

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

JANILSON JOSÉ DA SILVA JÚNIOR

**Modelagem computacional, preparação e análise das
propriedades do nanosensor estocástico para detecção e
identificação de cianotoxinas**

Recife

2017

JANILSON JOSÉ DA SILVA JÚNIOR

**Modelagem computacional, preparação e análise das
propriedades do nanosensor estocástico para detecção
e identificação de cianotoxinas**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Inovação Terapêutica da
Universidade Federal de Pernambuco, para
a obtenção do Título de Doutor em
Inovação Terapêutica.**

**Orientador: Prof. Dr. Cláudio Gabriel Rodrigues
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Thereza Amélia Soares**

**Recife
2017**

Catálogo na Fonte:

Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Silva Júnior, Janilson José da

Modelagem computacional, preparação e análise das propriedades do nanosensor estocástico para detecção e identificação de cianotoxinas / Janilson José da Silva Júnior. – Recife, 2017.

90 f.: il.

Orientadores: Cláudio Gabriel Rodrigues, Thereza Amélia Soares
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, 2017.

Inclui referências, apêndice e anexos

1. Bactérias 2. Nanotecnologia I. Rodrigues, Cláudio Gabriel (orient.) II. Soares, Thereza Amélia III. Título.

579.39

CDD (22.ed.)

UF PE/CB-2017-464

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: JÚNIOR, JANILSON JOSÉ DA SILVA

Título: Modelagem computacional, preparação e análise das propriedades do nanosensor estocástico para detecção e identificação de cianotoxinas.

Tese apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 24/02/2017

Banca Examinadora

Prof. Dr. ROMILDO DE ALBUQUERQUE NOGUEIRA

Instituição: Depto. de Fisiologia e Morfologia Animal da UFRPE

Assinatura: _____

Prof^ª. Dr^ª. ROBERTA PEREIRA DIAS

Instituição: Núcleo Interdisciplinar de Ciências Exatas e Inovação Tecnológica da UFPE.

Assinatura: _____

Prof^ª. Dr^ª. ISVANIA MARIA SERAFIM DA SILVA LOPES

Instituição: Depto. de Biofísica e Radiobiologia da UFPE.

Assinatura: _____

Prof. Dr. REGINALDO PEREIRA DA SILVA.

Instituição: Depto. de Fisiologia e Farmacologia da UFPE.

Assinatura: _____

Prof. Dr. CLÁUDIO GABRIEL RODRIGUES

Instituição: Depto. de Biofísica e Radiobiologia da UFPE.

Assinatura: _____

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETORA DO CENTRO DE BIOCÊNCIAS

Prof^a. Dr^a. Maria Eduarda Lacerda de Larrazábal da Silva

VICE- DIRETORA DO CENTRO DE BIOCÊNCIAS

Prof^a. Dr^a. Oliane Maria Correia Magalhães

COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Prof^a. Dr^a. Maira Galdino da Rocha Pitta

VICE- COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

Ao meu bom Deus.

A minha querida mãe Maria Edilene do N.
Silva.

À memória do prof. Oleg V. Krasilnikov

À Mayse Leal, por quem tenho tanto carinho e
quero tão bem. De quem busco estímulo e
inspiração.

À minha grande amiga Dijanah Cota.

Ao meu Orientador Cláudio Gabriel

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Cláudio Gabriel Rodrigues por todo o apoio prestado todos os ensinamentos transmitidos, bem como à minha co-orientadora Thereza Amélia Soares, pelo incentivo de desbravar novos horizontes científicos.

Aos amigos e integrantes do LBM-CT e do BIOMAT Dijanah Cota, Juliana Pereira, Maria Carolina, Frederico Pontes, Victor Rusu, Roberta Dias e Laércio Pol-Fachin, Artur Alves.

Agradeço especialmente ao Prof. Oleg V. Krasilnikov, que não mais se encontra entre nós, pela contribuição como cientista e como pessoa.

RESUMO

As microcistinas (MCs) são uma classe de heptapeptídeos cíclicos, com mais de 100 variantes estruturais, produzidas por algumas espécies de cianobactérias presentes em águas superficiais. Algumas técnicas são empregadas na detecção de MCs, porém, há poucos métodos validados para a diferenciação adequada das variantes. Neste trabalho empregou-se um nanoporo da alfatoxina incorporado em bicamada lipídica como ferramenta molecular para detecção e diferenciação das variantes LR, RR e YR. Adicionalmente empregou-se simulação de dinâmica, docagem molecular e cálculo de potencial eletrostático como suporte para esclarecimento do processo de interação MCs-nanoporo. A confecção da bicamada lipídica plana, inserção do nanoporo unitário e os registros de correntes iônicas ocorreram em condições de fixação de voltagem a 25°C. As soluções utilizadas foram KCl ou LiCl 4M, pH 7,5. Demonstrou-se que o nanoporo da alfatoxina discrimina as variantes (LR, RR, e YR) na solução de KCl. O processo de discriminação é baseado na análise dos tempos de permanência de cada variante no interior do nanoporo unitário, bem como, nas amplitudes dos bloqueios na corrente iônica que flui através dele. As variantes (LR, RR e YR) apresentam diferentes distribuições de carga que se correlacionam com os três perfis de amplitude de bloqueio na corrente iônica através do nanoporo. A análise de docagem molecular indica diferentes padrões de interação das variantes de MCs em duas regiões específicas do nanoporo. O volume ocupado por cada variante (LR, RR e YR) na região de constrição do nanoporo correlaciona-se com os três perfis de amplitudes de bloqueio na corrente iônica. Finalmente propomos um modelo, no qual, a capacidade do nanoporo da alfatoxina em diferenciar as variantes de microcistinas ocorre por um mecanismo baseado principalmente em interações eletrostáticas.

Palavras-chave: Nanoporo. Alfatoxina. Microcistinas. biossensor.

ABSTRACT

Microcystins (MCs) are a class of cyclic heptapeptides with more than 100 structural variants produced by some species of cyanobacteria present in surface waters. Some techniques are employed in the detection of MCs, however, there are few validated methods for proper variant differentiation. In this work, a lipid bilayer incorporated as a molecular tool for the detection and differentiation of the LR, RR and YR variants was used. In addition, dynamics simulation, molecular docking and electrostatic potential calculation were used as a support to clarify the MCs-nanopore interaction process. The preparation of the planar lipid bilayer, insertion of the unitary nanopore and the ion chain currents occurred under conditions of voltage clamp at 25 ° C. The solutions used were KCl or 4M LiCl, pH 7.5. It has been shown that the alphatoxin nanopore discriminates the variants (LR, RR, and YR) in the KCl solution. The discrimination process is based on the analysis of the residence times of each variant within the unitary nanopore as well as on the amplitudes of the blockages in the ionic current flowing through it. The variants (LR, RR and YR) have different charge distributions that correlate with the three profiles of amplitudes of the blockages in the ionic current through the nanopore. Molecular docking analysis indicates different patterns of interaction of MC variants in two specific regions of the nanopore. The volume occupied by each variant (LR, RR and YR) in the nanopore constriction region correlates with the three profiles of amplitudes of the blockages in the ionic current. Finally, we propose a model in which the ability the alphatoxin nanopore to differentiate the microcystins variants occurs by a mechanism based mainly on electrostatic interactions.

Keywords: Nanopore. Alphatoxin. Microcystins. Biosensor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	-	Representação estrutural das MCs.....	15
FIGURA 2	-	Esquema geral das etapas e componentes de um biossensor.....	20
FIGURA 3	-	Modelo do nanoporo formado pela alfatoxina.....	21
FIGURA 4	-	Registro de corrente e esquema da alfatoxina como biossensor.....	23
FIGURA 5	-	Exemplo das equações contidas em um campo de força utilizado em métodos de Dinâmica Molecular.....	26
FIGURA 6	-	Representação da molécula da água.....	27
FIGURA 7	-	Gráfico da energia em função da conformação.....	29
FIGURA 8	-	Arcabouço do processo de docagem molecular.....	29
FIGURA 9	-	Representação esquemática da técnica de MONTAL & MUELLER, 1972.....	32
FIGURA 10	-	Esquema da configuração experimental.....	32
FIGURA 11	-	Esquema mostrando a reação de equilíbrio que ocorre entre o nanoporo e uma dada microcistina.....	34
FIGURA 12	-	Representação da caixa de simulação.....	37
FIGURA 13	-	Print do programa VMD.....	40

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Vantagens e desvantagens dos principais métodos atualmente utilizados para o monitoramento de MCs em meios aquosos.....	18
TABELA 2. Conteúdo do arquivo mdp, necessário para a minimização de energia no GROMACS.....	38
TABELA 3. Conteúdo do arquivo mdp, necessário para a Dinâmica Molecular no GROMACS.....	39

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1	Aspectos Gerais das Microcistinas	14
2.1.1	Microcistinas: origem, estrutura e toxicidade	14
2.1.2	Principais métodos de detecção	16
2.2	Nanoporo da Alfa-toxina como Biossensor Estocástico	19
2.3	Simulações por Docagem, Dinâmica Molecular e Cálculo de Potencial Eletrostático	24
3	JUSTIFICATIVA	30
4	OBJETIVOS	30
4.1	Geral	30
4.2	Específicos	30
5	METODOLOGIA	31
5.1	Bicamadas Lipídicas planas e incorporação do nanoporo da alfatoxina	31
5.2	Métodos Computacionais	35
5.2.1	Programas Utilizados	35
5.2.2	Simulações por Dinâmica Molecular	35
5.2.3	Cálculo dos Mapas de Potencial Eletrostático	40
5.2.4	Simulações por docagem molecular	40
6	RESULTADOS: DIFFERENTIATION OF MICROCYSTIN VARIANTS WITH THE ALPHA HEMOLYSIN NANOPORE: A THEORETICAL AND EXPERIMENTAL STUDY	41
7	CONCLUSÕES	73
	REFERÊNCIAS	74
	APÊNDICE A - Topologia dos resíduos (MASP, ADDA, DEGLU e MDA)	85
	ANEXO A - Artigo publicado na RSC Advances - Royal Society of Chemistry	89
	ANEXO B – Artigo publicado na Química Nova	90

1 INTRODUÇÃO

O acesso à água potável é uma grande preocupação em todo o mundo. Estima-se que 2,5 bilhões de pessoas não dispõem de saneamento adequado, das quais 884 milhões não tem acesso à água potável (UNITED NATIONS, 2010). Essas condições contribuem com a presença de contaminantes ou doenças transmissíveis pela água. No Brasil a situação também é muito preocupante, pois, a falta de saneamento básico contribui significativamente na contaminação da maioria dos aquíferos (UNIAGUA, 2015). Os agentes contaminantes comumente encontrados em aquíferos no Brasil advêm de resíduos orgânicos caseiros tratados inadequadamente e resíduos industriais, que propiciam, devido às condições climáticas, a floração de várias espécies de algas produtoras de cianotoxinas, principalmente as microcistinas (MCs) (SANT'ANNA et al, 2008). As MCs são heptapeptídeos cíclicos e tóxicos produzidos por cianobactérias do gênero *Microcystis*. Há mais de 100 variantes estruturais de MCs, cuja diferença deve-se principalmente à substituição de dois aminoácidos variáveis (PUDDICK et al, 2014). O maior acidente envolvendo humanos pela utilização de água com MCs aconteceu em 1996 em uma clínica de hemodiálise em Caruaru, quando 60 pacientes foram a óbito (POURIA et al, 1998).

Os métodos atualmente usados para a detecção, quantificação e caracterização de MCs, dentre os quais, destacamos a cromatografia líquida de alta performance acoplado a espectrometria de massa, a ressonância magnética nuclear e os ensaios imunoenzimáticos, são demorados e geralmente específicos apenas para microcistina LR, no entanto, a ausência desta, não oferece segurança para utilização da água para consumo humano, pois, outras variantes também causam danos a saúde humana. (MSAGATI et al, 2006). Isso torna necessária a busca por novos métodos para detecção e diferenciação de MCs, como demonstram os estudos envolvendo imunoenaios eletroquímicos e amperométricos (SINGH et al, 2012; WELLER, 2013).

Na última década tem se aumentado o interesse em processos bioinspirados ou biomiméticos em que se utilizam nanoestruturas biológicas como elemento de reconhecimento molecular para o desenvolvimento de uma classe inovadora de sensores, cujo mecanismo de funcionamento se baseia em nanoporos individuais dotados com a capacidade de biossensoriamento estocástico. O biossensoriamento estocástico é uma abordagem que se baseia na observação de eventos de ligação entre as moléculas individuais de analitos e um único receptor (AGUIAR et al, 2015). Esses eventos são identificados por um bloqueio característico na corrente iônica que flui através do nanoporo na presença do analito (WANG et al, 2013). A denominação estocástico para esse biossensoriamento é atribuída, primeiramente, em relação à série temporal aleatória de flutuações discretas registradas, devido à detecção por um único nanoporo, de cada molécula do analito, portanto as moléculas são detectadas uma a uma, ou seja, de maneira unitária ou individual. Secundariamente, o mecanismo de detecção ocorre com a entrada aleatória de cada molécula do analito em um único nanoporo, e isto é devido essencialmente à difusão molecular, ou seja, um fenômeno estocástico (AGUIAR et al, 2015).

Nanoporos individuais vem sendo estudados e mostram-se promissores para aplicação em diversas áreas, tais como sequenciamento de DNA (LU et al, 2016), detecção de cocaína (KAWANO et al, 2011), espectrômetro de massas para análise de polímeros (ROBERTSON et al, 2007), entre outras. Deste modo nesse trabalho utilizou-se o nanoporo formado pela alfatoxina de *Staphylococcus aureus*, incorporado em uma bicamada lipídica plana para a detecção e diferenciação de MCs em sistemas aquosos.

Esta tese divide-se em duas partes: um estudo experimental, utilizando o nanoporo da alfatoxina como elemento de reconhecimento molecular de MCs; e um estudo computacional, baseado em dinâmica e docagem molecular para esclarecer a natureza das interações envolvidas na formação do complexo nanoporo-MCs.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos gerais das microcistinas

2.1.1 Microcistinas: origem, estrutura e toxicidade

A atividade antrópica, decorrente principalmente do processo de industrialização, está diretamente relacionada à aceleração artificial da eutrofização de aquíferos em todo o mundo (PAERL & HUISMAN, 2008). Este fenômeno, caracterizado pelo excessivo acúmulo de matéria orgânica e elevação da concentração de nutrientes em ambientes aquáticos, especialmente nitratos e fosfatos, promove entre outros fatores, a proliferação exacerbada de cianobactérias, também denominada floração algal. As florações geralmente garantem a dominância das cianobactérias nos aquíferos, principalmente lagos e reservatórios, associada à elevada diversidade metabólica apresentada por estes microrganismos (TRINDADE & MENDONÇA, 2014). Apesar da propensão por rios, lagos e reservatórios com pH entre 6 e 9, a diversidade metabólica das cianobactérias assegura a elas elevada resistência às variações ambientais, possibilitando grande adaptabilidade aos mais diversos habitats aquáticos como oceanos e mangues, além de garantir resistência às variações de temperatura (CONLEY et al., 2009; BECK et al., 2012; MOHAMED et al., 2006).

