



POLIMORFISMO DE BICAMADAS DE LIPÍDIO A SOB INFLUÊNCIA DO ÍON Al^{3+} , CONCENTRAÇÃO SALINA E GRUPOS FOSFATO.

Andresa Messias da Silva^{1,*}, Frederico Pontes¹, Thereza Amélia Soares¹

¹BioMat - Biomaterials Modeling Group, UFPE. Departamento de Química Fundamental/CCEN
andresamessias4@gmail.com

INTRODUÇÃO

A membrana externa de bactérias gram-negativas possui como principal componente moléculas de Lipopolissacarídeos (LPS). O LPS é o principal responsável pela integridade estrutural da bactéria e atua como uma barreira protetora contra-ataques químicos de algumas substâncias. O LPS é constituído de três partes: uma cadeia de antígeno, um núcleo de oligossacarídeos e o lipídio A (endotoxina). O lipídio A é um dissacarídeo, que dependendo do tipo de bactéria, pode apresentar diferentes graus de fosforilação, número e tamanho específicos para as cadeias aciladas e é o principal responsável pela atividade endotóxica da bactéria [1, 2].

Modificações em propriedades físico-químicas na vizinhança de membranas bacterianas de LPS podem provocar mudanças estruturais profundas em sua forma de agregação (de uma estrutura planar para uma estrutura não-lamelar ou com curvaturas, por exemplo), fluidez e propriedades dinâmicas. A extensão dessas transições é dependente também da estrutura química do LPS e, principalmente, do lipídio A. O lipídio A tem diversos graus de atividade endotóxica diretamente relacionada a sua estrutura química primária [2]. A versatilidade de obter-se diferentes respostas imunológicas frente a combinação de diferentes tipos de lipídio A combinados a mudanças em seu ambiente físico-químico tem estimulado a aplicação desse lipídio em diferentes campos da ciência. Um exemplo de aplicação é a utilização de lipídio A de *Escherichia coli* combinado à sais de alumínio como adjuvante em vacinas como estimulador moderado do sistema imune. A utilização do íon Al^{3+} como adjuvante de vacinas [3,4] ocorre na forma de hidróxido, fosfato ou hidroxifosfato. No entanto, não se sabe detalhes estruturais e atomísticos de como o íon Al^{3+} influencia a estrutura e organização de bicamadas e agregados lipídicos.

Neste trabalho realizamos simulações atomísticas de dinâmica molecular de bicamadas de lipídio A de *Escherichia coli* hexaacilada (mono- e difosforilada), hidratadas e em três regimes de concentração iônica, a saber: (a) concentração iônica zero - apenas íons Al^{3+} suficientes para garantir a eletroneutralidade do sistema; (b) concentração iônica de 150mM de NaCl e (c) concentração iônica de 150mM de $AlCl_3$ de maneira a caracterizar a influência do íon Al^{3+} na estrutura, fluidez e organização das bicamadas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Toda a preparação das caixas de simulação, realização das simulações e posterior análises das trajetórias geradas foram realizadas com o programa GROMACS 4.6.x [5]. Adicionalmente as rotinas de análises disponíveis no programa GROMACS, utilizou-se também ferramentas computacionais de análise desenvolvidas em nosso grupo onde a curvatura das membranas é levada em consideração

