

# Dinámica molecular de un péptido sintético antigénico derivado del Virus AIE en agua

Garay, Alberto S.<sup>1</sup>; Rodrigues, Daniel<sup>2</sup>; Burton, Gerardo<sup>3</sup>; Tonarelli, Georgina<sup>1</sup>

1-Dto de Qca. Orgánica. Facultad de Bioq. y Cs. Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. (CP: 3000) Casilla de Correo: 242. Santa Fe. Argentina

2- Departamento de Física e INTEC. Facultad de Bioq. y Cs. Biológicas. Universidad Nacional del Litoral - CONICET. (CP: 3000) Casilla de Correo: 242. Santa Fe. Argentina

3- Dto. de Qca. Orgánica. Fac. de Cs. Exactas y Naturales. Ciudad Universitaria (1428). UBA. Buenos Aires. Argentina.

T.E.: +54(342)457-5213 - FAX: +54(342)457-52221

E-mail: sgaray@lbcn.unl.edu.ar

**RESUMEN:** Se realizó una simulación computacional mediante el método de dinámica molecular de la estructura de un péptido sintético cuya secuencia reproduce el extremo c terminal de la proteína p26 del virus de la Anemia Infecciosa Equina (AIE). Se analizó la estabilidad en solución acuosa de este péptido partiendo de la estructura que esta porción posee en el cristal de la proteína. Los resultados muestran que esta estructura es estable en agua en los periodos de la simulación. Los resultados son consistentes con los datos de dicroísmo circular para este sistema. Se efectuó un análisis de las interacciones que estabilizan esta conformación.

**Palabras claves:** Dinámica Molecular - Estructura - Péptidos Sintéticos.

**SUMMARY:** Molecular Dynamics in water of an antigenic synthetic peptide of EIA virus. Garay, Alberto S.; Rodrigues, Daniel; Burton, Gerardo; Tonarelli, Georgina. The structure of the synthetic peptide that has the same sequence of the c-terminal of the EIAV p26 protein was studied using molecular dynamics. The stability in aqueous solution of the structure of such sequence in the crystalized protein was analyzed. The results show that this structure is stable under the conditions of the simulation. The secondary structure found in the calculations agree with the experimental results of circular dichroism for this system. An analysis of the interactions that give rise to the stability of this structure was made.

**Keys Words:** Molecular Dynamics - Structure - Synthetic Peptide.

## Introducción

Las simulaciones computacionales son una herramienta importante en el estudio de las propiedades y comportamientos de moléculas biológicas complejas. Sistemas tales como proteínas, péptidos, ácidos nucleicos y agregados moleculares como membranas han sido estudiados y brindado información relevante a la interpretación de experimentos (1)(2).

En el método de Dinámica Molecular (DM) el movimiento de los átomos es predicho de acuerdo a las leyes de la mecánica clásica (ec. de Newton). Para esto se determina la fuerza que a cada tiempo actúa sobre cada átomo a partir de energías potenciales de interacción entre los mismos. Las energías potenciales entre pares de átomos describen las interacciones ya sean de carácter enlazante (enlaces covalentes, ángulos de ligadura y de torsión) o entre átomos no ligados (interacciones electrostáticas y de van der Waals). El conjunto de parámetros que describen estas interacciones constituye lo que se denomina un "campo de fuerzas", exis-

tiendo a la fecha varias alternativas aplicables a diferentes clases de sistemas. Las ecuaciones de la mecánica permiten entonces determinar la aceleración y por lo tanto las velocidades y desplazamientos en el tiempo. A partir de la trayectoria de los átomos en función del tiempo es posible obtener datos referidos a aspectos energéticos como estabilidad de estructuras, dinámica del sistema, y a movimientos correlacionados.