Muitas espécies de cianobactérias produzem metabólitos, alguns dos quais são altamente tóxicos e, portanto, oferecem riscos aos organismos superiores, inclusive podendo causar sérios danos à saúde humana, comprometendo desta forma a qualidade dos recursos hídricos quanto à potabilidade da água (SCHMIDT et al., 2014). Trata-se das cianotoxinas, cuja presença em ambientes aquáticos é uma preocupação global, mas no Brasil, devido à escassez de esgotos tratados e o fato do seu território estar localizado em região tropical, a preocupação é ainda mais acentuada, devido ao avançado estágio de eutrofização (SANT'ANNA et al., 2008).

Levando em consideração as propriedades toxicológicas, podemos classificar as cianotoxinas em neurotóxicas (anatoxina-A, saxitoxina),

hepatotóxicas (microcistina, nodularina, cilindrospermopsina), promotoras de tumor (MCs e lipopolissacarídeos) ou irritantes ao contato, também chamadas de dermatotoxinas (lingbatoxina-A, apisiatoxina e lipopolissacarídeos) (MSAGATI et al, 2006). Em relação à estrutura química as cianotoxinas podem ser classificadas em peptídeos monocíclicos (microcistina, nodularina), alcalóides (neurotoxinas, cilindrospermopsina) e lipopolissacarídeos (DÖRR et al, 2010).

Dentre as cianotoxinas, as MCs destacam-se por serem as mais frequentemente encontradas na natureza e também as mais estudadas (PUDDICK et al, 2014). As MCs são heptapeptídeos monocíclicos produzidos por diversas espécies do gênero *Microcystis*. A Figura 1 apresenta a estrutura molecular básica para uma MC (D-Ala-X-D-MeAsp-Z-Adda-D-Glu-Mdha), onde a substituição dos aminoácidos nas posições X e Z (aminoácidos 2 e 4, respectivamente), ou metilação dos radicais R1 e R2, possibilitam a existência de mais de 100 variantes dessas toxinas (PUDDICK et al, 2014; SINGH et al, 2012). As mais conhecidas são MC-LR; MC-RR; MC-YR e MC-LA (CHORUS, 2002). Adda, é o ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-deca-4,6-dienóico, foi determinado como um dos principais grupamentos responsáveis pela atividade hepatotóxica dessas toxinas (NISHIWAKI-MATSUSHIMA et al, 1992).

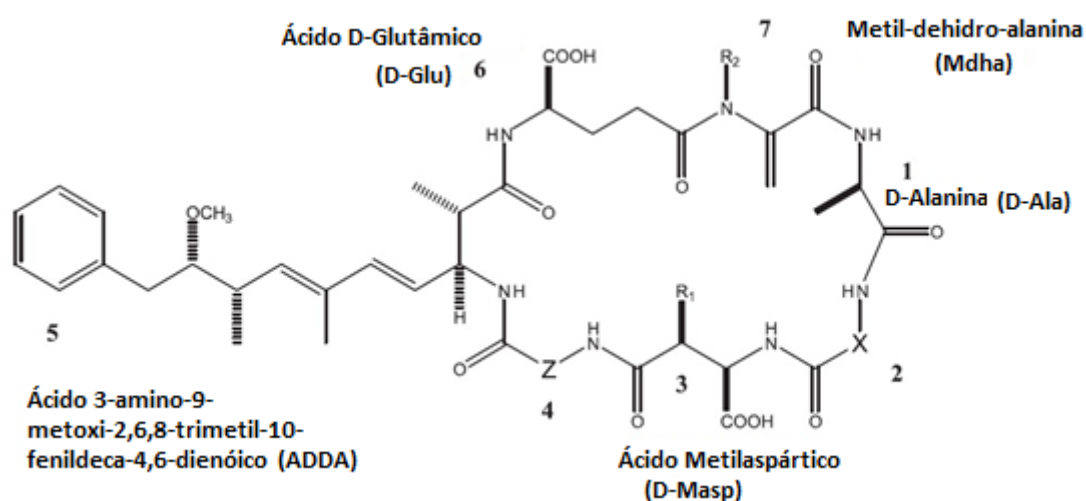


Figura 1. Representação estrutural das MCs. Os radicais X e Z são os aminoácidos variáveis. Adaptado de JASIONEK et al, 2010.

Apesar da extensa variedade de MCs, a MC-LR é a mais estudada, pois se apresenta com maior frequência na natureza e possui maior toxicidade (HERRANZ et al, 2010). Além disso, a MC-LR foi a primeira quimicamente identificada e tem sido associada à maioria dos incidentes envolvendo MCs (SINGH et al, 2012). Dentre os danos causados pelas MCs, destaca-se a sua ação específica no fígado (GEHRINGER 2004), fator por meio do qual se justifica a denominação destas toxinas como hepatotoxinas.

Em casos agudos, o envenenamento por MCs pode causar morte rápida em humanos e animais, resultante de hepatomegalia e necrose dos hepatócitos, que evolui para hemorragia intra-hepática e consequentemente morte. Após a ingestão, a MC é levada ao interior dos hepatócitos por um carregador protéico aniônico denominado polipeptídeo transportador de ânions orgânicos (FISCHER et al, 2005). No fígado, ela inibe as proteínas fosfatases tipo 1 e 2A (PP1 e 2A), gerando assim fosforilação excessiva dos filamentos estruturais (filamentos intermediários e de actina) das células hepáticas (PEARSON 2010). Isso causa comprometimento citoesquelético e consequente desorganização da ultraestrutura hepática. Esta desorganização leva a uma retração dos hepatócitos, provocando a perda de contato entre eles e com as células que formam os capilares sinusoidais. Como consequência, o fígado perde sua arquitetura e desenvolve graves lesões internas, resultando em dano tecidual local e consequente choque hemorrágico (GEHRINGER 2004).

O maior acidente envolvendo humanos, pela utilização de água contaminada com MCs, ocorreu em 1996 em uma clínica de hemodiálise na cidade de Caruaru em Pernambuco, Brasil. Neste acidente, 126 pacientes desenvolveram sinais e sintomas característicos de envenenamento por cianotoxinas, dentre os quais 60 morreram (POURIA et al, 1998).

2.1.2 Principais métodos de detecção

Muitos métodos analíticos e bioanalíticos são utilizados atualmente para o monitoramento de MCs. No entanto, tendo em vista o potencial de aplicação

no monitoramento ambiental de rotina, esses métodos são limitados (SINGH et al, 2012).

Dentre os métodos bioanalíticos, destacam-se os bioensaios com camundongos, culturas de células, plantas e extratos de plantas, ensaios enzimáticos e ensaios imunoenzimáticos. Bioensaios em camundongos, culturas de células e plantas são métodos que avaliam a bioatividade da toxina, tal como hepatotoxicidade e citotoxicidade. Apesar de ser um método rápido para o monitoramento de cianotoxinas, o bioensaio em camundongos possui baixas: especificidade, sensibilidade e capacidade de diferenciação entre variantes estruturais. Essas limitações apresentam-se também nos bioensaios com cultura de células e plantas. (AGRAWAL et, al 2012; SINGH et al, 2012).

Os métodos de inibição da proteína fosfatase são baseados na habilidade que as MCs possuem em inibir as enzimas proteínas serina-treonina fosfatases. Outra técnica muito usada para a detecção de MCs é o Ensaio de Imunoabsorção enzimática (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA), que difere do último método pela adição de anticorpos, o que pode aumentar a especificidade e a sensibilidade do ensaio (CAMPA`S & MARTY, 2006; SINGH et al, 2012). Apesar dos métodos baseados na inibição da proteína fosfatase apresentarem sensibilidade e especificidade satisfatórias, as variantes de MCs inibem a proteína fosfatase com intensidades diferentes. Além disso, os ensaios de imunoabsorção enzimática podem apresentar reações cruzadas e ainda não há anticorpos comercialmente disponíveis para todas as variantes de MCs (SANGOLKAR et al, 2006; AGRAWAL et, al 2012).

Como previamente mencionado, métodos analíticos, também conhecidos como métodos físico-químicos, são intensamente utilizados hoje para detecção, caracterização e quantificação de MCs. Dentre eles, podemos destacar a cromatografia líquida de alta performance (HPLC), a espectrometria de massas (EM) e a ressonância magnética nuclear (RMN). O HPLC é utilizado para separar o analito (MCs) dos demais componentes da amostra e, para a detecção do analito, geralmente faz-se necessário acoplá-lo a técnicas de detecção, tal como espectroscopia de ultravioleta (MSAGATI et al, 2006). Embora seja um método muito utilizado, a principal desvantagem da HPLC

consiste na impossibilidade de diferenciação, quando na amostra há mais de uma variante estrutural de MCs, além da ausência de padrões específicos e a necessidade de pessoal altamente qualificado, o que pode inviabilizar sua ampla utilização de forma rotineira e em grande escala (LAWTON et al, 1994). O HPLC também pode ser acoplado à Espectrometria de Massas (HPLC-MS), cuja vantagem baseia-se na capacidade de diferenciar as variantes de MCs por sua razão massa/carga, bem como pelo tempo de voo (GRAVES AND HAYSTEAD, 2002). Dentre as limitações do HPLC-MS para a detecção e quantificação de MCs, podemos destacar o fato de ser um método oneroso que requer processos de extração, oxidação e pós-tratamento, de modo a eliminar os reagentes da derivatização (processo geralmente utilizado para aumentar a sensibilidade do método) (MSAGATI et al, 2006). O método baseado em RMN tem sido útil principalmente no que diz respeito à elucidação da estrutura química das MCs, no entanto, requer amostras com elevado grau de pureza e em grandes quantidades. A tabela 1 possui uma breve descrição entre os principais métodos, suas vantagens e limitações.

Atualmente, há uma grande busca por novos métodos que superem as limitações apresentadas pelas técnicas supracitadas (SINGH et al., 2012), portanto, neste trabalho avaliou-se o uso do biossensoriamento estocástico baseado no nanoporo da alfatoxina de *Staphylococcus aureus*.

TABELA 1. Vantagens e desvantagens dos principais métodos atualmente utilizados para o monitoramento de MCs em meios aquosos.

MÉTODO	VANTAGENS	DESVANTAGENS
Bioensaios com Ratos	Método rápido e reprodutível	Muito baixa sensibilidade, precisão e problemas éticos
Ensaio com Proteína fosfatase	Sensível e pode ser usado antes e após o tratamento da amostra	Falso positivos e negativos
ELISA	Sensibilidade adequada fácil operação e rapidez	Reações cruzadas e ausência de anticorpos para todas as variantes
HPLC-MS	Elevada precisão na identificação e elevada sensibilidade	Oneroso, requer processo de extração, oxidação e pessoal bem treinado
RMN	Permite determinação estrutural das MCs	Requer elevado grau de pureza da amostra e alta concentração de MC

2.2. Nanoporo da Alfa-toxina como Biossensor Estocástico

Biossensores são dispositivos analíticos compostos por um material biológico ou derivado de um material biológico (biomimético), diretamente associado ou integrado a um transdutor físico-químico, o qual pode ser óptico, eletroquímico, termoeletrônico, piezoeletrônico ou magnético (THÉVENOT et al., 2001; BELLUZO et al., 2008). Esquematicamente, o funcionamento de um biossensor pode ser representado por três etapas (Figura 2).

A etapa de reconhecimento biológico caracteriza-se pela interação entre o analito e o elemento sensor, que pode ser formado por um componente biológico (receptor, enzima, anticorpo, ácido nucleico, nanoporo, entre outros). O produto desta interação é a alteração de uma ou mais propriedades físico-químicas do elemento sensor, como transferência de elétrons, mudança de pH, liberação de íons, etc (THÉVENOT et al., 2001).

Na etapa de transdução, o resultado da interação analito-elemento sensor é convertido em um sinal mensurável. Desta forma, é gerado um sinal eletrônico proporcional à concentração do analito presente. Durante a etapa de processamento, o sinal proveniente do transdutor é processado e amplificado, gerando assim uma resposta passível à leitura e interpretação por meio da utilização de um programa adequado (THÉVENOT et al., 2001).

Os biossensores podem ser classificados levando em consideração aspectos como: mecanismo de detecção, de transdução e também a interação entre o analito e o elemento sensor (elemento de reconhecimento). Assim, em relação à natureza do elemento de reconhecimento, podemos classificá-los em biossensores baseados em sistemas vivos, biossensores baseados em células íntegras, biossensores baseados em enzimas, biossensores baseados em anticorpos e biossensores baseados em receptores de membrana. Considerando o tipo de transdutor empregado, os biossensores podem ser classificados em: eletroquímico, óptico, piezoeletrônico, e termométrico. Por fim, os biossensores também podem ser classificados quanto ao mecanismo de interação da molécula imobilizada com o analito. Assim, eles são classificados

em: biossensores catalíticos e de afinidade (THÉVENOT et al., 2001; KISSINGER, 2005).

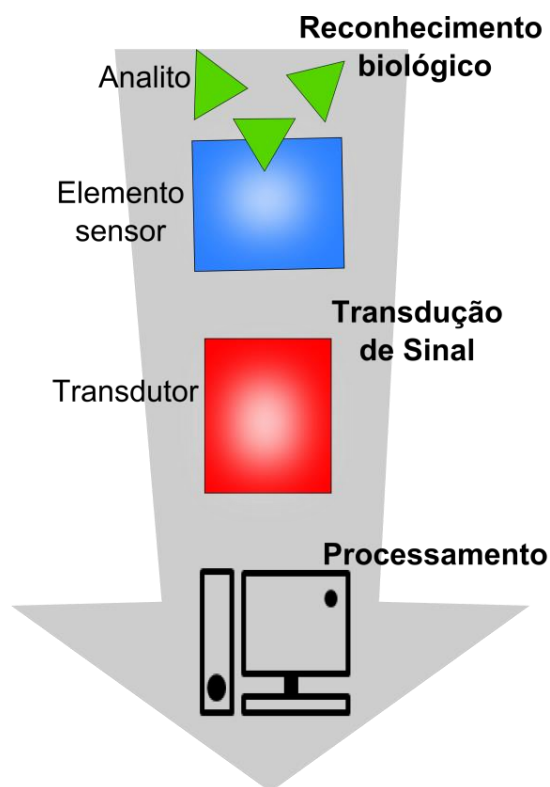


Figura 2. Esquema geral das etapas e componentes de um biossensor. A interação do analito com o elemento sensor gera um sinal que é transformado e processado até que se torne passível de interpretação.

