D determinada (StnII e EqtxII), em diferentes soluções através da realização da DM;
- Excluir possíveis efeitos de empacotamento durante a cristalização dessas proteínas devido à estabilidade das estruturas da StnII e EqtxII em pH neutro;
- Propor que em solução ácida a α -hélice C-terminal estudada se torna parcialmente desenovelada para a StnII e que essa mudança conformacional pode ser revertida em pH neutro. Por outro lado, para a EqtxII, embora, essa região tenha demonstrado uma maior variação de conteúdo estrutural em solução ácida, tal alteração não se estabiliza ao longo do tempo amostrado. Considerando a importância dessa região para o sítio de ligação à fosfocolina e seu papel no reconhecimento de fosfolipídeos de membrana, as transições conformacionais observadas podem sugerir implicações no mecanismo de ação desta classe de toxinas, uma vez que, as condições simuladas podem estar mimetizando características encontradas na superfície de membranas.
- De acordo com informações prévias da literatura, observamos que a StnII não sofre mudanças significativas no seu conteúdo de estrutura secundária na presença de altas concentrações de ureia. Em contrapartida, sua perda de atividade nestas condições parece estar relacionada a efeitos de solvatação que impedem sua interação com a superfície de membranas. Além disso, promove à redução de sua flexibilidade e possivelmente impossibilita a conversão do estado solúvel para inserido em membrana.

6. Glossário¹

Arquivo PDB: um arquivo PDB (do inglês *Protein Data Bank*, Banco de Dados de Proteínas) é um arquivo ASCII (do inglês American Symbolic Code for Information Interexchange = text, Código Simbólico Americano para Troca de Informação) usado para armazenar as coordenadas atômicas de uma molécula, geralmente uma proteína ou ácido nucleico (*veja PDB*).

Docking: cálculos de *docking* envolvem a predição da orientação de um ligante dentro do sítio ativo de uma proteína ou receptor-alvo.

Diedros próprio e impróprio: Ao contrário do diedro próprio, no qual 4 átomos estão conectados em uma seqüência linear permitindo a rotação ao redor de um eixo, no diedro impróprio os átomos estão conectados de forma a impedir que átomos modifiquem sua orientação no espaço, e.g. grupos planares se mantenham planares e centros quirais não invertam sua quiralidade.

Campo de Força: é um conjunto de funções e parametrizações usadas em cálculos de mecânica molecular. Estas funções definem as energias de estiramento de ligação e de distorção de ângulo de ligação (tanto de valência quanto diedro) de uma molécula, quando comparadas com a sua conformação não tensionada (aquela caracterizada pelos valores padrões de comprimentos e de ângulos de ligação). Alguns campos de força podem conter termos de interação entre átomos não ligados, de efeitos eletrostáticos, de ligação de hidrogênio e de outros efeitos estruturais.

Dinâmica Molecular: é um procedimento de simulação que consiste na computação do movimento dos átomos em uma molécula ou de átomos individuais ou moléculas em sólidos, líquidos e gases, de acordo com as leis de movimento de Newton. As forças que agem nos átomos, necessárias para simular seus movimentos, são calculadas usando campos de força de mecânica molecular.

Mecânica Molecular: é o cálculo das características geométricas e de energia de entidades moleculares baseado em funções de potencial empíricas, cuja forma é tomada da mecânica clássica. O método pressupõe que as funções de potencial possam ser transferidas dentro de um conjunto de moléculas semelhantes. Uma

¹Definições obtidas de Leach, 2001, de Sant'Anna, 2002, van der Spoel *et al.*, 2002, Verli, Tese de doutorado, 2005

suposição é feita sobre os comprimentos e ângulos “naturais” de ligação, cujos desvios resultam em tensão de ligação e tensão angular, respectivamente. As forças de Van der Waals e eletrostáticas também são levadas em conta.

Minimização de Energia: é um procedimento matemático para localizar as conformações estáveis (mínimos de energia) de uma molécula, determinadas por cálculos de mecânica molecular ou mecânico-quânticos.

Protein Data Bank (PDB): é um banco de dados de proteínas mantido no Laboratório Nacional Brookhaven, Upton, New York, que contém estruturas de raios-X de dezenas de milhares de proteínas.

Receptor: é uma proteína ou um complexo de proteínas localizado no interior ou na superfície de uma célula, que reconhece especificamente e interage com um composto que atua como um mensageiro molecular (neurotransmissor, hormônio, fármaco, etc). Em um sentido mais amplo, o termo receptor é freqüentemente usado como sinônimo para qualquer sítio específico de ligação de fármacos (em oposição a não específico, como a ligação às proteínas do plasma), também incluindo ácidos nucleicos, tais como o DNA.

Topologia Molecular: Topologia molecular é a descrição do modo pelo qual os átomos estão ligados em uma molécula. Em diversos programas de dinâmica molecular constitui-se em um arquivo que descreve em quais átomos ou combinações de átomos as diversas contribuições de um campo de força irão atuar. Apresenta atributos constantes para cada átomo, como quais átomos existem em uma molécula, as características destes átomos (e.g. um oxigênio carbonílico é diferente de um oxigênio em um grupamento éter ou hidroxila), como cargas atômicas, termos ligados e não-ligados.