La proteína mayor del núcleo del Virus de la Anemia Infecciosa Equina (p26), es una de las proteínas estructuralmente antigénicas que persisten durante la infección crónica y es altamente conservada entre variantes antigénicas aisladas de distintas cepas del mismo virus (6). Esto hace que su estudio estructural sea de particular interés en el campo de la inmunología y virología, donde podrían desarrollarse vacunas y pruebas diagnósticas más sensibles y específicas para este tipo de virus. La proteína completa ha sido cristalizada y se conoce su estructura a partir de datos de difracción de Rx (1EIA). También se ha determinado que la mayor actividad antigénica se halla en el extremo c-terminal.

El péptido sintético p26-1 pertenece a este segmento c-terminal y su secuencia en la proteína completa posee una estructura Hélice-Turn-Hélice. Experimentalmente la zona c-terminal de la proteína mostró ser responsable de la mayor parte de su antigenicidad. Los estudios de dicroísmo circular realizados a este péptido muestran un espectro característico de las alfa hélices, y su interpretación es consistente con un porcentaje de hélice mayor al 50 % (7).

Desde el punto de vista estructural interesa conocer si este péptido sintético mantendría en solución acuosa una conformación semejante a la que posee en la proteína cristalizada. Por otra parte resultaba de interés estudiar las interacciones que estabilizaban la estructura secundaria y terciaria del péptido.

### Modelo y Método de cálculo

Las coordenadas atómicas de la estructura inicial del péptido p26\_1 (secuencia ANEECRNAM-RHLRPEBTLLEEKMYACRBIG), se extrajeron de la estructura cristalizada del dímero de la proteína p26 (entrada PDB 2EIA). Se utilizó la forma amida de dicho péptido por ser esa la estructura sintetizada en el laboratorio. El solvente fué simulado usando un modelo SPC para el agua (8)(9). Se usó como bloque de construcción una caja cúbica conteniendo 216 moléculas de agua. Se eliminaron las moléculas de agua que se hallaran a una distancia de 0.23 nm de cualquier átomo del péptido. Esto produjo 2198 moléculas de agua en una caja cúbica de 4.19 nm. Se empleó el campo de fuerzas GROMACS con átomos de Hidrógeno explícitos. La estructura inicial fue minimizada mediante "steepest descendent method" por 1000 pasos de iteración hasta convergencia cuando la fuerza máxima fue de 100 KJ por mol y por nm, con el objeto de eliminar todos los posibles contactos entre los átomos del sistema, lo cual resultaría en una energía repulsiva muy alta, con lo cual el sistema podría resultar inestable.

Se realizó a continuación una dinámica molecular con posición restringida, donde se fijaron las coordenadas del péptido y se les permitió a las moléculas de agua equilibrarse alrededor de él, para eliminar todos los posibles espacios que podrían haber quedado luego del agregado de las moléculas de agua. Las velocidades iniciales fueron tomadas de una distribución Maxwelliana a 300 °K. La simu-

lación se realizó a volumen constante y el sistema se acopló a un baño térmico a 300 °K (acoplamiento débil  $\tau_T = 0.1$  ps). El péptido y el solvente fueron acoplados independientemente al baño externo. El movimiento del centro de masa de la simulación fué removido en cada paso de integración. Todas las distancias, así como los ángulos de enlace fueron restringidos empleando el algoritmo SHAKE con una tolerancia relativa de  $10^{-4}$ . El paso de integración empleado fué de 2 fs. La lista de vecinos fue actualizada cada 20 fs. Las interacciones no enlazantes de Lennard-Jones fueron truncadas usando un radio máximo de 1 nm. Las interacciones electrostáticas se calcularon a distancia infinita empleando la técnica de sumas de Ewald combinadas con transformadas rápidas de Fourier para la suma en el espacio recíproco (PME Particle Mesh Ewald Summation). En la simulación las interacciones de van der Waals se redujeron en las interacciones tipo 1-4, mientras que en las interacciones electrostáticas se usó la interacción completa. La simulación con posiciones restringidas se realizó durante 100000 pasos (200 ps). A continuación se realizó una dinámica molecular sin restricciones durante 2 ns (1.000.000 de pasos) en las mismas condiciones anteriores.