Na última década uma nova modalidade de sensoriamento tem se destacado como proposta para confecção de dispositivos analíticos – são os sensores estocásticos baseados em nanoporos (AYUMI et al., 2008; BELKIN et al., 2013). Nesta metodologia um nanoporo natural ou sintético compõe o elemento sensor (WANG et al, 2013; AGUIAR et al, 2015).

A alfatoxina, também chamada alfa-hemolisina (α -HL), é uma citolisina secretada pela bactéria *Staphylococcus aureus*, dotada da capacidade de formar poros aquosos de dimensões nanométricas tanto em membranas biológicas quanto em bicamadas lipídicas artificiais (KRASILNIKOV et al, 2000). Esta proteína possui peso molecular em torno de 33 kDa e é liberada na forma de monômeros de polipeptídeos de 293 aminoácidos solúveis em água (GRAY et al, 1984). Embora seja um processo não totalmente compreendido,

os monômeros se inserem em membranas e então se oligomerizam para formar o nanoporo heptamérico, permitindo a passagem de água e a interação de diversas moléculas com a sua parede interna (KRASILNIKOV et al, 2000; WADE e al., 2015).

Como mostrado na Figura 3, o nanoporo formado pela alfatoxina apresenta três domínios bem definidos, o copal com diâmetro de 4,6 nm que fica praticamente fora da membrana, o troncular que se insere na membrana e tem diâmetro de aproximadamente 2,6 nm, e o domínio anelar, que é representado pela parte ancorada na membrana. É composto por 14 folhas β -barril. Estes dois domínios estão separados por uma constrição de aproximadamente 1,4 nm de diâmetro (SONG et al.,1996).

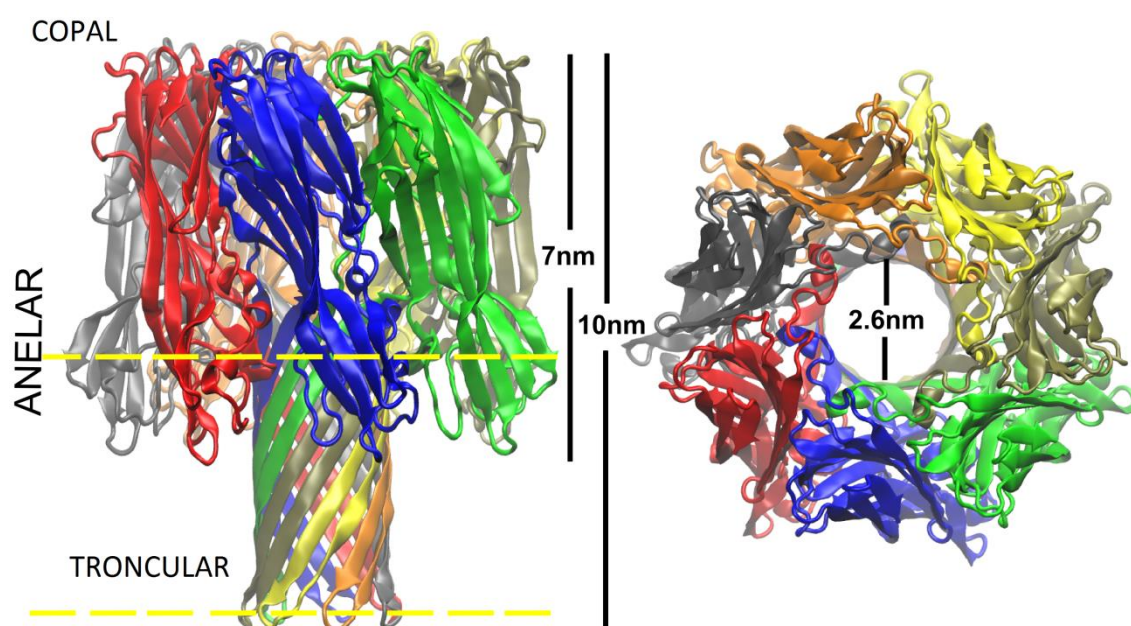


Figura 3. Modelo do nanoporo formado pela alfatoxina com domínios, dimensões e entradas (CIS, TRANS) em relação à membrana. Membrana representada pela linha tracejada em amarelo. Visualização obtida a partir do VMD, PDB ID 7AHL.pdb, Adaptado de SONG et al, 1996.

O valor de diâmetro da constrição é semelhante à dimensão da maioria das moléculas, portanto, isto é uma das características que propicia a utilização da α -hemolisina como ferramenta de detecção e caracterização de diversos tipos de analitos (DNA, RNA, peptídeos, proteínas, polietilenoglicol, etc...) em meio aquoso. Além disso, a sua ampla variedade de modificação estrutural

favorece a adequação do nanoporo ao analito de escolha (SONG et al., 1996; BRAHA et al, 1997; GU et al, 1999; BAYLEY & CREMER, 2001; KASIANOWICZ et al, 2001; ASTIER et al., 2005; AGUIAR et al, 2015).

Adicionalmente, a estabilidade proteica e condutância elevada, aliadas à facilidade de incorporação em membranas artificiais, são fatores que tornaram o nanoporo da alfatoxina um adequado “protótipo” de nanoporo protéico para o estudo do particionamento dinâmico de polietilenoglicol (PEG) (KASIANOWICZ et al, 2002; ROBERTSON et al, 2012; MACHADO et al, 2016), peptídeos e proteínas (MOVILEANU et al., 2005; MOVILEANU 2014) e ácidos nucleicos (BEZRUKOV et al., 2004)

O princípio de funcionamento biossensor baseado no nanoporo da alfatoxina está esquematicamente mostrado na Figura 4. Considere um único poro incorporado numa bicamada lipídica que separa dois compartimentos com solução salina. Quando um potencial é aplicado, uma corrente iônica máxima flui através do poro carregada pelos íons presentes na solução salina. Na situação mais simples, considere que o nanoporo contém um sítio de ligação para o analito, podendo existir dessa forma dois estados: ocupado pelo analito e não ocupado. Cada vez que o analito ocupa o lume (estado ocupado), induz uma modulação (evento de bloqueio), diminuindo a corrente iônica máxima. Desta forma, notam-se dois valores médios de corrente iônica, uma para cada estado. (RODRIGUES, 2006). A frequência da ocorrência dos eventos está relacionada com a concentração do analito, enquanto que a série temporal deles, serve de “assinatura digital” para a identificação do analito.

Os intervalos de tempo de duração do bloqueio podem ser descritos por uma distribuição exponencial, cuja constante de ajuste é definida como o tempo característico de bloqueio (τ_{off}). A amplitude de bloqueio, juntamente com o valor do τ_{off} , representam a assinatura digital de cada analito. Adicionalmente, a concentração do analito pode ser quantificada pela frequência dos bloqueios, operacionalmente determinada por meio dos intervalos de tempo os bloqueios sucessivos. Os intervalos de tempo entre os bloqueios são descritos por uma distribuição exponencial, cuja constante de ajuste representa os intervalos médios de bloqueio (τ_{on}). O inverso da τ_{on}

$(1/\tau_{on})$ corresponde à frequência de eventos de bloqueio, que é proporcional à concentração do analito. Portanto, a cinética entre o estado ocupado e não ocupado possibilita a obtenção de informações que permitem identificar e quantificar o analito (KASIANOWICZ, 2008; AGUIAR et al, 2015).

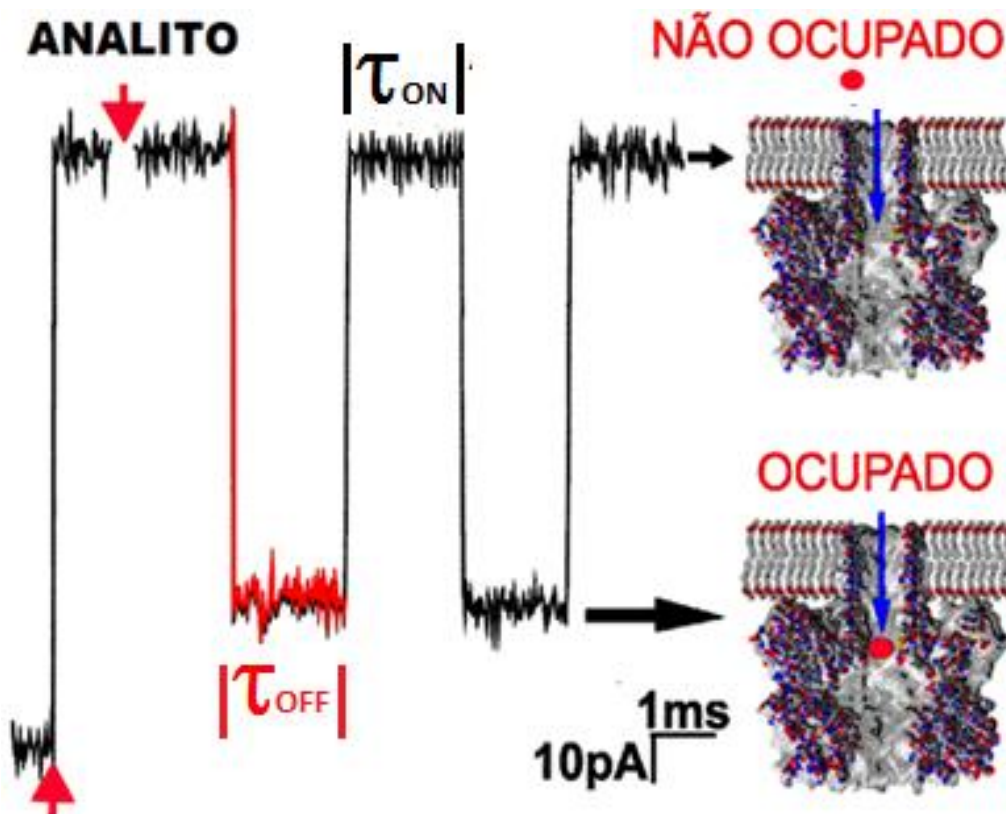


Figura 4. Registro de corrente e esquema da alfatoxina como biossensor.

A interação de um único nanoporo com o analito (estado ocupado) induz bloqueios característicos na corrente iônica através do canal. A corrente é maior na ausência do analito no interior do canal (não ocupado) e menor com a sua presença no lume aquoso (ocupado). A frequência dos eventos de bloqueio correlaciona-se com a concentração do analito, e o traçado de corrente permite sua identificação. A seta em vermelho direcionada para cima indica a aplicação de potencial. A seta em vermelho direcionada para baixo indica a adição do analito. As setas em azul indicam o sentido de movimentação do analito, adaptado de RODRIGUES, 2006.

2.3 Simulações por Docagem, Dinâmica Molecular e Cálculo do Potencial Eletrostático

A aplicação de métodos computacionais ao estudo de biomoléculas é procedimento cada vez mais rotineiro e importante para a compreensão de diversos processos e mecanismos biológicos, tais como o mecanismo molecular do funcionamento de canais iônicos (MAFFEO et al, 2012). O método de dinâmica molecular é amplamente utilizado para o estudo de macromoléculas biológicas, em virtude da possibilidade de aplicação deste método a sistemas com um grande número de átomos e em presença de solvente explícito. Para isso o método de dinâmica molecular faz uso da Mecânica Newtoniana e de uma função de energia potencial empírica para calcular as interações atômicas, reduzindo assim o requerimento computacional comparativamente a métodos de Mecânica Quântica (KARPLUS & MCCAMMON, 2002; DURRANT & MCCAMMON, 2011; MAFFEO et al, 2012).

Nas simulações de dinâmica molecular, resumidamente os átomos são representados como partículas pontuais, sobre as quais a temperatura fornece a energia para que sofram aceleração e variem sua posição no espaço conforme predito pela 2ª Lei de Newton, cuja equação 1 é descrita abaixo, onde i é referente ao átomo, x é a posição, t é o tempo e v é a velocidade adquirida pelo átomo i . Deste modo, a força exercida dependerá da massa e da posição de cada átomo, variando no tempo. Como consequência, observa-se uma sucessão de diferentes posições dos átomos em função do tempo, garantindo a amostragem conformacional do sistema ao longo tempo, o que se denomina trajetória (VERLI, 2014).

$$F(x_i) = \frac{d^2x_i}{dt^2} m_i = \frac{\Delta V_i}{\Delta t} m_i = a_i m_i$$

Equação 1

Os átomos variam sua posição em função da energia fornecida pela temperatura, no entanto eles estão ligados uns aos outros formando moléculas.

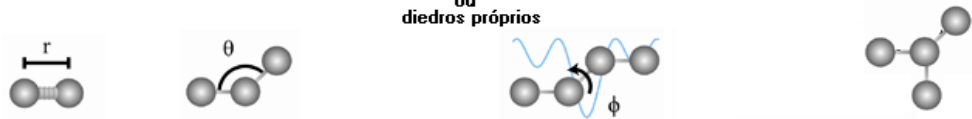
Isso os torna susceptíveis a interações interatômicas e intermoleculares (no caso das interações entre moléculas), fazendo-se necessário o cálculo destas forças por meio da função matemática denominada campo de força, como ilustrado na Figura 5 (DURRANT & MCCAMMON, 2011). De forma sucinta, o campo de força é composto basicamente por um conjunto de forças decorrentes das interações entre átomos ligados e não ligados, o que na Figura 5 é dividido em: termos ligados e não ligados. Estes termos visam reproduzir aspectos do comportamento molecular. Os termos ligados compreendem ligações, ângulos e diedros (rotação dos planos formados por 4 átomos). A equação que corresponde à ligação é determinada pelo estreitamento de ligações, onde $(b-b_0)$ é o estreitamento entre os átomos e K_b é a constante de força de ligação. A equação que corresponde ao ângulo é determinada pela deformação do ângulo θ formado por dois átomos e K_θ é a constante de força do ângulo. A equação que modela a variação do diedro é determinada por uma função senoidal de torção do diedro, representado na figura por Φ e os impróprios são representados por ϕ . Os termos não ligados surgem devido essencialmente a duas interações: van der Waals, que são modeladas usando o potencial de Lennard-Jones; e interações eletrostáticas, que são modeladas usando a lei de Coulomb (LEACH 2001, DURRANT AND MCCAMMON 2011, MAFFEO et al 2012, BAŞTUĞ & KUYUCAK 2012).

Os campos de força utilizados em simulações de dinâmica molecular estão em constante aprimoramento e sendo validados para aplicações em sistemas cada vez mais diversos, com moléculas de naturezas diferentes (um único sistema contendo proteína, membrana, ácido nucléico, íons e água). Além da diversidade quanto à natureza, os algoritmos podem ser aplicados a sistemas complexos, com grande número de partículas, como proteínas de membrana, glicoproteínas e oligossacarídeos que possuem alta flexibilidade (Oostenbrink et. al., 2005; Rusu et al., 2014).