7. Referências Bibliográficas

Referências citadas no texto e no manuscrito

- Alegro-cebollada, J.; Lacadena, V.; Oñaderra, M.; Mancheño, J., M.; Gavilanes, J. G.; del Pozo, A., M.: Phenotypic selection and characterization of randomly produced non-haemolytic mutants of the toxic sea anemone protein sticholysin II. *FEBS Lett.*, **2004**, *575*, 14-18.
- Alouf, J. E.: Pore-forming bacterial toxins: an overview. Em: van der Goot, F.G. (Ed.), *Pore-Forming Toxins*, Springer, **2001**, Heidelberg, Germany, 1–14.
- Álvarez, C.; Lanio, M., E.; Tejuca, M.; Martínez, D.; Pazos, F.; Campos, A. M.; Encinas, M. V.; Pretiñes, T.; Schreier, S.; Lissi, E. A.: The role of ionic strength on the enhancement of the hemolytic activity of sticholysin I, a cytolysin from *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon*, **1998**, *36*, 165-178.
- Álvarez, C.; Pazos, I. F.; Lanio, M.E.; Martínez, D.; Schreier, S.; Casallanovo, F.; Camos, A. M.; Lissi, E.: Effect of pH on the conformation, interaction with membranes and hemolytic activity of sticholysin II, a pore forming cytolysin from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon*, **2001**, *39*, 539-553.
- Álvarez, C.; Mancheño, J. M.; Martínez, D.; Tejuca, M.; Pazos, F.; Lanio, M., E.: Sticholysins, two pore-forming toxins produced by the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*: Their interaction with membranes. *Toxicon*, **2009**, *54*, 1135-1147.
- Anderluh G.; Pungercar, J.; Krizaj, I.; Strukelj, B.; Gubensek, F.; Maček, P.: N-truncation mutagenesis of equinatoxin II, a pore-forming protein from the sea anemone *Actinia equina*. *Protein. Eng.*, **1997**, *10*, 751-755.
- Anderluh, G.; Barlic, A.; Podlesek, Z.; Maček, P.; Pungercar, J.; Gubensek, F.; Zecchini, M. L.; Dalla Serra, M.; Menestrina, G.: Cysteine-scanning mutagenesis of an eukaryotic pore-forming toxin from sea anemone. *Eur. J. Biochem.*, **1999**, *263*, 128-136.
- Anderluh, G.; Maček, P.: Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). *Toxicon*, **2002**, *40*, 111-124.
- Anderluh, G.; Razpotnik, A.; Podlesek, Z.; Maček, P.; Separovic, F.; Norton, R. S.: Interaction of the eukaryotic pore-forming cytolysin equinatoxin II with model membranes: ¹⁹F NMR studies. *J. Mol. Biol.*, **2005**, *347*, 27-39.

- Andersen, H. C.: RATTLE: A Velocity Version of the SHAKE Algorithm for Molecular Dynamics Calculations. *J. Comput. Phys.* **1983**, *52*, 24-34.
- Andrec, M.; Snyder, D. A.; Zhou, Z.; Young, J.; Montelione, G. T.; Levy, R. M.: A large data set comparison of protein structures determined by crystallography and NMR: Statistical test for structural differences and the effect of crystal packing. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics.* **2007**, 449-465.
- Athanasiadis, A.; Anderluh, G.; Maček, P.; Turk, D.: Crystal structure of the soluble form of Equinatoxin II, a pore-forming toxin from the sea anemone *Actinia equina*. *Structure*, **2001**, *9*, 341-346.
- Balali-Mood, K.; Bond, P. J.; Sansom, M. S. P.: Interaction of Monotopic Membrane Enzymes with a Lipid Bilayer: A Coarse-Grained MD Simulation Study. *Biochemistry* **2009**, *48*, 2135-2145.
- Becker, C. F.; Guimarães, J. A.; Verli, H.: Molecular dynamics and atomic charge calculations in the study of heparin conformation in aqueous solution. *Carbohydr. Res.*, **2005**, *340*, 1499-1507.
- Belmonte, G.; Pederzoli, C.; Macek, P.; Menestrina, G.: Pore formation by the sea anemone cytolysin equinatoxin II in red blood cells and model lipid membranes. *J. Membr. Biol.* **1993**, *131*, 11-22.
- 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.; Reidel: Dordrecht, The Netherlands, **1981**; pp 331–342.
- Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; DiNola, A.; Haak, J. R.: Molecular-dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.*, **1984**, *81*, 3684-3690.
- Berendsen, H. J. C.; Grigera, J. R.; Straatsma, T. P.: The missing term in effective pair potentials. *J. Phys. Chem.*, **1987**, *91*, 6269-6271.
- Berendsen, H. J. C.; van der Spoel, D.; van Drunen, R.: GROMACS – a message-passing parallel molecular-dynamics implementation. *Comput. Phys. Commun.*, **1995**, *91*, 43-56.
- Bychkova, V. E.; Dujsekina, A. E.; Klenin, S. I.; Tiktopulo, E. I.; Uversky, V. N.; Ptitsyn, O. B.: Molten globule-like state of cytochrome c under conditions simulating those near the membrane surface. *Biochemistry*, **1996**, *35*, 6058-6063.
- Casallanovo, F., de Oliveira, F. J. F., de Souza, F. C., Ros, U., Martínez, Y., Penton, D., Tejuca, M., Martínez, D., Pazos, F., Pertinhez, T. A., Spisni, A., Cilli, E. M.,

- Lanio, M. E., Álvarez, C., Schreier, S., Model peptides mimic the structure and function of the N-terminus of the pore-forming toxin sticholysin II. *Biopolymers*, **2006**, *84*, 169-180.
- Case, D. A.; Cheatham, T. E. 3rd; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Merz, K. M. Jr.; Onufriev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods, R. J.: The Amber Biomolecular Simulation Programs. *J. Comput. Chem.*, **2005**, *26*, 1668-1688.
- Cilli, E. M.; Pigossi, F. T.; Crusca, E. J.; Ros, U.; Martínez, D.; Lanio, M. E.; Álvarez, C.; Schreier, S.: Correlations between differences in amino-terminal sequences and different hemolytic activity of Sticholysins. *Toxicon*, **2007**, *50*, 1201-1204.
- 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.
- de Groot, B. L.; Grubmüller, H.: Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF. *Science*, **2001**, *294*, 2353-2357.
- Delano, W. L.: The Pymol Molecular Graphics System, Delano Scientific, Sao Carlos, CA, USA, **2002**. <http://www.pymol.org>.
- de Sant'Anna, C. M. R.: Glossário de termos usados no planejamento de fármacos (recomendações IUPAC 1997). *Quim. Nova*, **2002**, *25*, 505-512.
- Drechsler, A.; Potrich, C.; Sabo, J. K.; Frisanco, M.; Guella, G.; Dalla Serra, M.; Anderluh, G.; Separovic, F.; Norton, R. S.: Structure and activity of the N-terminal region of the eukaryotic cytolytic equinatoxin II. *Biochemistry*, **2006**, *45*, 1818-1828.
- Fernandes, C. L., Sachett, L. G., Pol-Fachin, L. & Verli, H.: GROMOS96 43a1 performance in predicting oligosaccharides conformational ensemble within glycoproteins *Carbohydr. Res.*, **2010**, *345*, 663-671.
- Giesel, G.M.; Faber-Barata, J.; Guimarães, J. A.; Verli, H.: Characterization of the papillomavirus alpha(1)E2 peptide unfolded to folded transition upon DNA binding. *FEBS Lett*, **2008**, *582*, 3619-3624.
- Gouaux, E.: Channel-forming toxins: tales of transformation. *Nature Struct. Biol.*, **1997**, *7*, 566–573.
- Guex, N.; Peitsch. M. C.: Swiss-Model and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, **1997**, *18*, 2714-2723. <http://www.expasy.org/spdbv>.