Se usó en la simulación el paquete de software GROMACS. Para el cálculo de las estructuras secundarias a partir de las coordenadas atómicas se empleó el programa DSSP. Ambos programas se utilizaron bajo entorno LINUX, en una PC Pentium II (466Mhz) IBM compatible, con 64 Mb de memoria. La simulación tomó 21 días. Los gráficos moleculares se realizaron con el programa MOLMOL para Linux.

### Resultados y Discusión

El gráfico de Ramachandran de la simulación completa indica que menos del 5% de los residuos del péptido ocupan espacios conformacionalmente menos poblados y una alta proporción de ellos se hallan en la zona de alfa hélice (fig. 1a), esto indica que la simulación tuvo un comportamiento estable. En la figura 1b se puede apreciar el cambio de conformación que sufrió cada residuo. Puede notarse que los residuos 25, 26, 27 (extremo terminal de la molécula) poseen la mayor movilidad de la molécula, mientras que el resto se hallan muy próximos, indicando la mayor estabilidad de esa porción de la molécula.

Los desvios cuadráticos medios de la cadena principal a lo largo de la simulación es una medida del cambio de estructura del péptido. En la figura 2a puede observarse que la estructura global del péptido cambia en los primeros 250 ps, para luego mantenerse relativamente constante, mostrando gran estabilidad en el solvente acuoso. El valor meseta alcanzado para el RMSD de 1.5 a 2 Å de la cadena principal es similar al obtenido durante las simulaciones de otros péptidos (9). En figura 2b se observa que la mayor variación estructural se halla en los residuos de los extremos del péptido (Ala1, Gly29) y una zona media con residuos que cambiaron más su estructura (Arg10, Pro14, Leu18, Glu19) y otros con estructura más conservada (Asn7, Leu12, Asp16, Thr17, Lys21, Met22).

En la figura 3 puede observarse que los residuos 3 al 11 y del 18 al 24 poseen ángulos  $\phi$  y  $\psi$  compatibles con alfa hélice ( $-58^\circ$  y  $-47^\circ$ ). Además se puede ver que las fluctuaciones son en general pequeñas para todos los residuos, salvo del 27 al 29 que se encuentran en el extremo del péptido y evidencian mayor movilidad. En figura 4 se observan 2 zonas amplias con estructura de alfa hélice que se conservan durante toda la simulación. Si observamos los primeros residuos en los primeros tiempos de la simulación, notaremos que hay un rápido incremento de la estructura de hélice alfa, que indicaría la mayor estabilidad en agua de esa porción de hélice. También es posible observar una zona de giro conservada, que se halla en la proximidad de un residuo de Prolina, residuo encontrado preferentemente en dichas zonas.

En la figura 5 puede apreciarse como los segmentos de hélice se mantienen durante la simulación con pequeña variación de los mismos. Además puede apreciarse el enlace bisulfuro que estabiliza la estructura hélice-turn-hélice. Las partes señaladas con círculos corresponden a la zona que incrementa su estructura alfa hélice durante la simulación y también se observa en la figura 4. Así mismo se graficó con cilindros gruesos los residuos que participan en las interacciones "puente-salino" y que estabilizan tanto las hélices como otras zonas de la estructura molecular. Las distancias entre los gru-

pos cargados que presentan interacciones repulsivas "Puente salino" son mayores a 0.5 nm, excepto para el caso de Arg6-arg10. Esto pone de relieve la escasa incidencia sobre la estabilidad de la estructura de estas interacciones desestabilizantes.

En la figura 6a puede verse que en los primeros 250 ps el número de enlaces de H aumenta desde 21 hasta alcanzar una meseta en 25, lo cual indica que la estructura se estabiliza internamente con la formación de nuevos enlaces de H. En la figura 6b se observa un rápido incremento en los primeros 250 ps en el número de enlaces de H 1-1+4, que son los que caracterizan a las estructuras secundarias alfa-hélice. Este resultado es consistente con las imágenes de la figura 5, donde puede apreciarse que a  $t=0$ , los primeros residuos de la molécula poseen menos estructura en hélice que todas las inferiores, indicando que esta porción de la molécula solvatada en agua se organiza en estructura alfa hélice.