no cálculo de propriedades estruturais [6]. Utilizou-se parâmetros disponíveis na literatura para o íon Al^{3+} [7] e ao mesmo tempo compatíveis com os parâmetros do campo de força GROMOS53A6 para o lipídio A [8], previamente desenvolvido e validado. Cada sistema é composto de duas camadas de lipídio A totalizando 81 lipídios num arranjo quadrado de 9x9. As dimensões da caixa são da ordem de 8x13x14 nm. Cada bicamada de Lipídio A (mono- e difosforilada) foi simulada em três diferentes situações de força iônica: (1) força iônica zero (mph_0mM e dph_0mM); 2) força iônica de 150 mM com o sal NaCl (mph_NaCl e dph_NaCl); e(3) força iônica de 150 mM com o sal $AlCl_3$ (mph_ $AlCl_3$ e dph_ $AlCl_3$). Inicialmente construiu-se as caixas de simulação para as bicamadas com força iônica zero. O sistema foi então submetido a uma minimização de estrutura com o algoritmo *steepest descent*. As caixas de simulação com força iônica de 150 mM de NaCl ou $AlCl_3$ foram criadas a partir das caixas minimizadas dos respectivos sistemas quimiótipos sem força iônica. A adição dos íons foi feita através da substituição de moléculas de água presentes no sistema. Essas caixas também foram minimizadas com o algoritmo de *steepest descent*. Os sistemas minimizados foram então submetidos a simulação pelo método de dinâmica molecular. Adotou-se o ensemble NpT com o número de partículas (N), pressão (1 bar) e temperatura (300K) constantes. Adotou-se um esquema de acoplamento semiisotrópico para a pressão utilizando-se o algoritmo de Berendsen para o controle da temperatura e pressão. As simulações foram estendidas por um tempo suficientemente longo para que atingissem a fase equilibrada (onde as propriedades energéticas e estruturais do sistema não variam mais com o tempo). A fase equilibrada de uma simulação é onde as médias das propriedades de interesse podem ser calculadas. Em nossas simulações as análises e cálculo das propriedades foram realizadas nos últimos 70 ns de trajetória equilibrada para cada sistema.

Tabela 1: Número de moléculas presentes em cada bicamada lipídica.

Sistemas	H ₂ O	Al ³⁺	Na+	Cl ⁻
mph_0mM	43259	54	0	0
mph_ $AlCl_3$	42599	219	0	495
mph_NaCl	42929	54	165	165
dph_0mM	48868	108	0	0
dph_ $AlCl_3$	48080	305	0	591
dph_NaCl	48474	108	197	197

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tempo mínimo de simulação de cada sistema foi cerca de 200 ns. As estruturas finais das bicamadas simuladas estão apresentadas na Figura 1. De maneira geral, pode-se afirmar que os sistemas com força iônica zero mantiveram a sua forma lamelar. Sendo que o sistema monofosforilado (mph_0mM) preservou a sua planaridade,

mas o sistema formado pelo lipídio difosforilado (dph_0mM) apresentou a formação de uma curvatura em sua estrutura. Os sistemas com força iônica dos dois sais sofreram transição de estrutura lamelar para não-lamelar. Observa-se nos sistemas com força iônica de NaCl a grande quantidade desses íons na estrutura interna da membrana. Uma análise qualitativa na estrutura final mostra que a presença do sal NaCl parece provocar uma maior desorganização estrutural que o sal $AlCl_3$.

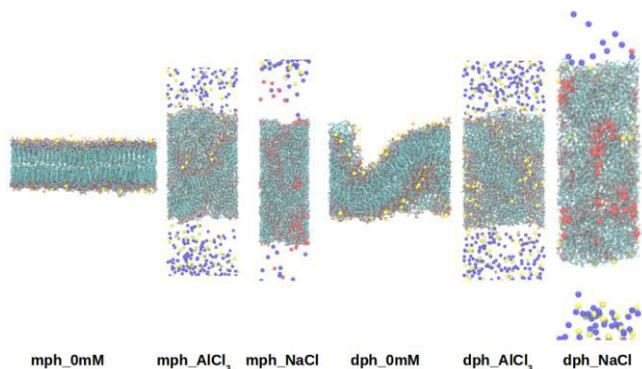


Figura 1. Estruturas finais dos sistemas simulados. As moléculas de água foram omitidas por clareza. As esferas amarelas, azuis e vermelhas representam os íons Al^{3+} , Cl^- e Na^+ respectivamente.

De maneira geral, temos uma grande variedade de polimorfismos: lamelar, lamelar com curvatura e não-lamelar. Nota-se uma relação entre o aumento do número de íons Al^{3+} presentes em cada caixa de simulação com o aumento da desorganização de cada sistema.