- 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*, 1463-1472.
- Hinds, M. G.; Zhang, W.; Anderluh, G.; Hansen P. E.; Norton, R. G.: Solution structure of the eukaryotic pore-forming cytolysin Equinatoxin II: Implications for Pore formation. *J. Mol. Biol.*, **2002**, *315*, 1219-1229.
- Hirst, J. D.; Brooks III, C. L.: Helicity, circular dichroism and molecular dynamics of proteins. *J. Mol. Biol.*, **1994**, *243*, 173-178.
- Hong, Q.; Gutierrez-Aguirre, I.; Barlic, A.; Malovrh, P.; Kristan, K.; Podlesek, Z.; Maček, P.; Turk, D.; González-Mañas, J. M.; Lakey, J. H.; Anderluh, G.: Two-step membrane binding by equinatoxin II, a pore-forming toxin from the sea anemone, involves an exposed aromatic cluster and a flexible helix. *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277*, 41916-41924.
- Hoover, W. G.: Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. *Phys. Rev. A*. **1985**, *31*, 1695-1697.
- Huerta, V.; Morera, V.; Guanche, Y.; Chinea, G.; Gonzalez, L. J.; Betancourt, L.; Martínez, D.; Álvarez, C.; Lanio, M. E.; Besada, V.: Primary structure of two cytolysin isoforms from *Stichodactyla helianthus* differing in their hemolytic activity. *Toxicon*, **2001**, *39*, 1253-1256.
- Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K.: VMD – Visual Molecular Dynamics. *J. Molec. Graphics*, **1996**, *14*, 33-38. <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>.
- IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. Abbreviations and symbols for description of conformation of polypeptides chains. *J. Mol. Biol.*, **1970**, *52*, 1-17.
- Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impy, R. W.; Klein, M. L.: Comparison of simple potential functions for simulating liquid water . *J. Chem. Phys.*, **1983**, *79*, 926-935.
- Jorgensen, W. L.; Tirado-Rives, J.: The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 1657-1666.
- Kabsch, W.; Sander, C.: Dictionary of protein secondary structure: pattern-recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, **1983**, *22*, 2577-2637.

- Koradi, R.; Billeter, M.; Wüthrich, K.: MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graphics*, **1996**, *14*, 51-55.
- Kristan, K.; Podlesek, Z.; Hojnik, V.; Gutiérrez-Aguirre, I.; Gunčar, G.; Turk, D.; González-Mañas, J. M.; Lakey, J. H.; Maček, P.: Pore formation by equinatoxin, a eukaryotic pore-forming toxin, requires a flexible N-terminal region and a stable β -sandwich. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 46509-46517.
- Kristan C. K.; Viero G; Dalla Serra M; Maček P; Anderluh G.: Molecular mechanism of pore formation by actinoporins. *Toxicon*, **2009**, *54*, 1125-1134.
- Kukul, A.: Lipid Models for United-Atom Molecular Dynamics Simulations of Proteins. *J. Chem. Theory. Comput.*, **2009**, *5*, 615-626.
- Lam Y. H.; Hung, A.; Norton, R.S.; Separovic, F.; Watts, A.: Solid-state NMR and simulation studies of equinatoxin II N-terminus interaction with lipid bilayers. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, **2009**, *78*, 858-872.
- Lanio, M. E.; Morera, V.; Álvarez, C.; Tejuca, M.; Gómez, T.; Pazos, F.; Besada, V.; Martínez, D.; Huerta, V.; Padrón, G.; Cháves, M. A.: Purification and characterization of two hemolysins from *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon*, **2001**, *39*, 187-194.
- Laskowski, R. A.; MacArthur, M. W.; Moss, D. S.; Thornton, J. M.: PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, **1993**, *26*, 283-291.
- Leach, A. R.: *Molecular Modelling Principles and Applications*, 2nd Ed., **2001**, Longman, Cingapura.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M., *Principles of Biochemistry*, 2nd Ed., **1992**, Worth Publishers, New York.
- MacKerell, A. D. Jr.; Bashford, D.; Bellott, M.; Dunbrack, R. L. Jr.; Evanseck, J. D.; Field, M. J.; Fischer, S.; Gao, J.; Guo, H.; Ha, S.; Joseph-McCarthy, D.; Kuchnir, L.; Kuczera, K.; Lau, F. T. K.; Mattos, C.; Michnick, S.; Ngo, T.; Nguyen, D. T.; Prodhom, B.; Reiher, W. E. 3rd; 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*, 3586-3616.
- Malavasic, M.; Poklar, N.; Macek, P.; Vesnaver, G.: Fluorescence studies of the effect of pH, guanidine hydrochloride and urea on equinatoxin II conformation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1996**, *1280*, 65-72.