## Conclusiones

Los datos de la simulación muestran que para el péptido en solución acuosa la estructura tomada de la correspondiente porción de la proteína cristalizada es estable en las condiciones de la dinámica molecular. Esta estabilidad se debe a la presencia del puente bisulfuro que determina el plegamiento de la cadena principal y el incremento de puentes de H que favorecen la estructura secundaria alfa hélice.

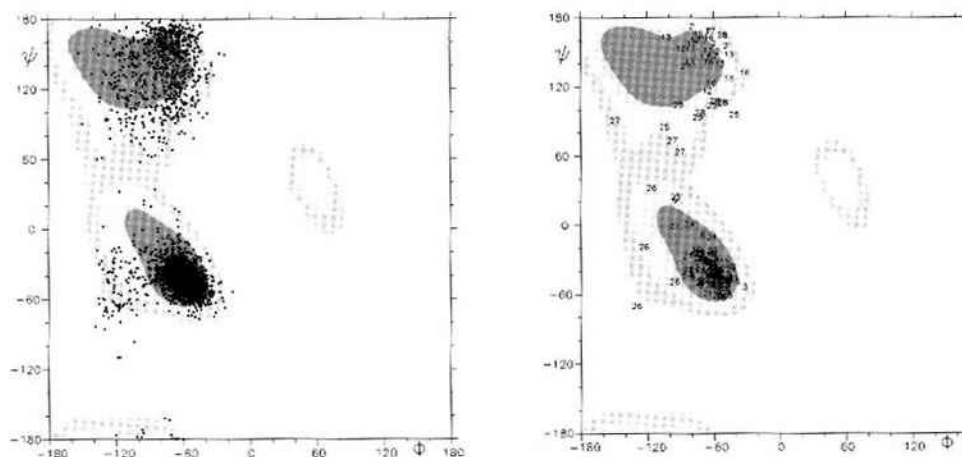
La existencia de un mayor número de interacciones "puentes salino" atractivas que repulsivas favorece la estabilidad de la estructura.

Para estudiar la estabilidad de esta estructura frente a otras conformaciones, sería importante la realización de simulaciones a mayores temperaturas acompañadas por un procedimiento de recocido simulado.