O aumento do poder computacional atualmente viabiliza o estudo, por técnicas de dinâmica molecular, de biomoléculas, tais como canais iônicos e ribossomos, nos quais o número total de partículas do sistema ultrapassa 2.000.000 de átomos, (SOTHISELVAM et al., 2014), num tempo de simulação

que pode chegar a microssegundos (SHAW et al., 2010). No entanto, apesar dos avanços, o campo de força e o custo computacional das simulações de Dinâmica Molecular ainda constituem aspectos limitantes desta metodologia (VAN GUNSTEREN et al 2006, BERNARDI et al 2015).

Termos Ligados

$$\sum_{\text{ligações}} K_b (b - b_o)^2 + \sum_{\text{Ângulos}} K_\theta (\theta - \theta_o)^2 + \sum_{\substack{\text{torções} \\ \text{ou} \\ \text{diedros próprios}}} K_\phi (1 + \cos(n\phi - \delta)) + \sum_{\text{impróprios}} K_\varphi (\varphi - \varphi_o)^2$$


Termos não Ligados

$$\sum_{\text{eletrostáticos}} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} + \sum_{\text{VDW}} \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{R_{\min,ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{\min,ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right]$$


FIGURA 5. Exemplo de equações de um campo de força utilizado em métodos de dinâmica molecular. Os termos são divididos em ligados e não ligados. Os termos ligados compreendem ligações, ângulos, diedros próprios e impróprios. Adaptado de DURRANT and McCAMMON, 2011.

Interações eletrostáticas desempenham um papel importante nos processos biológicos, tais como interação de peptídeos antimicrobianos com a membrana das células bacterianas, movimento dos microtúbulos durante a divisão celular e outros (RAVI et al., 2013; GAGLIARDI and SHAIN, 2014). Levando em consideração que as biomoléculas contêm grupos carregados (por exemplo, resíduos de aminoácidos carregados e grupos fosfatos), há formação de um campo elétrico ao redor da biomolécula. Operacionalmente, este campo pode ser representado pelo mapa de potencial eletrostático, caracterizado por um gradiente de cor variando de regiões mais positivas (cor azul) às regiões

mais negativas (cor vermelha) da molécula, passando por regiões neutras (cor branca), como mostrado na Figura 6.

Os métodos computacionais para o cálculo dos potenciais eletrostáticos podem se basear em algoritmos com duas abordagens: os que calculam o potencial eletrostático resolvendo a equação de Coulomb e os que resolvem a equação de Poisson-Boltzmann (HONIG & NICHOLLS, 1995). No primeiro caso, apesar de ser um cálculo rápido, há insuficiência na precisão, pois apenas uma única constante dielétrica é aplicada para o interior da proteína e para o solvente. A segunda abordagem leva em consideração as diferentes propriedades dielétricas da proteína e do solvente, obtendo assim uma visão mais acurada do potencial eletrostático da proteína em meio aquoso (HONIG and NICHOLLS, 1995; SOARES et al., 2004; DIAS et al., 2014). O cálculo de mapas de potencial eletrostático permite avaliar a ocorrência de atração ou repulsão eletrostática no sistema.

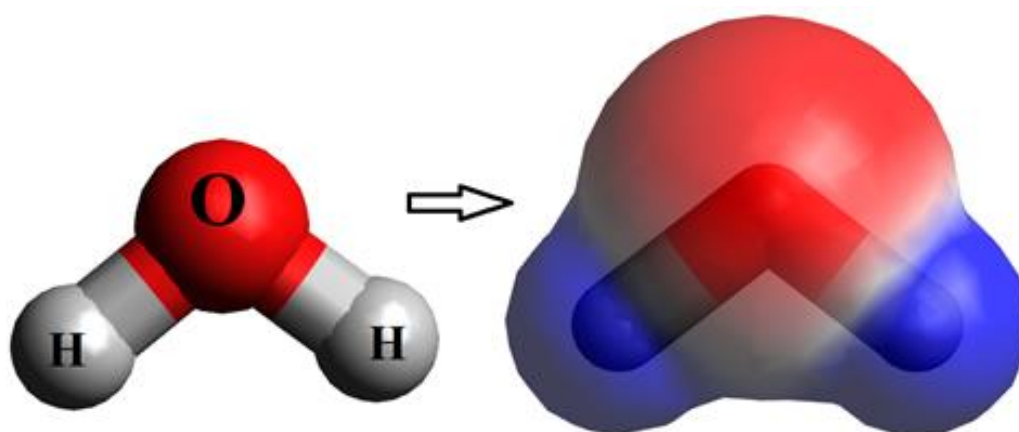


FIGURA 6. Representação da molécula da água. Antes (esquerda) e após (direita) o cálculo do potencial eletrostático da água, realizado no software Avogadro (HANWELL et al., 2012), que se baseia na resolução da equação de Coulomb.

Docagem molecular é uma das abordagens *in silico* mais utilizadas devido principalmente ao baixo custo computacional e à ampla faixa de aplicações em eventos de reconhecimento molecular, tais como energética de ligação, interações intermoleculares e mudanças conformacionais induzidas. Geralmente essa técnica é utilizada para o estudo das interações entre

proteínas e ligantes, no entanto já há trabalhos mostrando a eficácia da técnica no estudo das interações proteína-proteína e proteína-ácido nucléico (ZACHARIAS, 2010). A docagem molecular permite que sejam avaliados os modos de ligação de um ligante em um local de uma macromolécula alvo, bem como as correspondentes interações intermoleculares que estabilizam a formação do complexo ligante-macromolécula (REIS, 2008).

O processo de docagem molecular pode ser descrito como um problema de otimização de ajuste de formas moleculares, desse modo, ele pode ser dividido essencialmente em duas partes: determinar qual a conformação do ligante no sítio de interação e avaliar entre todas as conformações possíveis qual a melhor ranqueada, baseado na afinidade de ligação do complexo ligante-macromolécula. Essa última etapa pode ser realizada através de cálculos de energia potencial, obtidos através de funções de pontuações, que correspondem às interações intermoleculares (FERREIRA et al, 2015). Desta forma a técnica oferece as coordenadas do ligante de melhor solução (menor energia livre), como ilustrado na Figura 7. A docagem pode ser rígida ou flexível. No primeiro caso (Figura 7), apenas os movimentos de translação e rotação do ligante são considerados. Na abordagem flexível, além dos graus de liberdade rotacional e translacional, exploram-se também os ângulo diedros do ligante, o que aumenta significativamente o número de soluções e o tempo do cálculo.

Operacionalmente os passos do processo de docagem consistem em: obtenção e preparação das estruturas tridimensionais da macromolécula e do ligante, submissão do ligante às funções de pontuação de acordo com a variação dos graus de liberdade previamente descritos e obtenção das melhores soluções, de acordo com o algoritmo utilizado para escolher as soluções (Ferreira et al, 2015), como descrito na Figura 8.

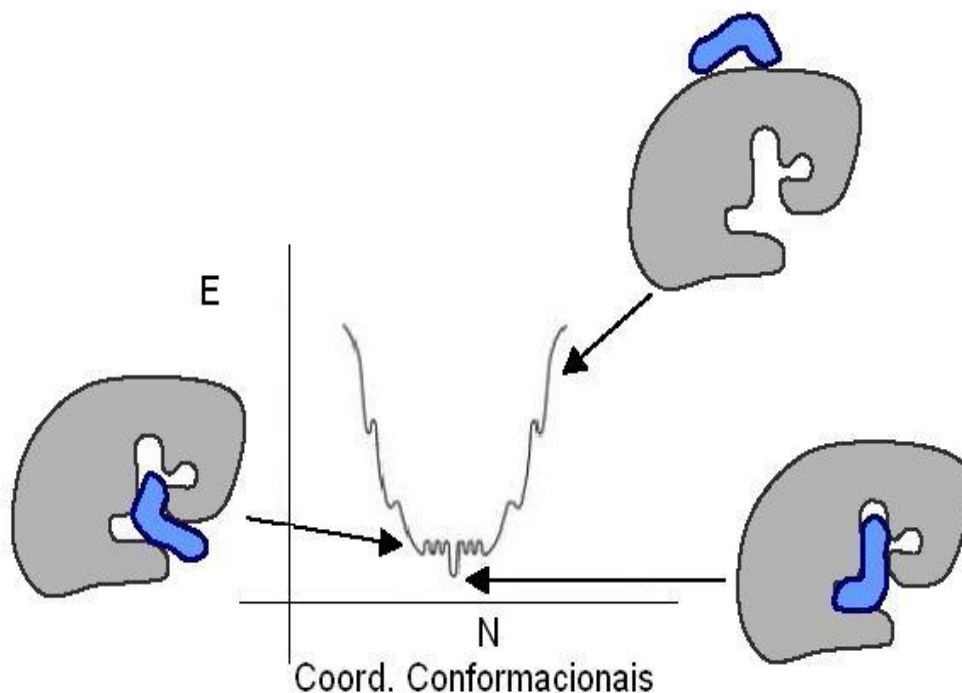


FIGURA 7. Gráfico da energia em função da conformação. A mínima energia representa o melhor resultado macromolécula-ligante em um caso de docagem rígida. Retirado do REIS, 2008.

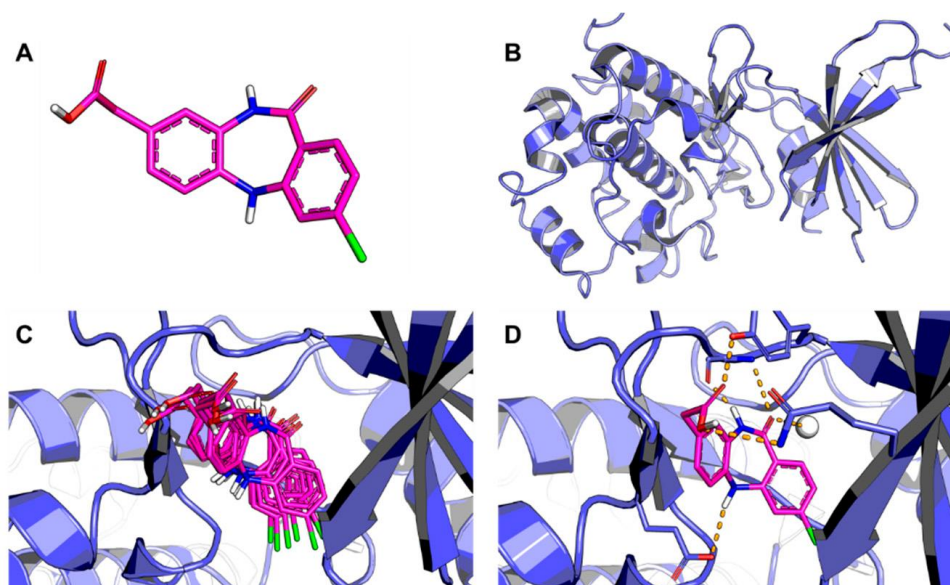


FIGURA 8. Arcabouço do processo de docagem. A) (Estrutura tridimensional do ligante; (B) Estrutura tridimensional da macromolécula; (C) ligante é ancorado no sítio de ligação da macromolécula e as supostas conformações são exploradas; (D) as soluções de menor energia, bem como as interações intermoleculares correspondentes são identificadas. A espinha dorsal da macromolécula é representada em cartoon. O ligante (rosa) é representado em vareta. Linhas tracejadas indicam ligações de hidrogênio. Retirado de FERREIRA et al, 2015.

3 JUSTIFICATIVA

As MCs são toxinas produzidas por cianobactérias em ambientes aquosos e sua presença em níveis superiores a 1 µg/L inviabiliza a potabilidade da água, uma vez que oferece grandes riscos à saúde humana. Adicionalmente os métodos empregados para detecção de MCs são onerosos, demorados e limitados principalmente no aspecto de diferenciação de variantes, que são igualmente danosas à saúde humana. O nanoporo da alfatoxina apresenta vantagens que o tornam um protótipo de nanossensor estocástico ideal para a detecção de diversas moléculas, dentre as quais a capacidade de multidetecção, facilidade de adaptar sua estrutura molecular e sua elevada estabilidade molecular se destacam. Até onde sabemos, há apenas um relato demonstrando o que nanoporo da alfatoxina é capaz de detectar microcistina, porém, não esclarece o mecanismo pelo qual ocorre a diferenciação das diversas variantes estruturais (RODRIGUES et al, 2013). Deste modo neste trabalho além da abordagem experimental para estudar a interação MC-nanoporo; empregaram-se também simulações por docagem e por dinâmica molecular visando melhor entendimento do processo da detecção e diferenciação de MCs em meio aquoso.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Investigar o mecanismo molecular do processo de detecção e diferenciação de microcistinas pelo nanoporo da alfatoxina de *Staphylococcus aureus*.

4.2 Específicos

- Determinar experimentalmente os parâmetros biofísicos da interação das MCs LR, RR e YR com o nanoporo da alfatoxina.
- Identificar via metodologias computacionais os grupamentos envolvidos nas potenciais interações entre as MCs LR, RR, YR e o nanoporo da alfatoxina.

5 METODOLOGIA

5.1 Bicamadas lipídicas planas e incorporação do nanoporo da alfatoxina

Todas as bicamadas lipídicas planas foram confeccionadas conforme adaptações na técnica de MONTAL & MUELLER, 1972. Esta técnica consiste basicamente na formação de uma bicamada lipídica por aposição de dois filmes monomoleculares de lipídeo, no orifício ($\sim 80\mu\text{m}$ de diâmetro) de uma partição de Teflon[®] (Politetrafluoretileno) que separa dois compartimentos (CIS e TRANS) de uma câmara experimental (Figura 7A), também de Teflon[®], contendo soluções aquosas. Os filmes monomoleculares de lipídeo foram obtidos a partir da deposição de $\sim 10\ \mu\text{L}$ de uma solução de lipídeo 2% (p/v) em hexano (Merck) sobre as soluções aquosas (KCl 4M, TRIS 5 mM, pH 7.5 ajustado com ácido cítrico). Decorridos 10 minutos, com a evaporação do hexano, ocorre a formação espontânea dos filmes lipídicos monomoleculares na superfície da solução aquosa de cada compartimento. Após a formação dos filmes monomoleculares de lipídeo, o nível do líquido do compartimento “TRANS” é elevado por adição de mais solução, formando a primeira monocamada, para em seguida elevar o lado oposto (CIS) e completar a formação da bicamada (Figura 7B). A formação da membrana é monitorada usando microscópio binocular e por aumento nos valores da corrente capacitiva basal do sistema (Figura 7C). Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente de $25 \pm 2\ ^\circ\text{C}$.

Após a construção da bicamada lipídica realizamos a incorporação de um único nanoporo da alfatoxina, pela adição desta proteína à solução que banhava o lado CIS da membrana. Posteriormente adicionávamos as MCs LR, RR ou YR no compartimento TRANS da câmara experimental (Figura 8) e se monitorava a corrente iônica através do nanoporo em condições de potencial aplicado de $\pm 200\ \text{mV}$ (incremento de $20\ \text{mV}$).

Todas as soluções foram preparadas usando água ultrapura e com substâncias de altíssimo grau de pureza (99,99%). Todas as soluções foram filtradas em membranas de ultrafiltração com $0,22\ \mu\text{m}$.