- Mancheño, J. M.; De Los Ríos, V.; Martínez, A. D.; Lanio, M. E.; Oñaderra, M., Gavilanes; J. G.: Partially folded states of the cytolytic protein Sticholysin II. *Biochim. Biophys. Acta.*, **2001**, *545*, 122-131.
- Mancheño, J. M.; Martin-Benito, J.; Martínez-Ripoll, M.; Gavilanes, J. G.; Hermanoso, J. A.: Crystal and electron microscopy structures of Sticholysin II actinoporin reveal insights into the mechanism of membrane pore formation. *Structure*, **2003**, *11*, 1319-1328.
- Martín-Pastor, M.; Espinosa, J. F.; Asensio, J. L.; Jiménez-Barbero, J.: A comparison of the geometry and of the energy results obtained by application of different molecular mechanics force fields to methyl α -lactoside and the C-analogue of lactose. *Carbohydr. Res.*, **1997**, *298*, 15-49.
- Martínez, D.; Campos, A. M.; Pazos, F.; Álvarez, C.; Lanio, M. E.; Casallanovo, F.; Schreier, S.; Salinas R. K.; Vergara, C.; Lissi, E.: Properties of St I and St II, two isotoxins isolated from *Stichodactyla helianthus*: a comparison. *Toxicon*, **2001**, *39*, 1547 - 1560.
- Miles, A. J.; Drechsler, A.; Kristan, K.; Anderluh, G.; Norton, R. S., Wallace, B. A.; Separovic F.: The effects of lipids on the structure of the eukaryotic cytolytic toxin equinatoxin II: a synchrotron radiation circular dichroism spectroscopic study. *Biochim. Biophys. Acta.*, **2008**, *1778*, 2091-2096.
- Monticelli, L., Kandasamy, S. K., Periole, X., Larson, R. G., Tieleman, D. P., Marrink, S.: The MARTINI Coarse-Grained Force Field: Extension to Proteins. *J. Chem. Theory. Comput.* **2008**, *4*, 819–834
- Moore, J.: An Introduction to the invertebrates, 1nd Ed., **2003**, Cambridge University Press, Cambridge.
- Namba, A. M.; da Silva, V. B.; da Silva, C. H. T. P.: Dinâmica molecular e aplicações em planejamento de fármacos. *Ecl. Quím.* **2008**, *4*, 13-24.
- Norton, R. S.: Structures of sea anemones toxins. *Toxicon*, **2009**, *54*, 1075-1088.
- Nosé, S.: A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble . *Mol. Phys.* **1984**, *52*, 255-268.
- Parker, M. W.: Cryptic clues as to how water-soluble protein toxins form pores in membranes, *Toxicon*, **2003**, *42*, 1–6.
- Parker, M. W.; Feil, S. C.: Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **2005**, *88*, 91-142.

- Parrinello, M.; Rahaman, A.: Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J. Appl. Phys.* **1981**, *52*, 7182-7190.
- Pazos, F., Valle, A.; Martínez, D.; Ramírez, A.; Calderón, L.; Pupo, A.; Tejuca, M.; Morera, V.; Campos, J.; Fando, R.; Dyszy, F.; Schreier, S.; Horjales, E.; Álvarez, C.; Lanio, M. E.; Lissi, E.: Structural and functional characterization of a recombinant Sticholysin I (rSt I) from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon*, **2006**, *48*, 1083-1094.
- Poklar, N.; Lah, Jurij; Salobir, M.; Maček, P.; Vesnaver, G.: pH and temperature-induced molten globule-like denatured states of equinatoxin II: a study by UV-melting, DSC, Far- and Near-UV CD spectroscopy, and ANS fluorescence. *Biochemistry*, **1997**, *36*, 14345-14352.
- Pol-Fachin, L.; Verli, H.: Depiction of the forces participating in the 2-O-sulfo- α -L-iduronic acid conformational preference in heparin sequences in aqueous solutions. *Carbohydr. Res.*, **2008**, *343*, 1435-1445.
- Pol-Fachin, L.; Fernandes C., L.; Verli H.: GROMOS96 43a1 performance on the characterization of glycoprotein conformational ensembles through molecular dynamics simulations. *Carbohydr. Res.*, **2009**, *344*, 491-500.
- Rocco, A. G.; Mollica, L.; Ricchiuto, P.; Baptista A. M.; Gianazza, E.; Eberini, I.: Characterization of the Protein Unfolding Processes Induced by Urea and Temperature. *Biophys. J.*, **2008**, *94*, 2241–2251.
- Ruppert, E. E.; Barnes, R. D.: *Invertebrate Zoology*, 6nd Ed., **1994**, Saunders College Publishing, Philadelphia.
- Ryckaert, J. P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J. C.: Numerical Integration of the Cartesian equations of motion of a system with constraints: Molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comp. Phys.*, **1977**, *23*, 327-341.
- Schaftenaar, G.: MOLDEN, CAOS/CAMM Center, University of Nijmegen, Toernooiveld 1, 6525 ED NIJMEGEN, The Netherlands, **1997**.
- Scott, W. R. P.; Hünenberger, P. H.; Tironi, I. G.; Mark, A. E.; Billeter, S. R.; Fennenn, J.; Torda, A. E.; Huber, T.; Krüger, P.; van Gunsteren, W. F.: The GROMOS biomolecular simulation program package. *J. Phys. Chem. A*, **1999**, *103*, 3596-3607.
- SigmaPlot Exact Graphs and Data Analysis. Systat Software Inc., **2009**.
- Sui, S.: Membrane-induced conformational changes of proteins. *Adv. Colloid. Interface Sci.*, **2000**, *85*, 257-267.