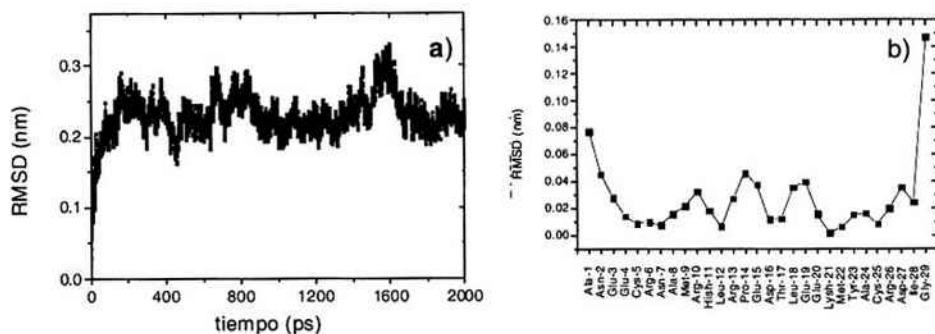
## Agradecimientos

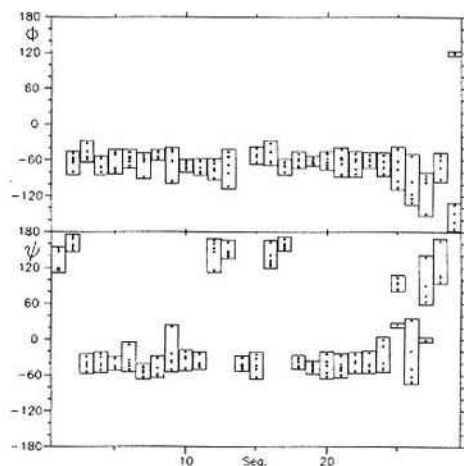
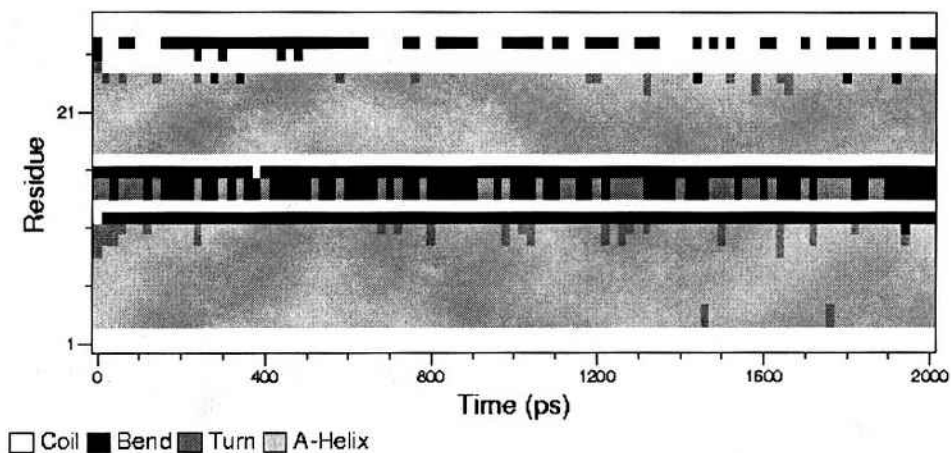
Este estudio se realizó mediante subsidios de la Universidad Nacional del Litoral a través del Programa CAI+D' 96, y de Fundación Antorchas.

**Figura 1.** Angulos  $\phi$  y  $\psi$  de cada residuo aminoacídico correspondientes a la cadena principal del péptido, muestreado cada 20 ps. b) Mapa de Ramachandran de las estructuras obtenidas a 0, 500, 1000, 1500 y 2000 ps.

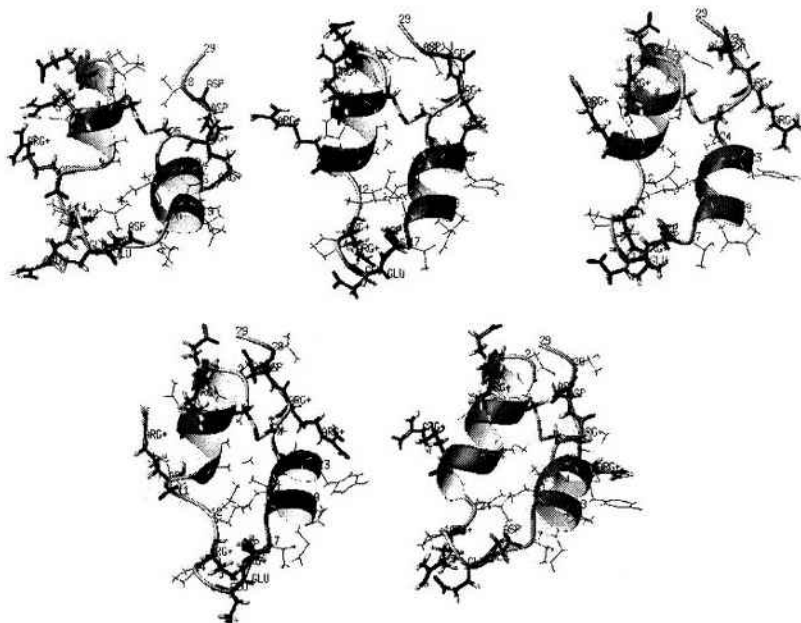


**Figura 2.** Desviación cuadrática media de las posiciones de los átomos de la cadena principal respecto de la estructura al tiempo inicial, muestreado cada 20 ps. b) Desviación cuadrática media de las posiciones de los átomos C, Ca, N para cada residuo aminoacídico respecto de su posición inicial a lo largo de toda la simulación.

