



PLANO DE TRABALHO NA UFMG:

A Doutora Leticia Valvassori Rodrigues é vinculada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Goiás, onde trabalha no projeto de pós-doutorado intitulado “Peptídeos antimicrobianos: ressonância magnética nuclear para o estudo da relação estrutura-função”, sob supervisão do Professor Luciano Morais Lião. O referido projeto é desenvolvido em parceria com o Prof. Jarbas Magalhães Resende, do Departamento de Química da UFMG (DQ-UFMG), sendo então proposta a execução de parte das atividades nesta última instituição.

O trabalho a ser desenvolvido no DQ-UFMG está associado à síntese de peptídeo antimicrobiano, bem como a estudos estruturais e da interação com membranas do mesmo. O peptídeo será sintetizado no Laboratório de Estrutura e Síntese de Peptídeos, que é o laboratório de número 246 do Departamento de Química da UFMG (DQ-UFMG). Esse laboratório conta com toda a infraestrutura necessária para a síntese e purificação do peptídeo, que será obtido pela estratégia Fmoc de síntese de peptídeos em fase sólida e purificado por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. A metodologia é similar à descrita em trabalho publicado recentemente pelo grupo de pesquisas da UFMG (Gusmão *et al.*, 2017).

As preferências conformacionais do peptídeo serão investigadas por espectroscopia de dicroísmo circular (CD), em espectropolarímetro Jasco J-815 acoplado a sistema de controle de temperatura Peltier Jasco PTC-423L, pertencente ao DQ-UFMG. Nesses experimentos, serão varridas as condições adequadas para a realização futura dos experimentos de RMN. Serão realizados experimentos de CD em solução aquosa e na presença de meios miméticos de membranas, como micelas de dodecilsfosfolina (DPC) ou dodecilsulfato de sódio (SDS) e também na presença de vesículas fosfolipídicas de POPC ou POPC:POPG (3:1 mol:mol). A metodologia é similar à descrita em trabalho publicado pelo grupo de pesquisas da UFMG (Gusmão *et al.*, 2017).

Uma vez determinadas, por espectroscopia de CD, as condições adequadas para a realização dos experimentos de RMN, os mesmos serão realizados no Espectrômetro



Bruker Avance III 500, pertencente à UFG, com o peptídeo sintetizado na UFMG. Serão realizados experimentos de DQF-COSY, TOCSY, NOESY, ^1H - ^{13}C HSQC e ^1H - ^{15}N HSQC. Esses experimentos serão realizados pelo Prof. Luciano Morais Lião e os dados serão enviados eletronicamente à pós-doutoranda para a análise na UFMG.

Paralelamente à realização dessas atividades, a pesquisadora irá receber treinamento relativo à determinação de estrutura tridimensional de peptídeos, utilizando-se de resultados da espectroscopia de RMN. Nesse treinamento, serão utilizados dados previamente obtidos para o peptídeo filoseptina-2 (PS-2), que já foram publicados pelo grupo de pesquisa da UFMG (Resende *et al.*, 2008). O objetivo é que, após a realização desse treinamento, a pós-doutoranda seja capaz de realizar todas as análises análogas com os dados de RMN do peptídeo por ela sintetizado. Serão ofertados treinamentos em softwares de processamento e análise de dados de RMN, bem como em softwares próprios para o cálculo e análise das estruturas tridimensionais baseadas nos dados experimentais de Ressonância Magnética Nuclear.

Softwares como o NMRPipe (Delaglio *et al.*, 1995) serão usados para o processamento dos dados, enquanto que softwares como o NMRView (Johnson & Blevins, 1994) serão utilizados para a assinalamento dos espectros. Os sinais assinalados nos experimentos de NOESY terão suas intensidades convertidas em restrições de distâncias semi-quantitativas, que serão então empregadas nos cálculos das estruturas tridimensionais dos peptídeos. Constantes de acoplamento escalar entre núcleos serão também convertidas em restrições de geometria a serem empregadas nos cálculos das estruturas 3D. Essas constantes de acoplamento podem ser obtidas de forma acurada a partir dos experimentos de DQF-COSY. Eventualmente, restrições extras dos ângulos de torção ϕ e ψ serão geradas a partir dos valores de deslocamentos químicos, utilizando-se programa TALOS+ (Shen *et al.*, 2009), o que irá contribuir para a geração de estruturas tridimensionais com maiores resoluções. As estruturas serão então geradas por rotinas de *annealing*, respeitando-se as restrições de geometria anteriormente descritas. Esse procedimento de *annealing* simulado será realizado com o emprego do programa Xplor-NIH (Schwieters *et al.*, 2003). A qualidade e a coerência dos dados de entrada dos

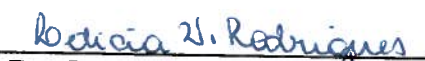


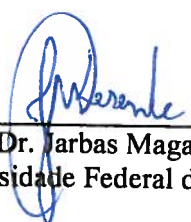
cálculos serão avaliadas pelo programa QUEEN (Nauburs *et al.*, 2003), ao passo que a qualidade das estruturas mais estáveis serão avaliadas pelo próprio Xplor-NIH por emprego de rotinas como o “ACCEPT” (Schwieters *et al.*, 2003) e também por programas como o PROCHECK-NMR (Laskowski *et al.*, 1996), WHAT IF (Vriend, 1990; Rodriguez *et al.*, 1998) e WATTOS (Doreleijers *et al.*, 2003; Nabuurs *et al.*, 2004; Doreleijers *et al.*, 2005; Nederveen *et al.*, 2005). A análise e a visualização das estruturas mais estáveis serão feitas pelo programa MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996).