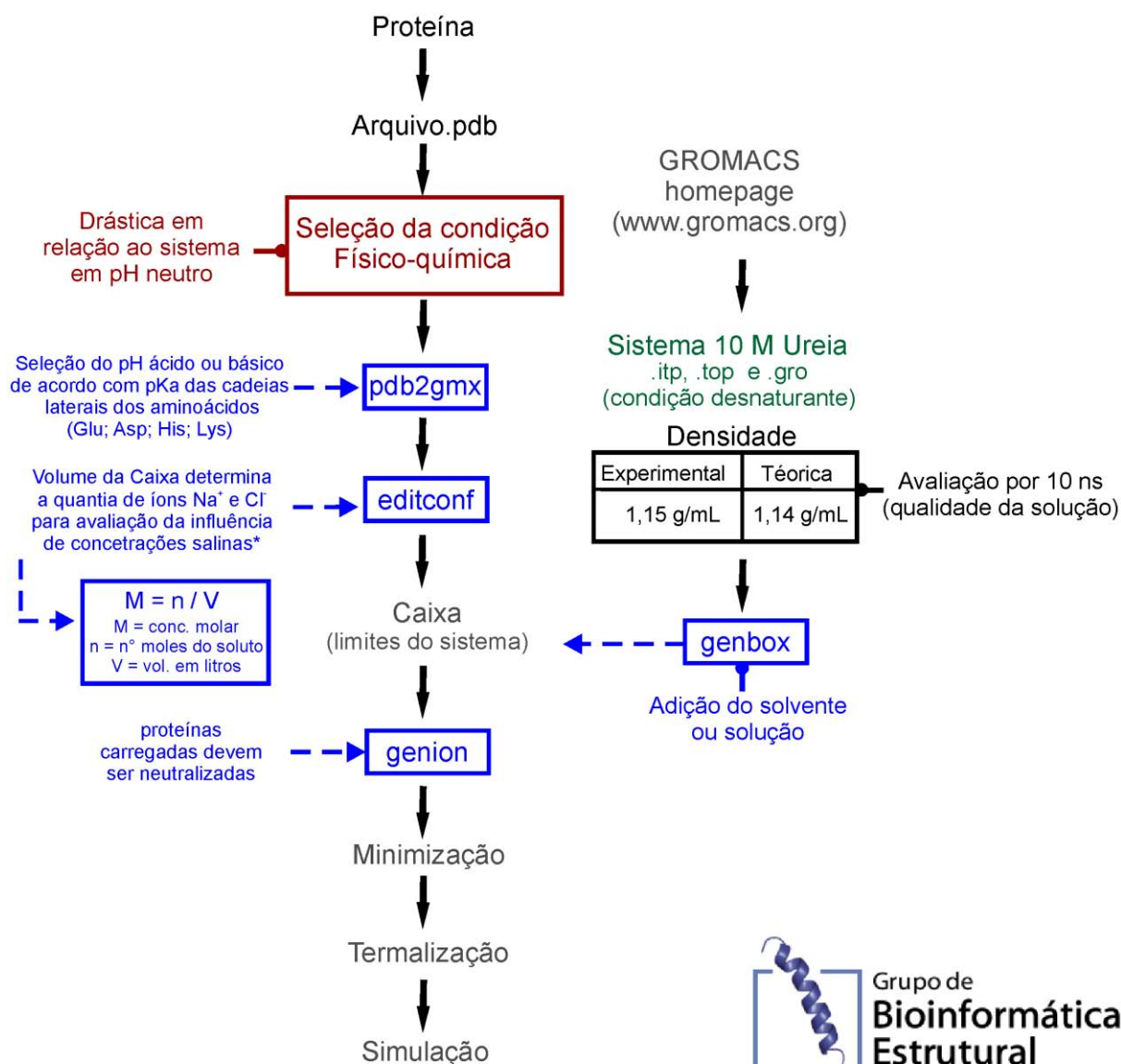
- Tejuca, M.; Anderluh, G.; Dalla Serra, M.: Sea anemone cytolytins as toxic components of immunotoxins. *Toxicon*, **2009**, *54*, 1206-1214.
- Terra, R. M. S.; Guimarães, J. A.; Verli, H.: Structural and functional behavior of biologically active monomeric melittin. *J. Mol. Graph. Model.*, **2007**, *25*, 767-727.
- Ulrich, P. N.; Anderluh, G.; Maček, P.; Chalikian, T. V.: Salt-induced oligomerization of partially folded intermediates of equinatoxin II. *Biochemistry*, **2004**, *43*, 9536-9545.
- van der Goot, F. G.; Gonzales-Manas, J. M.; Lakey, J. H.; Pattus, F. A.: 'molten-globule' membrane-insertion intermediate of the pore-forming domain of colicin A. *Nature*, **1991**, *354*, 408-410.
- van der Spoel, D.; van Buuren, A. R.; Apol, E.; Meulenhoff, P. J.; Tieleman, D. P.; Sijbers, A. L. T. M.; Hess, B.; Feenstra, K. A.; Lindahl, E.; van Drunen, R.; Berendsen, H. J. C.: **2002**. GROMACS user manual version 3.1.1, Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen, The Netherlands.
- van der Spoel, D.; Lindahl, E.; Hess, B.; Groenhof, G.; Mark, A. E.; Berendsen, H. J. C.: GROMACS: fast, flexible and free. *J. Comput. Chem.*, **2005**, *26*, 1701-1718.
- van Gunsteren, W. F.; Berendsen, H. J. C.: Algorithms for macromolecular dynamics and constraint dynamics. *Mol. Phys.*, **1977**, *34*, 1311-1327.
- van Gunsteren, W. F.; Berendsen, H. J. C.: Computer simulations of molecular dynamics: methodology, applications, and perspectives in chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1990**, *29*, 992-1023.
- van Gunsteren, W. F.; Billeter, S. R.; Eising, A. A.; Hünenberger, P. H.; Krueger, P.; Mark, A. E.; Scott, W. R. P.; Tironi, I. G.: Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide. Vdf Hochschulverlag AG, Zurich, Suíça, **1996**.
- van Gunsteren, W. F.; Bakowies, D.; Baron, R.; Chandrasekhar, I.; Christen, M.; Daura, X.; Gee, P.; Geerke, D. P.; Glättli, A.; Hünenberger, P. H.; Kastenholz, M. A.; Oostenbrink, C.; Schenk, M.; Trzesniak, D.; van der Vegt, N. F. A.; Yu, H. B.: Biomolecular Modeling: Goals, Problems, Perspectives. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 4064-4092.
- Verli, H.; Guimarães, J. A.: Molecular dynamics simulation of a decasaccharide fragment of heparin in aqueous solution. *Carbohydr. Res.*, **2004**, *339*, 281-290.
- Verli, H.; Guimarães, J. A.: Molecular dynamics investigation of heparin recognition by antithrombin. *J. Mol. Graph.*, **2005**, *24*, 203-212.