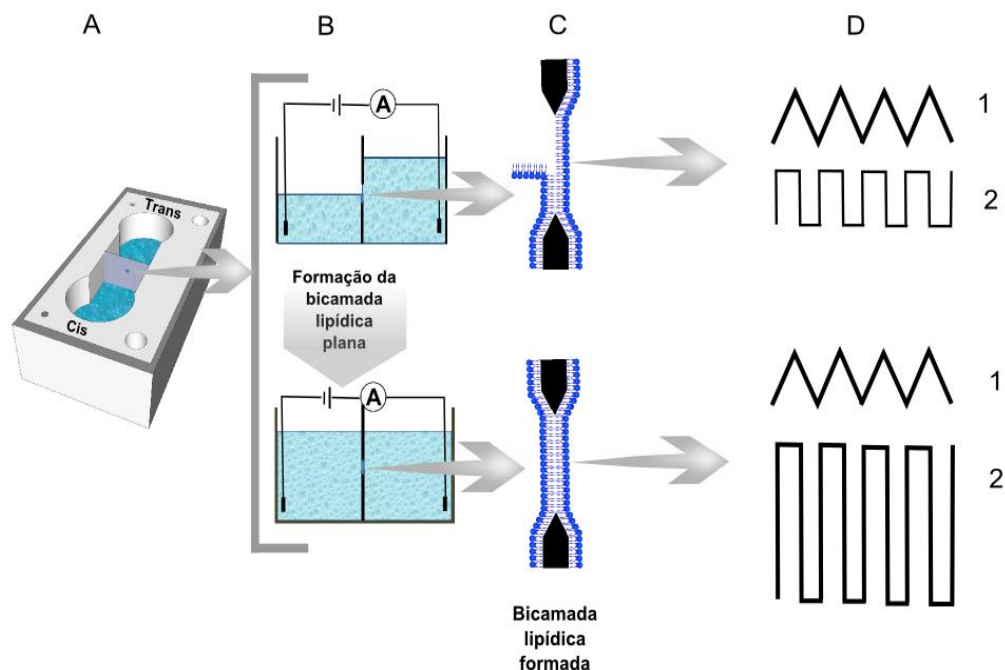


FIGURA 9. Representação esquemática da técnica de MONTAL & MUELLER, 1972. A) Câmara de Teflon[®] com indicação dos lados cis e trans. B) e C) Etapas da formação: Superior, deposição do primeiro filme lipídico e inferior, deposição do segundo filme lipídico e bicamada lipídica plana completamente formada. D) Etapas da monitoração: (1) onda triangular aplicada ao sistema e (2) resposta de corrente capacitiva do sistema.

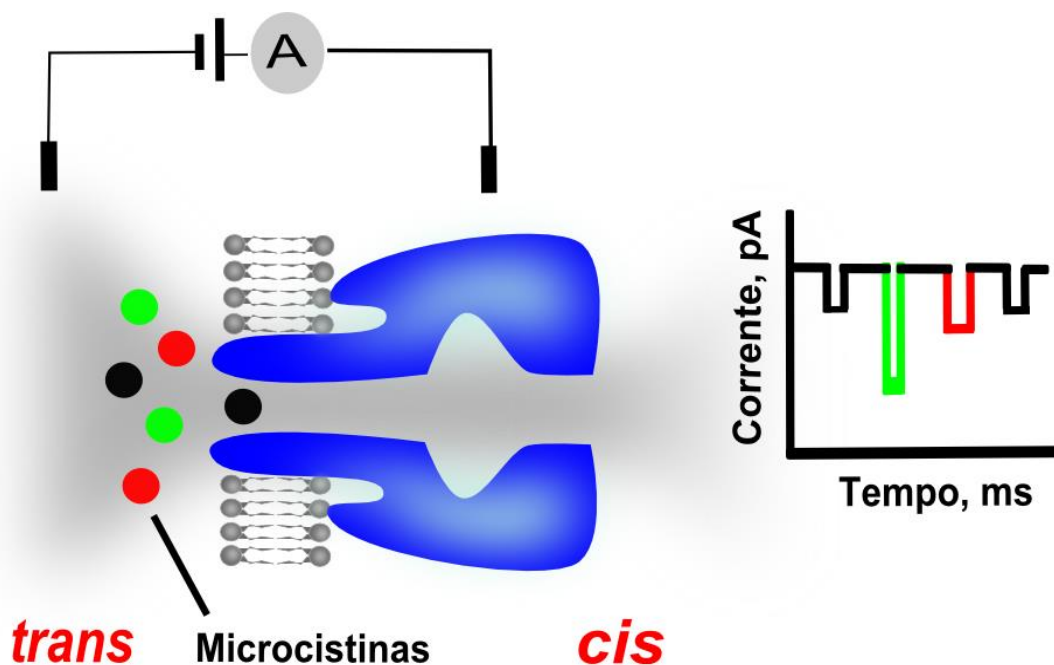


FIGURA 10. Esquema da configuração experimental. As MCs representadas como círculos coloridos são adicionados no lado TRANS. Um potencial é aplicado e cada MC terá um bloqueio característico.

Todos os lipídeos diftanoilfosfatidilcolina (DPhPC) utilizados eram sintéticos, adquiridos da Avanti Polar Lipids, USA. A alfatoxina e as microcistinas foram adquiridas da Calbiochem (USA) e WAGO (Jp), respectivamente.

Para aplicação do potencial transmembrana, monitoração e aquisição dos registros, foram utilizados um gerador de funções (Hewlett Packard, modelo 3310B), um filtro Butterworth (frequency devices, modelo 902), um amplificador de patch clamp (Axonpatch 200B) e uma placa conversora analógico-digital (Digidata 1440) acoplada a um microcomputador IBM PC, executando o programa PClamp 10 (Axon Instruments).

As interferências geradas por perturbações mecânicas e eletromagnéticas foram minimizadas por meio da utilização de uma mesa de amortecimento de alto desempenho (TCM 63-500) e uma gaiola de Faraday de alta eficiência, respectivamente. A conexão entre as soluções contidas em cada compartimento da câmara experimental ao sistema eletrônico de monitoramento e aquisição das correntes iônicas através do nanoporo, foi realizada por meio de pontes salinas do tipo Ágar-KCl (3% em peso de Ágar em KCl 3M) e eletrodos de prata-cloreto de prata (Ag/AgCl).

Operacionalmente, utilizamos o programa TauHist (desenvolvido por Dr. M.A. Pustovoit; Petersburg, Nuclear Physics Institute, Gatchina, Russia), para obter os tempos médios de permanência (τ_{on}) e interbloqueio (τ_{off}), caracterizados pelos estados bloqueado e não bloqueado do nanoporo respectivamente. A partir dos valores médios de τ_{on} e τ_{off} , obtemos informações cinéticas e termodinâmicas das interações entre o nanoporo e as MCs, tais como as constantes da velocidade de entrada (K_{on}) e saída das moléculas k_{off} e, também, a constante de equilíbrio de formação do complexo nanoporo-MC (K_f) e por fim o valor das energias de interação aparente (ΔG) das MCs com o nanoporo (RODRIGUES et al., 2008; COLQUHOUN & SIGWORTH, 2009), como representado na **Figura 9** e nas equações 2, 3 4 e 5.

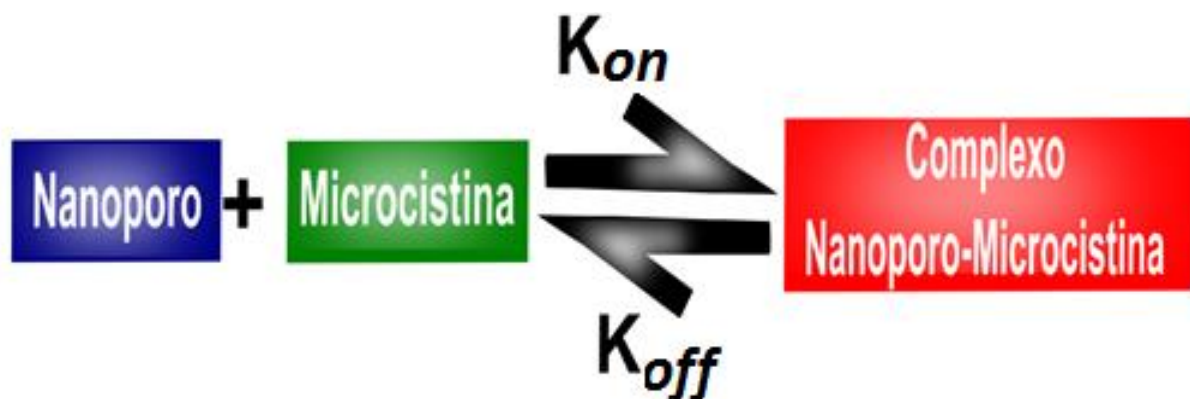


FIGURA 11. Esquema mostrando a reação de equilíbrio que ocorre entre o nanoporo e uma dada MC.

A constante de associação é descrita por $K_{on} = 1/(\tau_{on} \times C_m)$ (Eq. 2)

A constante de dissociação é descrita por $K_{off} = 1/\tau_{off}$ (Eq. 3)

A constante de formação é descrita por $K_f = K_{on} / K_{off}$ (Eq. 4)

A energia de interação aparente é descrita por $\Delta G \sim KT \ln K_f$ (Eq. 5)

Onde:

K_{on} é a constante de associação;

K_{off} é a constante de dissociação;

C_m é a concentração de cada uma das MCs;

K_f é a constante de formação do complexo nanoporo-MC;

ΔG é a energia livre de interação aparente entre o nanoporo e a MC;

K é a constante de Boltzman;

T é a temperatura

5.2 Métodos computacionais

5.2.1 Programas utilizados

Diversas metodologias computacionais foram utilizadas neste trabalho. As tarefas computacionais e os respectivos programas empregados na sua execução estão listados a seguir.

- Visualização de estruturas e Mutação das MCs: VMD (HUMPHREY et al., 1996) e PyMOL (DELANO, 2002).
- Simulações de Dinâmica Molecular: GROMACS 4.5.5 (HESS et al., 2008).
- Determinação dos Mapas de Potencial Eletrostático: APBS (Adaptive Poisson–Boltzmann Solver) (BAKER et al., 2001).
- Para os estudos de docking, foi utilizado o portal online Dockthor (MAGALHÃES et al, 2014).

5.2.2 Simulações por Dinâmica Molecular

Nos os estudos de Dinâmica Molecular, utilizou-se a estrutura cristalográfica do nanoporo formado pela α HL (PDB ID 7AHL) (Song et al, 1996) e da MC-LR (PDB ID 1LCM) (TROGEN et al, 1996). Embora apenas a estrutura da MC-LR esteja disponível no PDB (protein data bank), foi utilizado o programa PyMOL para a mutação da MC-LR e obter as coordenadas atômicas das variantes estruturais YR e RR, por meio da substituição do aminoácido da posição 2 (Leucina) por tirosina e arginina, respectivamente; como ilustrado na figura 1.

Para realização das simulações, é necessário um arquivo de topologia, no qual constam os termos de energia (parâmetros) para a manutenção da distância das ligações e ângulos, bem como potenciais para diedros próprios e impróprios.

As MCs possuem aminoácidos atípicos e o campo de força GROMOS 53A6 não possui parâmetros de ligação, ângulo, e diedros próprios e impróprios para os resíduos de aminoácido das posições 3, 5, 6 e 7 (vide figura

1), nomeados MASP, ADDA, DGLU e MDA, respectivamente. Desta forma, foram adotados parâmetros para os resíduos supracitados, segundo equivalência entre os tipos de átomo dos novos resíduos e dos resíduos já existentes no campo de força. A topologia dos novos resíduos (MASP, ADDA, DEGLU e MDA) é descrita de forma detalhada no apêndice A.

O sistema foi hidratado fazendo uso de coordenadas pré-equilibradas de moléculas de água SPC (single-point charge) consistente com o campo de força GROMOS utilizado nas simulações (OOSTENBRINK et al., 2005). Contra-íons (Na^+ e Cl^-) foram adicionados randomicamente no sistema, de forma a criar uma concentração de NaCl 0,5M e neutralizar o sistema (Figura 10). Condições periódicas de contorno foram aplicadas baseadas na caixa retangular de dimensões $8 \times 8 \times 8 \text{ nm}^3$, contendo solvente explícito.

Preparou-se 4 sistemas, três contendo água, MCs (LR, YR e RR separadamente) e íons; e um sistema contendo água, nanoporo e íons, nas mesmas condições.

O protocolo de simulação envolveu uma minimização de energia, segundo o arquivo mdp (arquivo contendo as características da minimização, como temperatura, tratamento eletrostático utilizado, tempo de integração, quantidade de passos de integração, etc.) na Tabela 2.

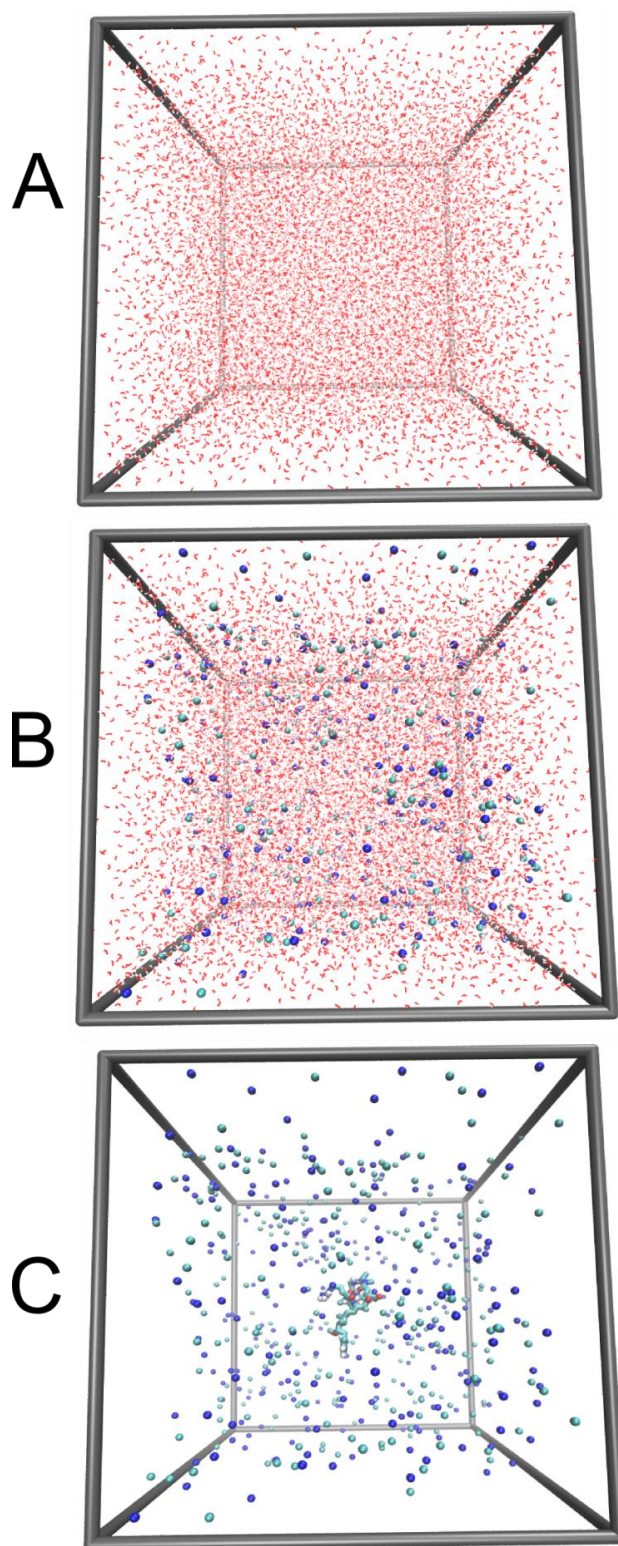


FIGURA 12. Representação da caixa de simulação. (A) contendo apenas água, (B) água + íons e (C) íons + MC-LR. Moléculas e água representadas em linha (vermelhas). Íons e MC-LR representados em alçaçuz. Íons cloreto em verde e íons sódio em azul.