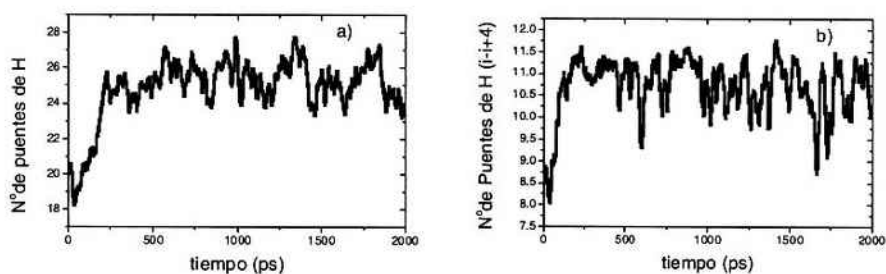


**Figura 3.** Gráfico de  $\phi$  y  $\psi$  para cada residuo aminoacídico a los tiempos de 0, 500, 1000, 1500 y 2000 ps.**Figura 4.** Gráfico de estructura secundaria a lo largo del tiempo de la simulación. Se muestra en distintos tonos de grises la estructura secundaria que presentó cada residuo del péptido a distintos tiempos de la simulación.

**Figura 5:** Gráfico de las estructuras obtenidas de la simulación a  $t = 0$  (inicial), 500, 1000, 1500 y 2000 ps. Se muestran como cintas las zonas correspondientes a estructura secundaria alfa hélice.



**Figura 6:** Gráfico de la cantidad de puentes de H a lo largo de la simulación para: a) considerando todos los formados entre distintos residuos del péptido, b) considerando solo los establecidos entre los residuos  $i - i + 4$ .



## Bibliografía

- 1- D.C. Rapaport. 1995. "The Art of Molecular Dynamics Simulations". Cambridge Univ. Press (Cambridge). 1-74.
- 2- J. M. Goodfellow. 1990. "Molecular Dynamics. Applications in Molecular Biology". CRC Press. (London). 1-21.
- 3- K. B. Lipkowitz; D.B. Boyd. 1990. "Reviews in Computational Chemistry". VCH Publishers, Inc. (New York). 295-308.
- 4- J.D. Hirst; C.L. Brooks III. "Molecular Dynamics of Isolated Helices of Myoglobin". *Biochemistry*. 1995. **34**:7614-7621.
- 5- P.D. Tieleman, M.S.P. Sansom; H.J.C. Berendsen. Alame-thicin Helices in a Bilayer and in Solution Molecular Dynamics Simulations. *Biophys. J.* 1999. **76**: 40-49.
- 6- Y.H. Chong; S. Payne, C.J. Issel; R.K. Montelaro. Characterization of the antigenic domains of the major core protein (p26) of EIAV. *Journal of Virology*, 1991. **65** 2: 1007-1012.
- 7- Tonarelli, G.; Soutullo A.; Lottersberger J.; Salvetti J.; Garay A. Estructura Conformacional y Actividad Biológica de un Péptido Sintético de la p26 del virus AIE. Pag. 105-106. XII Simposio Nacional de Química Orgánica. 14 al 17 Noviembre de 1999, Los Cocos, Córdoba, Argentina.
- 8- R. Grigera. 1994. "Advance in Computational Biology". JAI press Inc. I 213-214.
- 9- D. van der Spoel; P. J. van Maaren; H. J. Berendsen. " A systematic study of water models for molecular simulation: derivation of Water models Optimized for use with a reaction field" *J.Chem.Phys.* 1998. **108**. 24:10220-10230.
- 10- H. De Loof; L. Nilson; R. Rigler. "Molecular Dynamics Simulation of Galanin in Aqueous and Nonaqueous Solution". *J. Am.Chem.Soc.* 1992. **114**, 4028-4035.