- Verli, H.: Interação Heparina-Antitrombina: Reconhecimento Molecular Caracterizado por Ferramentas de Modelagem Molecular. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, UFRGS. Tese de doutorado, **2005**.
- Verli, H.; Calazans, A.; Brindeiro, R.; Tanuri, A.; Guimarães, J. A.: Molecular dynamics analysis of HIV-1 matrix protein: Clarifying differences between crystallographic and solution structures. *J. Mol. Graph. Model.*, **2007**, 26, 62-68.
- Verli, H.: Disciplina de modelagem molecular de compostos bioativos, aula de Métodos de mecânica molecular, **2010**. Disponível em: http://www.cbiot.ufrgs.br/bioinfo/?module=disc_modmol&lang=pt.
- Yang, L.; Harroun, T. A.; Weiss, T. M.; Ding, L.; Huang, H. W.: Barrel-Stave Model or Toroidal Model? A Case Study on Melittin Pores. *Biophys. J.*, **2001**, 81, 1475-1485.

8. Anexos

8.1 Fluxograma da abordagem utilizada para a realização deste trabalho

Tutorial GROMACS - Simulação de Proteína em Diferentes Condições Físico-Químicas



*O cálculo da quantidade de íons (n) considera o número de Avogrado (1 mol = $6,02 \times 10^{23}$), e não considera os íons que devem ser usados para a neutralização da carga da proteína.

8.2 Arquivos para a simulação por DM em solução de ureia 10,0 M

São arquivos de entrada, que contém os parâmetros necessários para realizar as simulações por DM, isto é, são arquivos que definem os parâmetros para a trajetória da simulação (.mdp), arquivos que definem a topologia para o sistema molecular em estudo (.itp ou .top) e arquivos de coordenadas atômicas (.gro) que juntos listam os parâmetros que controlarão o sistema molecular. Dentre outros, informam como a integração deve ser realizada, por quantos passos, qual a temperatura e a pressão, o tempo total da simulação, etapa a ser simulada ou as características e coordenadas das moléculas utilizadas (e.g. ureia - $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$).

Arquivo.mdp - Utilizado na minimização de energia do sistema solução de ureia 10,0 M:

```
;      Input file
;
title           =  Yo
cpp             =  /lib/cpp
define          =  -DFLEX_SPC
constraints     =  none
integrator      =  steep
tinit          =  0.0
nsteps         =  10000
nstcomm        =  1
nstxout        =  250
nstvout        =  1000
nstfout        =  0
nstlog         =  100
nstenergy      =  100
nstlist        =  10
ns_type        =  grid
coulombtype    =  PME
rlist          =  0.9
rcoulomb       =  0.9
rvdw           =  0.9
fourierspacing =  0.12
optimize_fft   =  yes
pme_order      =  4
ewald_rtol     =  1e-5
; Berendsen temperature coupling is on in four groups
Tcoupl        =  No
; Isotropic pressure coupling is now on
Pcoupl        =  No
compressibility =  4.5e-5
ref_p         =  1.0
; Generate velocities is off at 100 K.
gen_vel       =  no
```

Arquivo.mdp - Utilizado na termalização de 0-50 K do sistema solução de ureia 10,0 M:

```
;      Input file
;
title           =  Yo
cpp             =  /lib/cpp
define          =  -DFLEX_SPC
constraints     =  all-bonds
integrator      =  md
tinit          =  0.0
dt             =  0.002 ; ps !
nsteps         =  500   ; total 1 ps.
nstcomm        =  1
nstxout        =  250
nstvout        =  1000
nstfout        =  0
nstlog         =  100
nstenergy      =  100
nstlist        =  10
ns_type        =  grid
coulombtype    =  PME
rlist          =  0.9
rcoulomb       =  0.9
rvdw           =  0.9
fourierspacing =  0.12
optimize_fft   =  yes
pme_order      =  4
ewald_rtol     =  1e-5
; Berendsen temperature coupling is on in four groups
Tcoupl        =  berendsen
tc-grps       =  Urea SOL
tau_t         =  0.1 0.1
ref_t         =  50 50
; Energy monitoring
energygrps    =  Urea SOL
; Isotropic pressure coupling is now on
Pcoupl        =  berendsen
Pcoupltype    =  isotropic
tau_p         =  0.5
compressibility =  4.5e-5
ref_p         =  1.0
; Generate velocities is off at 100 K.
gen_vel       =  yes
gen_temp      =  50.0
gen_seed      =  173529
```

Arquivo.mdp - Utilizado na termalização de 50-100 K do sistema solução de ureia 10,0 M:

```
;      Input file
;
title           =  Yo
cpp             =  /lib/cpp
define         =  -DFLEX_SPC
constraints     =  all-bonds
integrator     =  md
tinit         =  10.0
dt             =  0.002 ; ps !
nsteps        =  2500 ; total 5 ps.
nstcomm       =  1
nstxout       =  100
nstvout       =  100
nstfout       =  0
nstlog        =  100
nstenergy     =  100
nstlist       =  10
ns_type       =  grid
coulombtype   =  PME
rlist         =  0.9
rcoulomb      =  0.9
rvdw          =  0.9
fourierspacing =  0.12
optimize_fft  =  yes
pme_order     =  4
ewald_rtol    =  1e-5
; Berendsen temperature coupling is on in four groups
Tcoupl       =  berendsen
tc-grps      =  Urea SOL
tau_t        =  0.1 0.1
ref_t        =  100 100
; Energy monitoring
energygrps   =  Urea SOL
; Isotropic pressure coupling is now on
Pcoupl       =  berendsen
Pcoupltype   =  isotropic
tau_p        =  0.5
compressibility =  4.5e-5
ref_p        =  1.0
; Generate velocities is off at 100 K.
gen_vel      =  yes
gen_temp     =  100.0
gen_seed     =  173529
```