Estimando a área por cabeça de cada sistema, observa-se que o sistema planar e lamelar com curvatura estabilizaram com valores entre $1 - 1.25 \text{ nm}^2$ (Figura 2, à esquerda). O íon alumínio tem o efeito de provocar uma maior compactação na cabeça dos lipídios por ter um raio iônico pequeno e com uma carga alta. Os sistemas com maiores curvaturas ou de arranjo não-lamelar apresentam valores bastante baixos para a área por cabeça devido as fortes mudanças em sua estrutura.

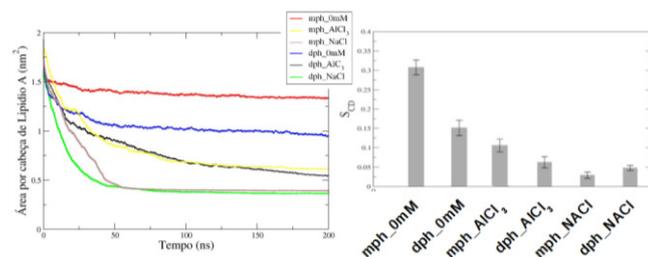


Figura 2. Área por cabeça dos sistemas simulados (esquerda) e parâmetro de ordem médio das cadeias aciladas (direita).

O grau de desordem dos sistemas pode ser estimado através do cálculo dos parâmetros de ordem das cadeias aciladas dos sistemas. Os resultados estão compilados na Figura 2 (direita) e mostram uma queda gradual do valor do parâmetro de ordem, indicando uma diminuição da ordem do sistema. Observa-se uma correlação direta entre desordem do sistema e número de íons Al^{3+} presente em cada caixa de simulação para os sistemas sem o íon Na^+ .

Pode-se notar a variedade estrutural fornecida por íons Al^{3+} as formas de agregação das bicamadas com uma certa modulação entre a sua quantidade e forma de agregação. Nesse enfoque, pode-se colocar as membranas na presença do sal NaCl em outro grupo onde a presença do íon sódio sempre leva a transições da forma lamelar para não-lamelar nas bicamadas. De maneira

menos predominante, percebe-se o efeito que a estrutura química do lipídio A tem na sua forma de agregação: sistemas monofosforilados são mais organizados que os sistemas difosforilados para o grupo contendo apenas o cátion Al^{3+} em sua composição.

Simulações com força iônica não alteram apenas a forma de agregação da bicamada, mas também o seu grau de hidratação e toda a sua estruturação. Estimativas do número de coordenação do íon alumínio em cada membrana indicam um íon praticamente hexahidratado nos sistemas. Sendo que nos sistemas sem a presença do íon Na^+ , ocorre a presença desses íons hidratados dentro da membrana provocando o seu inchaço e possível mecanismo de destabilização.

Detalhes da estrutura da bicamada pode ser obtida através da distribuição da densidade dos grupos químicos ao longo do eixo Z da membrana. No nosso caso, analisamos a distribuição ao longo do eixo normal ao plano da bicamada para as cadeias aciladas, água, átomos de fósforo e íons (Na^+ , Al^{3+} e Cl^-). Os resultados estão apresentando na figura 5.

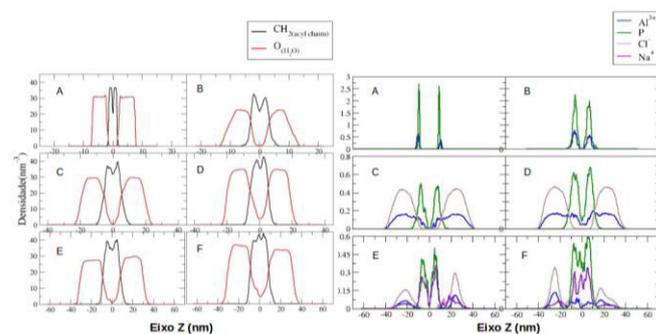


Figura 3. Perfis de densidade para as moléculas de água e cadeias aciladas (esquerda) e para os íons e átomo de fósforo (direita) para cada sistema (A) - mph_0mM, (B) - dph_0mM, (C) - mph_ $AlCl_3$, (D) - dph_ $AlCl_3$, (E) mph_ $NaCl$ e (F) - dph_ $NaCl$.