Tabela 2. Conteúdo do arquivo mdp, necessário para a minimização de energia no GROMACS.

integrator	Steepest
Dt	0.001
nsteps	10000
comm-mode	Linear
nstcomm	1
comm grps	System
emtol	0.0001
emstep	0.001
niter	20000
nstxout	1
nstfout	0
nstlog	1
nstenergy	1
nstxtcout	0
xtc_precision	1000
energygrps	System
nstlist	5
ns_type	Grid
pbcs	Xyz
rlist	1.0
Rcoulomb	1.0
vdw_type	Cut-off
rvdw	1.0
optimize_fft	= yes
constraints	None

Após a minimização, a simulação de dinâmica molecular foi realizada, com um tempo de simulação de 10ns para cada sistema, temperatura 300K, ensemble NPT, tempo de integração de 2fs, conforme o arquivo mdp na tabela 3.

Tabela 3. Conteúdo do arquivo mdp, necessário para a Dinâmica Molecular no GROMACS.

Integrator	Md
Nsteps	5000000
Dt	0.002
Nstxout	300
nstvout	300
Nstfout	300
Nstxtcout	300
Nstenergy	300
Nstlog	300
Continuation	No
constraint_algorithm	Lincs
Constraints	h-bonds
lincs_iter	2
lincs_order	4
ns_type	Grid
Coulombtype	generalized-reaction-field
epsilon_rf	66.0
Nstlist	5
Rlist	1.4
Rcoulomb	1.4
rvdw	1.4
Fourierspacing	0.16
Tcoupl	V-rescale
tc-grps	Protein Water_and_ions
tau_t	0.4 0.4
ref_t	300 300
Pcoupl	Berendsen
Pcoupltype	Isotropic
tau_p	0.4
ref_p	1.0
Compressibility	4.5e-5
Pbc	Xyz
DispCorr	EnerPres
gen_vel	Yes
gen_temp	10
gen_seed	192836
refcoord_scaling	All

5.2.3 Cálculo dos Mapas de Potencial Eletrostático

Os cálculos do potencial eletrostático das estruturas geradas a partir das simulações de Dinâmica Molecular foram realizados por meio da ferramenta de execução e visualização do potencial eletrostático com o APBS, disponível no próprio VMD (Figura 11). Para o cálculo foi usada uma força iônica de 4M, Temperatura 300K e constantes dielétricas (ϵ) do soluto (MCs e nanoporo) e do solvente foram 4 e 80 respectivamente.

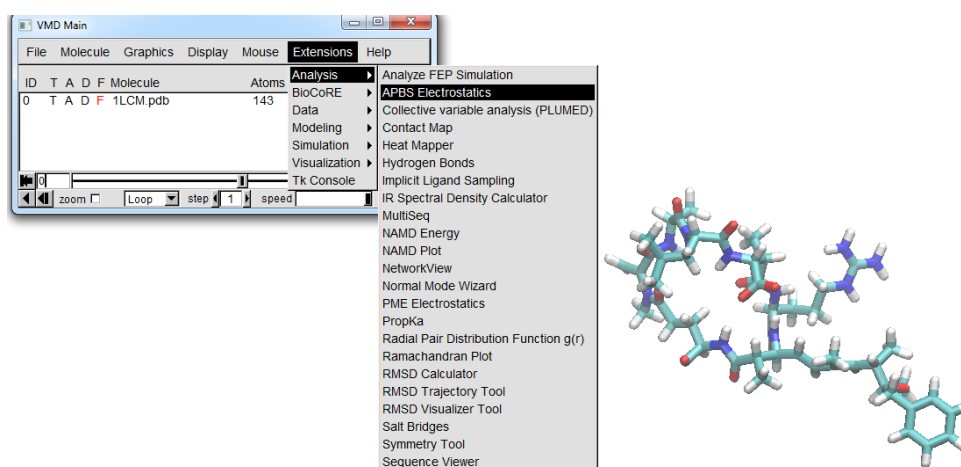


FIGURA 13. Print do programa VMD. Destacando a opção de cálculo do potencial eletrostático para a MC-LR, por meio do APBS.

5.2.4 Simulações por docagem molecular

Utilizou-se o portal online Dockthor (MAGALHÃES et al, 2014). As estruturas representativas das MCs e do nanoporo da alfatoxina foram obtidas tal como descrito na dinâmica molecular. O docagem foi realizado em duas regiões do nanoporo: constricção, cujo centro do grid foi fixado no centro dos sete resíduos de lisina da posição 147 e na região da entrada trans, cujo centro do grid foi fixado no centro dos sete resíduos da posição 121. Foram utilizados parâmetros de docagem padrão da plataforma online, como o emprego do algoritmo genético com um número máximo de 1.000.000 de avaliações, populações com tamanho de 1000 e um total de 30 rodadas. Os estados de protonação dos resíduos não foram alterados.

6 RESULTADOS: DIFFERENTIATION OF MICROCYSTIN VARIANTS WITH THE ALPHA HEMOLYSIN NANOPORE: A THEORETICAL AND EXPERIMENTAL STUDY

Manuscrito "Differentiation of microcystin variants with the alpha hemolysin nanopore: a theoretical and experimental study" submetido na **Environmental Science & Technology (ACS Publications)**, fator de impacto 5.393.

This document is confidential and is proprietary to the American Chemical Society and its authors. Do not copy or disclose without written permission. If you have received this item in error, notify the sender and delete all copies.

Differentiation of microcystin variants with the alpha hemolysin nanopore: a theoretical and experimental study

Journal:	<i>Environmental Science & Technology</i>
Manuscript ID	es-2017-00546w
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	29-Jan-2017
Complete List of Authors:	JUNIOR, JANILSON; Universidade Federal de Pernambuco, Biofisica e Radiobiologia SOARES, THEREZA; Federal University of Pernambuco, Fundamental Chemistry Pol-Fachin, Laercio; Federal University of Pernambuco, Fundamental Chemistry MACHADO, DIJANAH; Universidade Federal de Pernambuco, Biophysics and Radiobiology Rusu, Victor; ETH Zürich, Swiss Federal Institute of Technology, Department of Chemistry and Applied Biosciences AGUIAR, JULIANA; Universidade Federal de Pernambuco, Biofisica e Radiobiologia RODRIGUES, CLAUDIO; Universidade Federal de Pernambuco, Biofisica e Radiobiologia

SCHOLARONE™
Manuscripts

Differentiation of microcystin variants with the alpha hemolysin nanopore: a theoretical and experimental study

Janilson J. S. Júnior^{a,b}, Thereza A. Soares^b, Laércio Pol-Fachin^{b,c}, Dijanah C. Machado^a, Victor
H. Rusu^b, Juliana P. Aguiar^a, Cláudio G. Rodrigues^{a*}

^aDepartamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade
Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brasil

^bDepartamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade
Universitária 50740-560, Recife, PE, Brasil

^cCentro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Cidade Universitária 50740-
465, Recife, PE, Brasil

KEYWORDS: Protein nanopore, Microcystins, Cyanotoxins, Alpha hemolysin.

ABSTRACT

Microcystins (MCs) are a class of cyclic heptapeptides with more than 100 variants produced by cyanobacteria present in surface waters. MCs are potent hepatotoxic agents responsible for fatal poisoning in animals and humans. Several techniques are employed in the detection of MCs, however, there is a shortage of methods capable of discriminating variants of MCs. In this work

we demonstrate that the α -Hemolysin (α HL) nanopore is able to detect and discriminate the variants (LR, YR and RR) of MCs in aqueous solution. The discrimination process is based on the analysis of the residence times of each variant of MCs within the unitary nanopore, as well as, on the amplitudes of the blockages in the ionic current flowing through it. Simulations of molecular dynamics and calculation of the electrostatic potential revealed that the variants of MCs present different charge distribution and correlated with the three patterns on the amplitudes of the blockages in the ionic current. Additionally, molecular docking analysis indicates different patterns of interaction of the variants of MCs with two specific regions of the nanopore. Finally we propose that the α HL nanopore is able to discriminate the variants of microcystins by a mechanism based mainly on electrostatic interactions.

INTRODUCTION

Microcystins (MCs) are constituted by cyclic heptapeptides containing several non-proteinogenic amino acids, and represent a class of exotoxins produced by cyanobacteria species commonly present in surface waters of tropical regions in the northern and southern hemispheres.^{1,2} MCs general sequence is cyclo-(D-Ala1-X2-D-MeAsp3-Z4-Adda5-D-Glu6-Mdha7) where the numbers indicate the position of a given amino acid in the sequence (**Figure 1**). The modified residues MeAsp (Masp), Adda and Mdha corresponds to D-erythro-beta methylisoaspartic acid, (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-(4E,6E)-dienoic acid and methyldehydroalanine, respectively. Positions X2 and Z4 are occupied by variable L-amino acids, resulting in variants with different toxicity profiles.³ Currently over 100 variants of MCs have been described which differ from each other with respect to the identity of the two variable residues and chemical modifications in the other amino acids.⁴ The

variant Microcystin-LR (MC-LR, 995 Da) containing the residues Leu2 and Arg4 is the most common and toxic of MCs.^{1,4}

MCs are potent hepatotoxic and nephrotoxic agents, which have been associated to liver, digestive and skin diseases, neurological impairment and death.⁵ It has been associated with most of the poisoning incidents worldwide.⁶ In February 1996, one of the largest toxic diseases caused by MCs in humans occurred in Caruaru in the Northeast of Brazil, resulting in the deaths of 60 patients.⁷ MCs exert their toxicity via irreversible inhibition of protein phosphatases 1 and 2A, affecting mainly liver cells, which can lead to death.⁸ Additionally, long-term exposure to low concentrations of MCs has been implicated in tumor growth promotion.⁹ The World Health Organization (WHO) recommends an upper limit of 1 µg/L of MCs in drinking water for human health protection.¹⁰ Eutrophication and climatic changes has led to the rapid proliferation and dominance of harmful blooms of cyanobacteria in freshwater and marine ecosystems.^{11,12} Temperatures ranging between 15-30 °C can selective promote cyanobacterial proliferation as the growth rates of these bacteria are optimal at relatively high temperatures.¹³ MCs are a growing threat to the use of freshwater ecosystems and reservoirs for drinking water, irrigation, and fishing. Therefore, fish and water consumption can be an important route of microcystin exposure for humans.¹⁴

The low concentration and large number of variants represent a considerable challenge for the monitoring of MCs in water bodies, to which several analytical methods have been employed.¹⁵ Among the most sensitive techniques are high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (HPLC-MS), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and phosphatase assay. Some of these techniques offer excellent sensitivity and specificity but at high cost, time-consuming sample preparation procedures and lengthy analysis.¹⁶ Furthermore, the use of these

techniques for detection and identification of unknown MCs in environmental samples is hindered by the lack of analytical standards for many MC variants.^{3,16} In addition, HPLC-MS requires highly skilled personal and expensive equipment. Protein phosphatase inhibition assays are susceptible to high rates of false-positive results, and cannot distinguish between different MC variants.^{3,17} Likewise, immunoassay techniques may present cross reactivity to MCs variants and have limitations for multi-analytical applications.¹⁷ Therefore, there is a critical demand for the development of low-cost analytical devices for MC monitoring in water, which features high sensitivity and specificity, easiness to use and great portability.

Nanopore based-systems have been successfully employed in the stochastic biosensing.^{18,19} Stochastic biosensing is an approach that relies on the observation of individual binding events between analyte molecules and a single bioreceptor.²⁰ Nanopore formed by *Staphylococcus aureus* α -hemolysin (α HL) is the most commonly protein nanopore employed in the stochastic biosensing technology.²¹ Because these pores are so small, their interaction with an analyte can alter the ionic current that would otherwise flow freely. This nanopore can be used as analytical tools for a wide variety of analytes (e.g. mass spectrometry of polymers²², DNA sequencing²³, detection of enantiomers²⁴, cocaine²⁵ and poly(ethylene glycol)²⁶). In this work we study the interaction of MCs with the α HL-nanopore, aiming to develop a system for the detection and characterization of these cyanotoxins in aqueous systems.

EXPERIMENTAL

Materials. All chemicals and solvents were of analytical-grade and used as received, without further purification. High-purity water was obtained after a Milli-Q plus (Billerica, USA) treatment. The wild type of *Staphylococcus aureus* α -hemolysin was purchased from Calbiochem (Madison, WI, USA). 1,2-Diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPhPC) was

purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). The microcystins LR, RR and YR were purchased from Wako (Wako Pure Chemical Industries Ltd, Japan). 2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (TRIS) and citric acid was from Fluka (Buchs, Switzerland). KCl was purchased from SIGMA (St. Louis, MO, USA). Hexane was purchased from (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ).

Planar lipid bilayer membranes, single channel current recording and data analysis.

Solvent-free planar bilayer lipid membranes, with a capacitance of 40 pF, were formed by the lipid monolayer apposition technique, using DPhPC in hexane at 25 ± 1 °C, was described previously.²⁷ Because it was recently shown that the elevated KCl concentrations considerably improve single molecule identification by unitary protein nanopores,^{27,28} in this study membrane-bathing solutions contained 4 M KCl in 5 mM TRIS adjusted to pH 7.5 with citric acid. Experiments were carried out using an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA) in voltage clamp mode. Membrane potential was maintained using silver/silver chloride (Ag/AgCl) electrodes in 3 M KCl 2% agarose bridges assembled within standard 200 mL pipette tips. Currents were filtered by a low-pass eight-pole Butterworth filter (model 9002; Frequency Devices, Haverhill, MA) at 15 kHz and directly saved into the computer memory with a sampling frequency of 50 to 100 kHz. Data analysis of molecular signature parameters (mean duration and amplitude of the blockage), transition rate, and kinetic constants of the MC-nanopore interactions were done essentially as described by Rodrigues et al.²⁷ Briefly, the on-rate constant, k_{on} , was defined as $1/(C_{\text{MC}} \times \tau_{\text{on}})$. The characteristic time, τ_{on} , was obtained from the collected time intervals between the end of one blockade event and the onset of the next. The off-rate constant, k_{off} , was defined as $1/\tau_{\text{off}}$, where τ_{off} is the characteristic time of MCs staying in the pore.