Abaixo segue o cronograma das atividades a serem realizadas na UFMG, bem como o cronograma para aquisição dos experimentos de RMN (na UFG). As atividades são previstas para serem realizadas entre 25/09/2017 e 31/12/2017.

CRONOGRAMA

	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro
1. Síntese do peptídeo	X	X		
2. Realização dos experimentos de CD		X		
2. Realização dos experimentos de RMN na UFG		X	X	
4. Treinamento em análise de dados de RMN de peptídeos		X		
5. Análise de dados de RMN do peptídeo em estudo			X	X


Dra. Letícia Valvassori Rodrigues
Universidade Federal de Goiás


Prof. Dr. Jarbas Magalhães Resende
Universidade Federal de Minas Gerais



Referências Bibliográficas

- Delaglio F, Grzesiek S, Vuister GW, Zhu G, Pfeifer J, Bax A. NMRPipe: A Multidimensional Spectral Processing System Based on UNIX pipes. *Journal of Biomolecular NMR* 1995;6:277-93.
- Doreleijers JF, Mading S, Maziuk D, Sojourner K, Yin L, Zhu J, Markley JL, Ulrich EL. BioMagResBank database with sets of experimental NMR constraints corresponding to the structures of over 1400 biomolecules deposited in the Protein Data Bank. *Journal of Biomolecular NMR*. 2003;26:139-146.
- Doreleijers JF, Nederveen AJ, Vraken W, Lin J, Bonvin AM, Kaptein R, Markley JL, Ulrich EL. BioMagResBank databases DOCCR and FRED with converted and filtered sets of experimental NMR restraints and coordinates from over 500 protein PDB structures. *Journal of Biomolecular NMR* 2005;32:1-12.
- Gusmão KAG, Santos DM, Santos VM, Cortés ME, Reis PVM, Santos VL, Piló-Veloso D, Verly RM, de Lima ME, Resende JM. Ocellatin peptides from the skin secretion of the South American frog *Leptodactylus labyrinthicus* (Leptodactylidae): Characterization, antimicrobial activities and membrane interactions. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 2017;23: 4
- Johnson BA, Blevins RA. NMRVIEW: a computer program for the visualization and analysis of NMR data. *Journal of Biomolecular NMR* 1994;4:603-14.
- Koradi R, Billeter M, Wüthrich K. MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J Mol Graph* 1996;14:51-5.
- Laskowski RA, Rullmann JA, MacArthur MW, Kaptein R, Thornton JM. AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J Biomol NMR* 1996;8:477-86.
- Nederveen AJ, Doreleijers JF, Vraken W, Miller Z, Spronk CA, Nabuurs SB, Güntert P, Livny M, Markley JL, Nilges M, Ulrich EL, Kaptein R, Bonvin AM. RECOORD: a recalculated coordinate database of 500+ proteins from the PDB using restraints from the BioMagResBank. *Proteins* 2005;59:662-672.
- Nabuurs SB, Spronk CA, Krieger E, Maassen H, Vriend G, Vuister GW. Quantitative evaluation of experimental NMR restraints. *Journal of the American Chemical Society* 2003; 125:12026-120-34.
- Nabuurs SB, Nederveen AJ, Vraken W, Doreleijers JF, Bonvin AM, Vuister GW, Vriend G, Spronk CA. DRESS: a database of refined solution NMR structures. *Proteins* 2004;55:483-486.
- Resende JM, Moraes CM, Prates MV, Cesar A, Almeida FCL, Mundim NCCR, Valente AP, Bemquerer MP, Piló-Veloso D, Bechinger B. Solution NMR structures of the



antimicrobial peptides phylloseptin-1, -2, and -3 and biological activity: The role of charges and hydrogen bonding interactions in stabilizing helix conformations. *Peptides* 2008;29:1633-44.

Rodriguez R, Chinae G, Lopez N, Pons T, Vriend G. Homology modeling, model and software evaluation: three related resources. *CABIOS* 1998;14:523-528.

Schwieters CD, Kuszewski JJ, Tjandra N, Glone GM. The Xplor-NIH NMR Molecular Structure Determination Package. *Journal of Magnetic Resonance* 2003;160:66-74.

Shen, Y, Delaglio F, Cornilescu G, Bax A. TALOS+: A hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts. *Journal of Biomolecular NMR* 2009;44:213-23.