Os perfis de densidade da esquerda servem como um indicativo do grau de hidratação no interior da bicamada. À medida que aumenta a desordem do sistema, observa-se mais água no interior da bicamada. Os picos referentes as cadeias aciladas mostram-se cada vez mais largos e menos simétricos à medida que aumenta a desordem do sistema. Os picos perdem definição devido a maior interpenetração das cadeias aciladas. Analisando os perfis de densidade à esquerda, nota-se que os sistemas sem a presença do íon Na^+ tem uma coordenação forte entre os íons Al^{3+} e o átomo de fósforo, pois encontram-se na mesma região do eixo Z. A maior largura da curva deve-se a maior desordem e flutuação nas posições dos grupos químicos analisados. A presença de íons cloretos no sistema (C e D à direita da figura 3) provoca um espalhamento da distribuição dos íons Al^{3+} ao longo do eixo Z na membrana. A atração eletrostática entre os íons é o responsável por esse novo perfil de densidade. Os sistemas contendo Na^+ apresentam como característica mais marcante a forte coordenação com o grupo fosfato da membrana substituindo o íon Al^{3+} presente previamente nesse sítio de ligação. A maioria dos íons Al^{3+} estão em solução. Observa-se aqui uma maior afinidade dos grupos fosfatos aos íons Na^+ que aos íons Al^{3+} quando ambos estão presentes na simulação. Essa análise indica que a diversidade de polimorfismo observado nas bicamadas contendo apenas Al^{3+} deve primordialmente a presença do íon como promotor do rearranjo da bicamada.

CONCLUSÕES

As simulações atomísticas de dinâmica molecular conduzidas por nós indicam que a presença de contraíons (Al^{3+} e Na^+) são os principais determinantes para transição de lamelar para não-lamelar em bicamadas lipídicas de lipídio A de *E. coli*. A estrutura química primária do lipídio A tem influência mais secundária com sistemas monofosforilados sendo mais ordenados que os sistemas difosforilados. Apenas o sistema monofosforilado na presença de íon Al^{3+} e sem força iônica mantém a sua estrutura lamelar e plana. Nota-se uma clara correlação entre o grau de desordem do sistema com o aumento do número de íons Al^{3+} quando este é o único cátion presente. O aumento da desordem nos sistemas é acompanhado por uma maior fluidez e hidratação da bicamada, além de íons bastante hidratados no interior da bicamada. Investigações ainda em curso visam entender o papel da densidade de carga na interface lipídio/água no processo de transição lamelar para não-lamelar nos sistemas. Uma outra investigação também em curso é relação entre a série de Hofmeister e a forma de agregação das bicamadas lipídicas.

AGRADECIMENTOS

AMS agradece ao Pibic/UFPE/CNPq pela bolsa concedida. Todos os autores agradecem à FACEPE, CNPq, CAPES, CENAPAD-UFC, Biomol Project/CAPES, STINT.

REFERÊNCIAS

- Aderem, A.; Ulevitch, R. J. *Nature* **2000**, *406*, 782-787
- Brandenburg, K.; Koch, M. H.; Seydel, U. *J. Struct. Biol.* **1990**, *105*, 11-21.
- Marrack, P.; McKee, A. S.; Munks, M. W. *Nature reviews. Immunology* **2009**, *9*, 287-93.
- Hogenesch, H.; *Front. Immunol.* **2013**, *3*, 1.
- Pronk S.; Páll, S.; Schulz, R.; Larsson, P.; Bjelkmar, P.; Apostolov, R.; Shirts, M.; Smith, J.; Kasson, P.; van der Spoel, D.; Hess, B.; Lindahl, E. *Bioinformatics* **2013**, *29*, 845-854.
- Faro, T. M. C.; Thim, G. P.; Skaf, M.S.; *J. Chem. Phys.* **2010**, *132*, 114509.
- Pontes FJS, Rusu VH, Soares TA, Lins RD (2012)