Molecular Dynamics (MD) Simulations. Atomic coordinates of the microcystin cyclic heptapeptide were taken from the Protein DataBase (code id 1LCM).²⁹ MD simulations were performed for microcystin MC-LR and variants where the arginine residue in position 2 was replaced by an arginine (MC-RR) or tyrosine (MC-YR) (Figure 1). Protonation states were assigned accordingly to pH 7. Simulations were carried out using the GROMOS force field force parameter set 53A6³⁰ in conjunction with the software package GROMACS v.4.5.4, with double precision.^{31,32} The systems were placed in cubic boxes with dimension 8 x 8 x 8 nm³, treated for periodic boundary conditions, and solvated with explicit SPC model water molecules.³³ The total charge of the system was neutralized by adding Na⁺ counterions, and subsequently Na⁺ and Cl⁻ counterions were added to yield an ionic strength of 150 mM. Simulations were carried out in the NPT ensemble, and a time step of 2 fs were used to integrate the equations of motion based on the Leap Frog algorithm. The temperature of the solute and solvent were separately coupled to the Berendsen thermostat at 300 K with a relaxation time of 0.4 ps. The pressure was maintained at 1 atm by isotropic coordinate scaling via the Berendsen barostat with a relaxation of 0.4 ps.³⁴ The bond lengths and angles were constrained by using the P-LINCS algorithm, and the geometry of the water molecules was constrained using the SETTLE algorithm, both with a tolerance of 10⁻⁴. A reaction field correction and a cutoff of 1.4 nm were used for both vdW and long-range electrostatic interactions with a permittivity dielectric constant of 66. In all cases, the pair list for short-range non-bonded and long-range electrostatic interactions was updated with a frequency of 10 fs. Configurations of the trajectory were recorded every 0.002 ps. Atomic coordinates were visualized with the software VMD 1.92.³⁵

Electrostatic Potential Calculations. The electrostatic potential of the α HL nanopore and the microcystin variants were calculated by solving the linearized Poisson–Boltzmann equation with

the Adaptive Poisson–Boltzmann Solver package.³⁶ The Poisson–Boltzmann equation describes the electrostatic charge $\Phi(r)$ in a medium with a dielectric scalar field $\epsilon(r)$ and with a charge density $\rho(r)$. The solute and the solvent are represented by distinct dielectric continuums. The charge density is divided into the fixed interior charge distribution of the molecule, $\rho_{\text{int}}(r)$, and a mobile exterior charge density of the solvent and ions. The exterior is modeled as a dielectric continuum with the mobile ion density approximated by a Boltzmann distribution at temperature T . The linear Poisson–Boltzmann equation is defined as:³⁷

$$\nabla \cdot \epsilon(r) \nabla \Phi(r) = -4\pi \rho_{\text{int}}(r) + \lambda(r) k^2 \Phi(r) \quad (1)$$

where $\epsilon(r)$ is the dielectric constant of the solute or the solvent and λ equals 1 for ion-accessible regions and 0 elsewhere. κ^2 is the modified Debye–Hückel parameter defined as:

$$\kappa^2 = \frac{8\pi N_A I}{1000kT} \quad (2)$$

where, k is the Boltzmann constant, N_A is Avogadro’s number and I is the ionic strength of the medium. Hydrogens were added to the crystallographic coordinates with the PDB2PQR software.³⁸ Partial charges and atomic radii were taken from the PARSE force field.³⁹ The solute and solvent were assigned a dielectric constant of 2 and 78.5, respectively. The ionic strength of monovalent ions was set to 0.200 M with an ion exclusion radius of 2 Å and a temperature of 298 K. The finite-difference Poisson–Boltzmann calculations employed grids with 257 x 257 x 257 (α HL) and 33 x 33 x 65 (MCs) points in x, y, z directions, respectively.

Molecular docking studies. Atomic coordinates for the α HL heptameric channel was retrieved from PDB ID 7AHL⁴⁰, while representative structures from the microcystins were retrieved from MD simulations. The molecular dockings were performed in two protein regions, (1) the constriction and (2) the “trans” pore exit, using DockThor online portal⁴¹ with the standard

program docking parameters. Briefly, its built-in genetic algorithm was employed in a total of 30 runs, each one with an initial population of 1000 random individuals, and a maximum number of 1.0×10^7 energy evaluations. The atomic coordinates of the lowest energy conformations were clustered based in a root-mean-squared-deviation (RMSD) of 2.0 Å. The output conformers for the three MCs, which showed favorable interaction energies with α HL, were sorted in order of increasing energy, and the lowest energy docked conformations were retrieved for further analysis. The volume analyses were performed using the “Solvent Extractor” tool in “Voss Volume Vo extractor” website, using the standard program parameters.⁴²

Results and Discussion

Single molecular events of MC/ α HL nanopore interaction. α HL nanopores exhibited uniform single-channel conductance state of long duration at both negative and positive transmembrane potentials.²⁰ In 40 mV an unobstructed α HL nanopore has a constant current of approximately 150 pA and conductance of ~ 4 nS in KCl 4 M, pH 7.5, and the values of these parameters are in agreement with several previous reports.^{22,27,43} The addition of MC-LR, MC-RR or MC-YR to the trans side of nanopore induces reversible partial blockades of the ionic current, and similarly to studies with other analytes, this clearly indicates that this nanopore is capable of detecting MCs, so it works as a molecular counter^{44–46} (**Figure 2**). The profile of the microcystin-induced ionic current blockages differ considerably from those reported in other studies using synthetic linear peptides with a number of amino acids similar to microcystins, suggesting that the nanopore is capable of discriminating the analytes by the molecular configuration.^{47,48} Although the MCs variants differ in only a single amino acid (**Figure 2A**), each variants exhibits a typical characteristic blockages of the ionic current (**Figure 2B**). The analysis of the ionic current fluctuations shows three types of blockages patterns, when three

MCs variants are added simultaneously (**Figure 3A**). Observe that the amplitude of the blockages of the ionic current caused by MC-YR is larger compared to the other variants (**Table 1**). The MC-YR has blocked about $\sim 91.6\%$ of the ionic current, followed by $\sim 81.6\%$ of the MC-RR and $\sim 70.1\%$ of MC-LR, respectively. Then, the magnitude of the ionic current blockages amplitude in the nanopore depends on the MC variant. As expected the percentage reduction in ionic current induced by microcystin is higher than that of acyclic peptides.⁴⁷ From molecular docking poses, a quantitative correlation was observed for MC-YR in terms of percentage of pore obstruction (93%), while both MC-RR (90%) and MC-LR (51%) presented the same trend (**Table 1**). Structurally, such blockade is proposed to occur in the region of constriction of the α HL nanopore (**Figure 3B**), in which the Arg residues in MCs would interact with Glu111 residues. We can observe that the theoretical data are in agreement with the experimental results, as shown in more detail in the Table 1. Additionally, as illustrated in bottom of the **Figure 3A**, the three MCs were added simultaneously at equimolar concentrations, resulting in three blockages patterns. Therefore, α HL nanopore can distinguish different MCs variants simultaneously present in aqueous systems (**Figure 3A**).

A potential of -180 to 180 mV was applied at increments of 20 mV and measure the dwell time (τ_{off}) of the MCs variants within the α HL nanopore (**Figure 4**). For MC-RR, τ_{off} is the highest among the MCs variants at the voltage of 100 mV ($\tau_{\text{off}} = 38.96 \pm 3.80$ ms) (**Figure 4A**). Likewise, MC-LR τ_{off} is the highest at the voltage of -40 mV ($\tau_{\text{off}} = 3.50 \pm 0.65$ ms) (**Figure 4B**), which also ensures the greatest τ_{off} for MC-YR ($\tau_{\text{off}} = 4.54 \pm 0.63$ ms) (**Figure 4C**). These results show a voltage-dependent behavior of the residence time of MC variants within α HL nanopore.⁴⁷ Analysis of the dwell times (τ_{off}) for the three MC variants has been performed at the same transmembrane potential (**Figure 5A**). It shows that the MCs variants interact differently with

the nanopore. Electrostatic potential and molecular docking calculations were performed for the α HL nanopore and MCs variants to elucidate the molecular basis of their differential interactions. The basal region on the *trans* side of the nanopore is rich in negatively charged residues, so, a potential of 100 mV applied on the same side as the microcystin was added, may influence their interaction with the nanopore (**Figure 5B, C**). Since the net charge of the MC variants differs, these molecules will exhibit different interaction patterns with the nanopore, but also with the applied electrical field. In our experimental solution of pH 7.5, the net charge of MC-RR is 0 whereas while MC-YR and MC-LR have a net charge of -1.⁴⁹ The electrostatic potentials calculated for the two latter variants are similar though quite dissimilar from the potential obtained for MC-RR (**Figure 5D-F**). The variant MC-RR shows a mostly positive potential due to the presence of two Arg residues while the electrostatic potential generated by MC-YR and MC-LR are negative. In fact, the molecular docking poses indicate that each of the two Arg residues in MC-RR interact with two Asp127 residues in opposite sides of the nanopore, thus possibly increasing the MCs-nanopore interaction and residence time with respect to MC-YR and MC-LR (Supplementary Figure, S1). This is entirely consistent with the measurements of τ_{off} (**Figure 5A**), and suggests an electrostatic interaction between MC-RR and α HL nanopore, in agreement with the experimental data. As the lumen of the nanopore is positively charged, then the MC-RR, is more likely to remain longer in the entrance than in the intermediate region of the nanopore (**Figure 5C**). Moreover, the predominantly negative potential surface of MC-YR and MC-LR should be less attractive to the negative potential in the *trans* side of the nanopore, in which their Arg residue interacts with a single Asp127 residue (Supplementary Figure, S1). As depicted in **Figure 5B**, the basal region of the nanopore (*trans* side) is rich in aspartic acid residues, which gives a net negative charge of the *trans* end of the

nanopore.⁵⁰ Although the MC-LR and MC-YR present a similar electrostatic potential, their residence times were different (**Figure 5A**). In our previous studies, we have demonstrated the role of hydration in the formation of the complex analyte-nanopore²⁷, so that the larger hydration of the analyte, lower the probability of formation and stabilization of analyte-nanopore complex. Thus, the higher hydrophobicity of MC-LR is noted as one of possible reasons of its higher residence time, when compared to MC-YR (the leucine residue gives greater hydrophobicity to MC-LR, leaving it less hydrated and increasing its residence time). Recent studies have shown that lithium can shield charges in base of the stem region of the α HL nanopore.⁵¹ Based on this knowledge, we have modified the bath solution (KCl 4 M to LiCl 4 M), in order to screening the base of the stem region and check the residence time of MC-RR. We can observe in **Figure 5** that there was a decrease in the residence time of the MC-RR, since without the negatively charged region, the electrostatic contribution of the interaction between the MC-RR and the nanopore is lower. Furthermore, we observed a significant increase in residence time of MC-LR (negatively charged) (**Figure 5A**), by simply changing the experimental condition, by adding the MC-LR to the *cis* side. It is noteworthy that the MD-generated structural ensembles of the MC variants are quite similar with respect to the backbone conformation. The backbone conformation is maintained due to the presence of stable intra-ring hydrogen bonds between residue pairs (D-Masp:O δ -DGlu:NH, D-Masp:O δ -ADDA:NH, DGlu:O-X:NH where X is either Arg, Tyr or Leu). These interactions are persistent throughout the 10 ns simulation time. Therefore, the calculated electrostatic potentials for the MC variants are representative of the average conformation of these cyclic peptides in solution.

Association rate constant (k_{on}) is correlated with the frequency of blockages caused by analytes.^{28,52} The k_{on} was calculated by assuming a simple bimolecular interaction such that $k_{on} =$

1/($\tau_{\text{on}} \times [\text{MC}]$), where [MC] is the MC concentration and τ_{on} is the characteristic time between successive blockages.^{28,43} The frequency of blockages of the α HL nanopore decrease with the applied voltage for MC-LR and MC-YR, but not for MC-RR (**Figure 6**). This behavior can be expected on the basis of the distinct net charge of the MC variants. It is known that under the solutions conditions used in our experiments (pH 7.5) the MCs LR, YR and RR exhibit net charges of -1, -1 and 0, respectively.^{49,53} However, our results indicate that MC-RR can acquire a positive charge (**Figure 6**). We suggest that this may occur because MC-RR forms complex with K^+ , such as occurs with some neutral molecules in the presence of 4 M KCl.^{28,43,52} In this context is possible to use the nanopore as molecular tool for the rapid probing of the capabilities of different MCs variants to form complexes with different ions.

One of the parameters used to evaluate the sensing capacity of the α HL nanopore is to evaluate the behavior of the transition rate as a function of analyte concentration.^{27,28} In our case, the slope of the transition rate-MC concentration increases linearly and depends on the MC variant (**Figure 6**), thus providing a basis for quantifying these cyanotoxins.

In summary, our studies have shown that the α HL nanopore has the ability to detect and to distinguish three structural variants of MCs simultaneously, by difference in the blocking profiles of each MC. Using computational methods, it was found that electrostatic interactions contribute to the interaction between MCs and the base of the stem region nanopore. The positively charged profile acquired by MC-RR facilitates their interaction with the nanopore, which does not occur with the MCs LR and YR. In addition, being less hydrated, MC-LR has more interaction with the nanopore than the MC-YR. Therefore, we propose the use of the nanopore-based technology as an auxiliary method of MCs analysis in aqueous environments.