Arquivo.mdp - Utilizado na termalização de 100-150 K do sistema solução de ureia 10,0 M:

```
;      Input file
;
title           =  Yo
cpp             =  /lib/cpp
define          =  -DFLEX_SPC
constraints     =  all-bonds
integrator      =  md
tinit          =  15.0
dt             =  0.002 ; ps !
nsteps         =  2500 ; total 5 ps.
nstcomm        =  1
nstxout        =  100
nstvout        =  100
nstfout        =  0
nstlog         =  100
nstenergy      =  100
nstlist        =  10
ns_type        =  grid
coulombtype    =  PME
rlist          =  0.9
rcoulomb       =  0.9
rvdw           =  0.9
fourierspacing =  0.12
optimize_fft   =  yes
pme_order      =  4
ewald_rtol     =  1e-5
; Berendsen temperature coupling is on in four groups
Tcoupl        =  berendsen
tc-grps       =  Urea SOL
tau_t         =  0.1 0.1
ref_t         =  150 150
; Energy monitoring
energygrps    =  Urea SOL
; Isotropic pressure coupling is now on
Pcoupl        =  berendsen
Pcoupltype    =  isotropic
tau_p         =  0.5
compressibility =  4.5e-5
ref_p         =  1.0
; Generate velocities is off at 100 K.
gen_vel       =  yes
gen_temp      =  150.0
gen_seed      =  173529
```

Arquivo.mdp - Utilizado na termalização de 150-200 K do sistema solução de ureia 10,0 M:

```
;      Input file
;
title           =  Yo
cpp             =  /lib/cpp
define         =  -DFLEX_SPC
constraints    =  all-bonds
integrator     =  md
tinit         =  20.0
dt            =  0.002 ; ps !
nsteps        =  2500 ; total 5 ps.
nstcomm       =  1
nstxout       =  100
nstvout       =  100
nstfout       =  0
nstlog        =  100
nstenergy     =  100
nstlist       =  10
ns_type       =  grid
coulombtype   =  PME
rlist         =  0.9
rcoulomb      =  0.9
rvdw          =  0.9
fourierspacing =  0.12
optimize_fft  =  yes
pme_order     =  4
ewald_rtol    =  1e-5
; Berendsen temperature coupling is on in four groups
Tcoupl        =  berendsen
tc-grps       =  Urea SOL
tau_t         =  0.1 0.1
ref_t         =  200 200
; Energy monitoring
energygrps    =  Urea SOL
; Isotropic pressure coupling is now on
Pcoupl        =  berendsen
Pcoupltype    =  isotropic
tau_p         =  0.5
compressibility =  4.5e-5
ref_p         =  1.0
; Generate velocities is off at 100 K.
gen_vel       =  yes
gen_temp      =  200.0
gen_seed      =  173529
```

Arquivo.mdp - Utilizado na termalização de 200-250 K do sistema solução de ureia 10,0 M:

```
;      Input file
;
title           =  Yo
cpp             =  /lib/cpp
define          =  -DFLEX_SPC
constraints     =  all-bonds
integrator      =  md
tinit          =  25.0
dt             =  0.002 ; ps !
nsteps         =  2500 ; total 5 ps.
nstcomm        =  1
nstxout        =  100
nstvout        =  100
nstfout        =  0
nstlog         =  100
nstenergy      =  100
nstlist        =  10
ns_type        =  grid
coulombtype    =  PME
rlist          =  0.9
rcoulomb       =  0.9
rvdw           =  0.9
fourierspacing =  0.12
optimize_fft   =  yes
pme_order      =  4
ewald_rtol     =  1e-5
; Berendsen temperature coupling is on in four groups
Tcoupl         =  berendsen
tc-grps        =  Urea SOL
tau_t          =  0.1 0.1
ref_t          =  250 250
; Energy monitoring
energygrps     =  Urea SOL
; Isotropic pressure coupling is now on
Pcoupl         =  berendsen
Pcoupltype     =  isotropic
tau_p          =  0.5
compressibility =  4.5e-5
ref_p          =  1.0
; Generate velocities is off at 100 K.
gen_vel        =  yes
gen_temp       =  250.0
gen_seed       =  173529
```


Arquivo.mdp - Utilizado na termalização de 250-300 K do sistema solução de ureia 10,0 M:

```
;      Input file
;
title           =  Yo
cpp             =  /lib/cpp
define          =  -DFLEX_SPC
constraints     =  all-bonds
integrator      =  md
tinit          =  30.0
dt             =  0.002 ; ps !
nsteps         =  2500 ; total 5 ps.
nstcomm        =  1
nstxout        =  100
nstvout        =  100
nstfout        =  0
nstlog         =  100
nstenergy      =  100
nstlist        =  10
ns_type        =  grid
coulombtype    =  PME
rlist          =  0.9
rcoulomb       =  0.9
rvdw           =  0.9
fourierspacing =  0.12
optimize_fft   =  yes
pme_order      =  4
ewald_rtol     =  1e-5
; Berendsen temperature coupling is on in four groups
Tcoupl        =  berendsen
tc-grps       =  Urea SOL
tau_t         =  0.1 0.1
ref_t         =  300 300
; Energy monitoring
energygrps    =  Urea SOL
; Isotropic pressure coupling is now on
Pcoupl        =  berendsen
Pcoupltype    =  isotropic
tau_p         =  0.5
compressibility =  4.5e-5
ref_p         =  1.0
; Generate velocities is off at 100 K.
gen_vel       =  yes
gen_temp      =  300.0
gen_seed      =  173529
```

Arquivo.mdp - Utilizado no 1º ns da simulação (310 K) do sistema solução de ureia 10,0 M:

```
; Input file
;
title           = Yo
cpp             = /lib/cpp
define          = -DFLEX_SPC
constraints     = all-bonds
integrator      = md
tinit          = 40.0
dt              = 0.002 ; ps !
nsteps         = 480000 ; total 40-1000 ps.
nstcomm        = 1
nstxout        = 250
nstvout        = 1000
nstfout        = 0
nstlog         = 100
nstenergy      = 100
nstlist        = 10
ns_type        = grid
coulombtype    = PME
rlist          = 0.9
rcoulomb       = 0.9
rvdw           = 0.9
fourierspacing = 0.12
optimize_fft   = yes
pme_order      = 4
ewald_rtol     = 1e-5
; Berendsen temperature coupling is on in four groups
Tcoupl         = berendsen
tc-grps        = Urea SOL
tau_t          = 0.1 0.1
ref_t          = 310 310
; Energy monitoring
energygrps     = Urea SOL
; Isotropic pressure coupling is now on
Pcoupl        = berendsen
Pcoupltype    = isotropic
tau_p          = 0.5
compressibility = 4.5e-5
ref_p          = 1.0
; Generate velocities is off at 100 K.
gen_vel       = no
gen_temp      = 310.0
gen_seed      = 173529
```

Arquivo.itp - Utilizado na simulação do sistema solução de ureia 10,0 M:

Este arquivo foi utilizado no trabalho "*Characterization of the Protein Unfolding Processes Induced by Urea and Temperature*". Realizado por Rocco e colaboradores (2008) e obtido por meio do Gromacs home page.

```

;[ atomtypes ]
;Ad new atom types
;name      at.num      mass      charge      ptype      c6      c12
OUREA      8      0.000      0.000      A      0.0023639      1.58987e-06
NUREA      7      0.000      0.000      A      0.00335276      3.95095e-06
CUREA      6      0.000      0.000      A      0.00488685      1.35895e-05

[ moleculetype ]
; name nrexcl
Urea      3      ; exclude up to 3rd neighbors (ie, 1-4 interactions)

[ atoms ]
; nr      type      resnr      residu      atom      cgnr      charge      mass
1      CUREA      1      UREA      C1      1      0.142      12.01100
2      OUREA      1      UREA      O2      1      -0.390      15.99940
3      NUREA      1      UREA      N3      2      -0.542      14.00670
4      H      1      UREA      H4      2      0.333      1.00800
5      H      1      UREA      H5      2      0.333      1.00800
6      NUREA      1      UREA      N6      3      -0.542      14.00670
7      H      1      UREA      H7      3      0.333      1.00800
8      H      1      UREA      H8      3      0.333      1.00800

[ bonds ]
; ai      aj      funct      bo      Kb
3      4      2      1.000000e-01      18.7e+06
3      5      2      1.000000e-01      18.7e+06
6      7      2      1.000000e-01      18.7e+06
6      8      2      1.000000e-01      18.7e+06
1      2      2      1.265000e-01      13.1e+06
1      3      2      1.350000e-01      10.3e+06
1      6      2      1.350000e-01      10.3e+06

[ pairs ]
; Put back the 1-4 interactions excluded by setting nrexcl=3.
; ai      aj      funct      c0      c1
2      4      1      0.000000e+00      0.000000e+00
2      5      1      0.000000e+00      0.000000e+00
2      7      1      0.000000e+00      0.000000e+00
2      8      1      0.000000e+00      0.000000e+00
3      7      1      0.000000e+00      0.000000e+00
3      8      1      0.000000e+00      0.000000e+00
4      6      1      0.000000e+00      0.000000e+00
5      6      1      0.000000e+00      0.000000e+00

```

```
[ angles ]
; ai    aj    ak    funct    Theta0    K
  1     3     4     2        1.200000e+02    3.9000e+02
  1     3     5     2        1.200000e+02    3.9000e+02
  4     3     5     2        1.200000e+02    4.4500e+02
  1     6     7     2        1.200000e+02    3.9000e+02
  1     6     8     2        1.200000e+02    3.9000e+02
  7     6     8     2        1.200000e+02    4.4500e+02
  2     1     3     2        1.214000e+02    6.9000e+02
  2     1     6     2        1.214000e+02    6.9000e+02
  3     1     6     2        1.172000e+02    6.3600e+02
```

```
[ dihedrals ]
; Improper dihedrals.
; ai    aj    ak    al    funct    Angle0    K
  1     3     6     2     2        0.00    0.0510
  3     4     5     1     2        0.00    0.0510
  6     7     8     1     2        0.00    0.0510
```

```
[ dihedrals ]
; Torsional (proper) dihedrals.
; ai    aj    ak    al    funct    Angle    K    M
  2     1     3     4     1        180.00    41.8    2
  2     1     6     7     1        180.00    41.8    2
```

9. Curriculum Vitae

I. Experiência didática:

Monitor da 2° Ed. do Curso de Férias, Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, 27 de julho a 7 de agosto, total de 50 horas-aula;

Monitor da 3° Ed. do Curso de Férias, Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, 18 a 29 de janeiro de 2010, total de 60 horas-aula.

II. Trabalhos científicos apresentados em congressos:

Fauth, E. V. F., Cilli, E. M. e Verli, H. 2008. Conformational Behavior of Three Important Fragments for Hemolytic Activity of Sticholysin II. *XXXVII Annual Meeting of SBBq and XI Congress of the PABMB Program and Index*, S-27. XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 17 a 20 de maio de 2008, Águas de Lindóia, SP, Brasil;

Fauth, E. V. F., Cilli, E. M. e Verli, H. 2008. Caracterização Estrutural da Toxina Peptídica Esticolisina II. *X Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular – Livro de resumos. X Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular*, 26 a 28 de novembro de 2008, Porto Alegre, RS, Brasil;

Fauth, E. V. F., Cilli, E. M. e Verli, H. 2009. Structural and Conformational Characterization of Sticholysin II. *XXXVIII Annual Meeting of SBBq*, N-67. *XXXVIII Annual Meeting of SBBq Program and Index*, 16 a 19 de maio de 2009, Águas de Lindóia, SP, Brasil;

Fauth, E. V. F., Cilli, E. M. e Verli, H. **2009.** Comportamento Conformacional das Actinoporinas StnII e EqtxII em Diferentes Condições Físico-químicas: Implicações Sobre as Diferença dos Dados de RMN e Cristalografia. *XI Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular* – Livro de resumos, pág. 34. *XI Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular*, 26 a 27 de novembro de 2009, Porto Alegre, RS, Brasil.