FIGURES

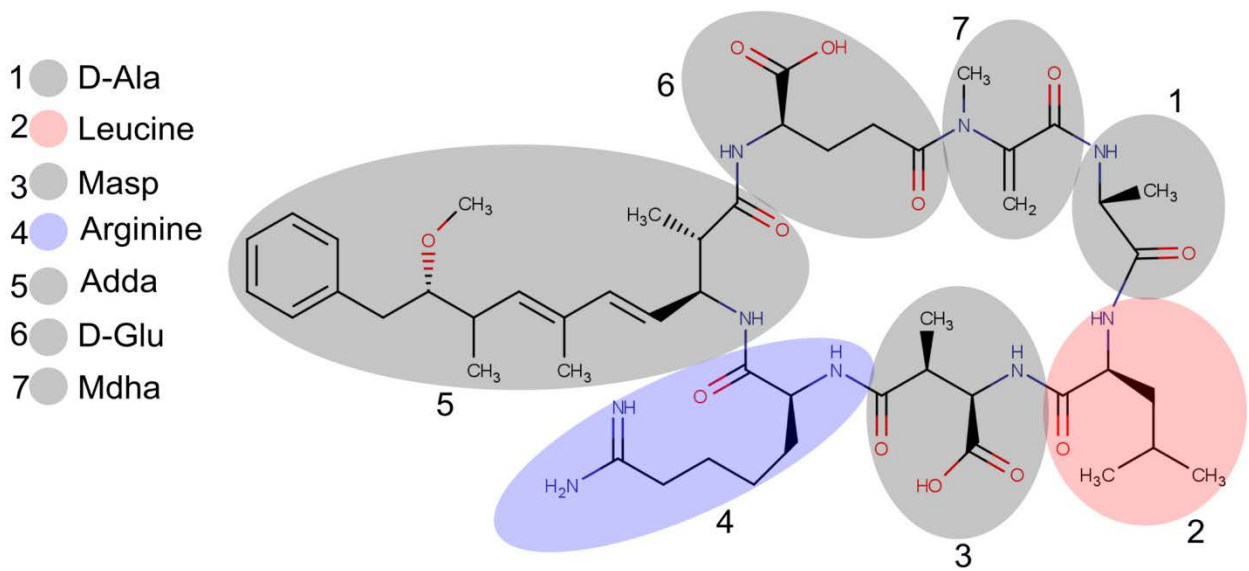


Figure 1. Structure of microcystin-LR. Variants differ with respect to the identity of L-amino acids in position 2 and 4. Numbers represent the position of the amino acid residue.

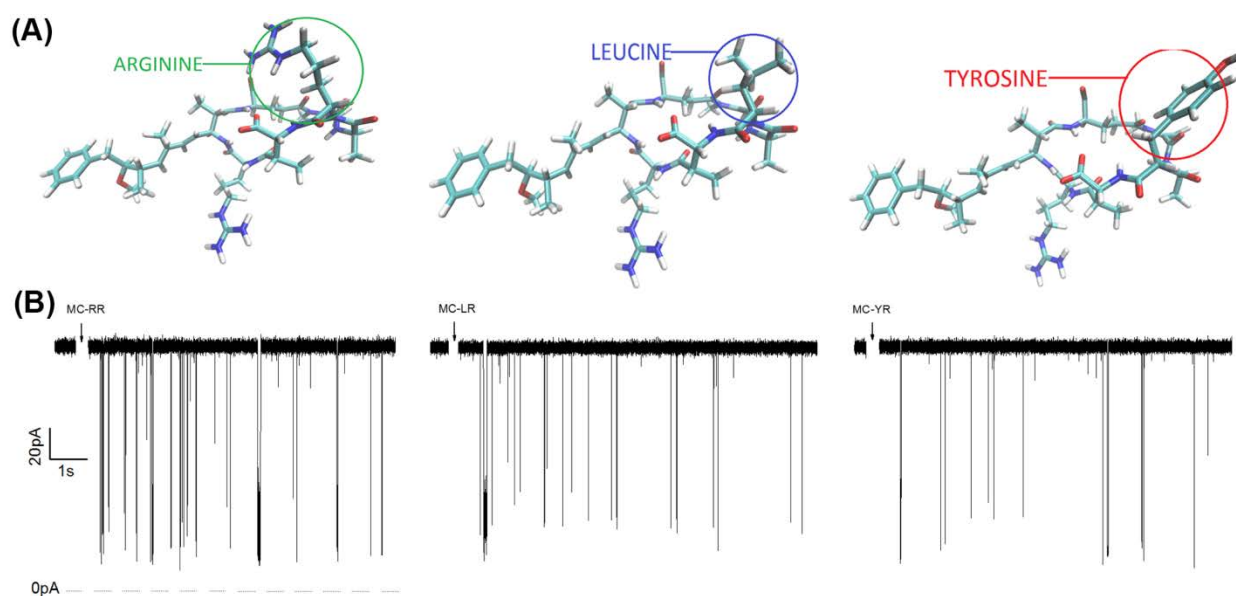


Figure 2. α -Hemolysin nanopore detects microcystins. **(A)** Structural representation of variants MC-RR, MC-LR and MC-YR with residues at position X2 highlighted in black, (arginine), blue (leucine) and red (tyrosine) circles, respectively. **(B)** The profile of the microcystin-induced ionic current blockages differs to the MCs variants. Solution: 4 M KCl, 5 mM Tris-HCl, (MC-RR, 1 μ M; or MC-LR, 1 μ M; or MC-YR, 1 μ M), pH 7.5. Transmembrane potential, 40 mV.

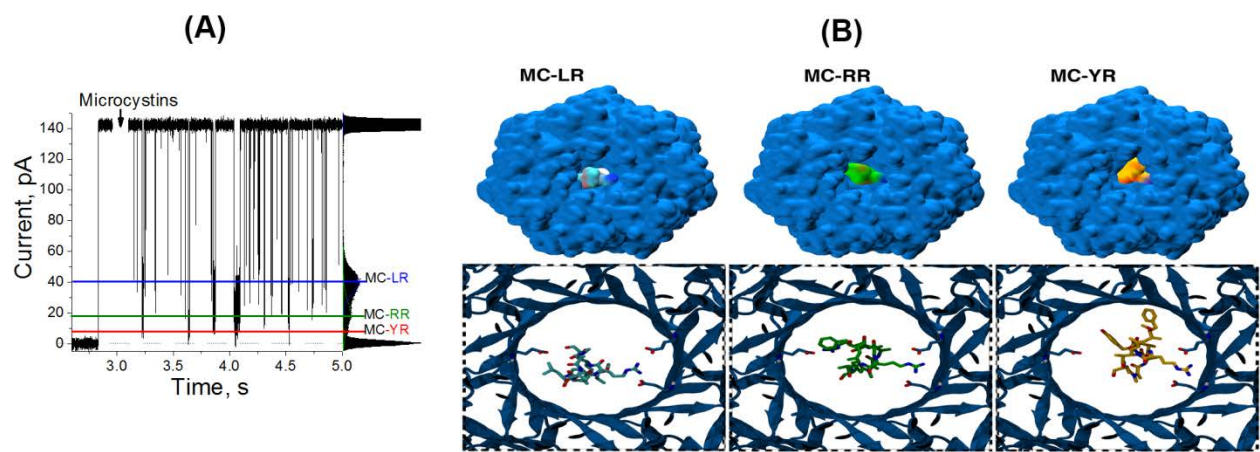


Figure 3. α -Hemolysin nanopore is capable of discriminating MCs variants. **(A)** The profile of the microcystin-induced ionic current blockages for the three MC variant simultaneously in solution: 4 M KCl, 5 mM Tris-HCl, (MC-RR, 1 μ M; and MC-LR, 1 μ M; and MC-YR, 1 μ M). The colored lines indicate the blockage pattern for to MC-LR(blue), MC-RR(green) and MC-YR(red). **(B)** Docked MCs in the region of constriction of the α HL nanopore. In the upper structures, the MC-nanopore complexes are represented as surface in the context of the entire protein. In the lower images, the MC-RR, MC-LR and MC-YR molecular structures are shown as they interact with Glu111 residues of the region of constriction of the α HL nanopore.

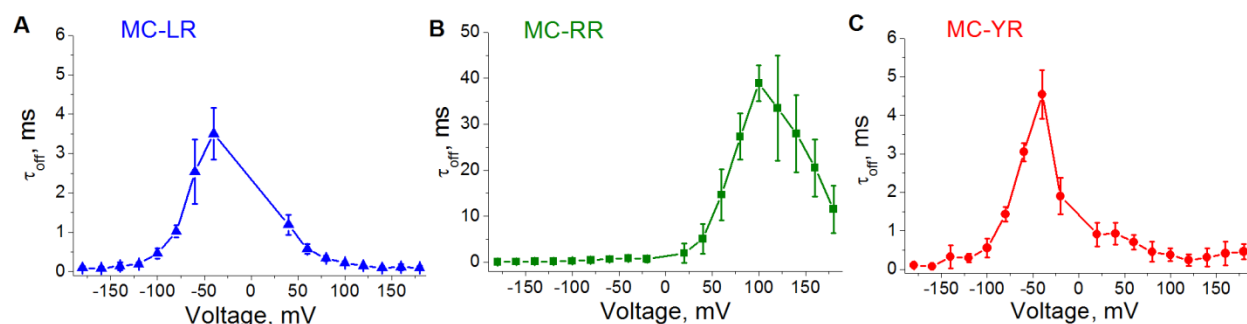


Figure 4. Influence of the transmembrane potential in the dwell time (τ_{off}) of MCs variants within α HL nanopore. A) MC-LR, B) MC-RR, C) MC-YR. Concentration of MCs variants is 1000 μ M in solution (4 M KCl, Tris-HCl 5 mM, pH 7.5). The result of at least three independent experiments (mean $\pm$ SE) is presented in each case.

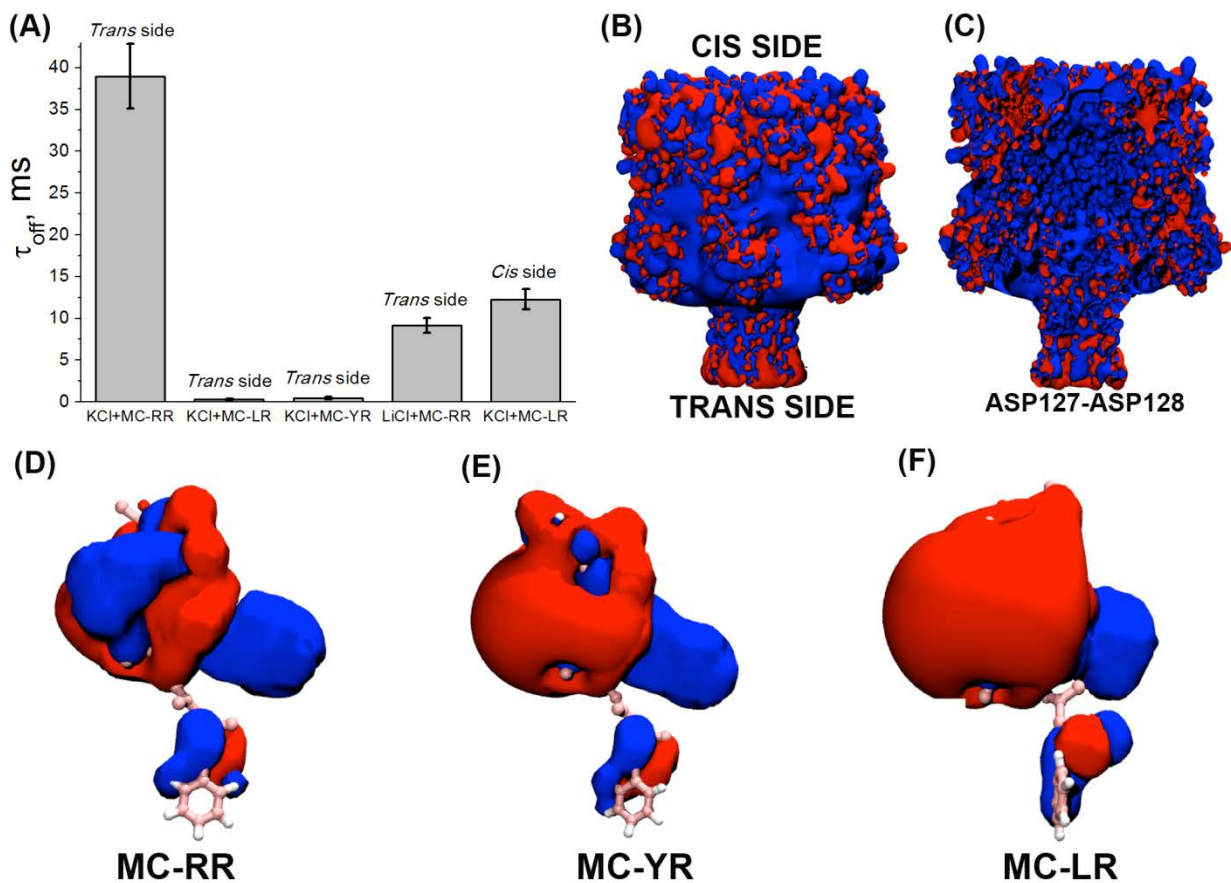


Figure 5. Influence of the electrostatic potential in interaction of MC- α HL nanopore. **A)** Residence time for MC variants in nanopore, solutions: KCl 4M or LiCl 4M. The microcystin was added on the same side (cis or trans of the nanopore) in which the potential of 100 mV was applied. **B)** Electrostatic potential represented in VMD of the α -HL nanopore. **C)** Electrostatic

potential represented in VMD of lumen of the α -HL nanopore. **D-F)** Electrostatic potential represented in VMD for the MCs variants.

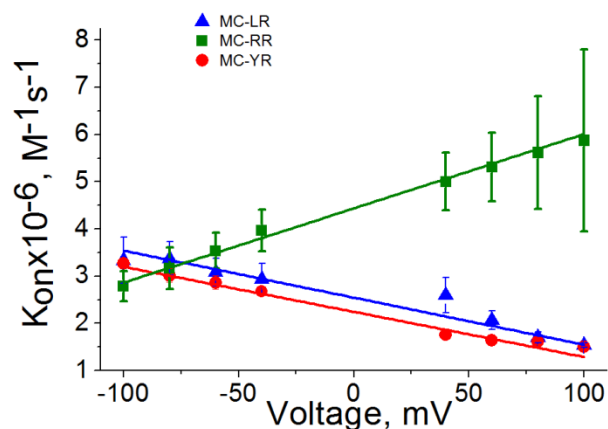


Figure 6. Influence of the transmembrane potential on the on-rate constant (K_{on}) of the MC- α HL nanopore. Solution (4 M KCl, Tris-HCl 5 mM, pH 7.5). (Data points) Means of at least three separate experiments.

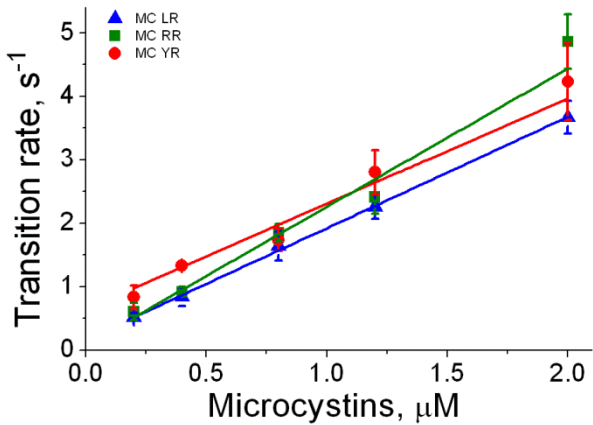


Figure 7. Transition rate and MCs variants concentration. (Data points) Means of at least three separate experiments.

TABLE 1

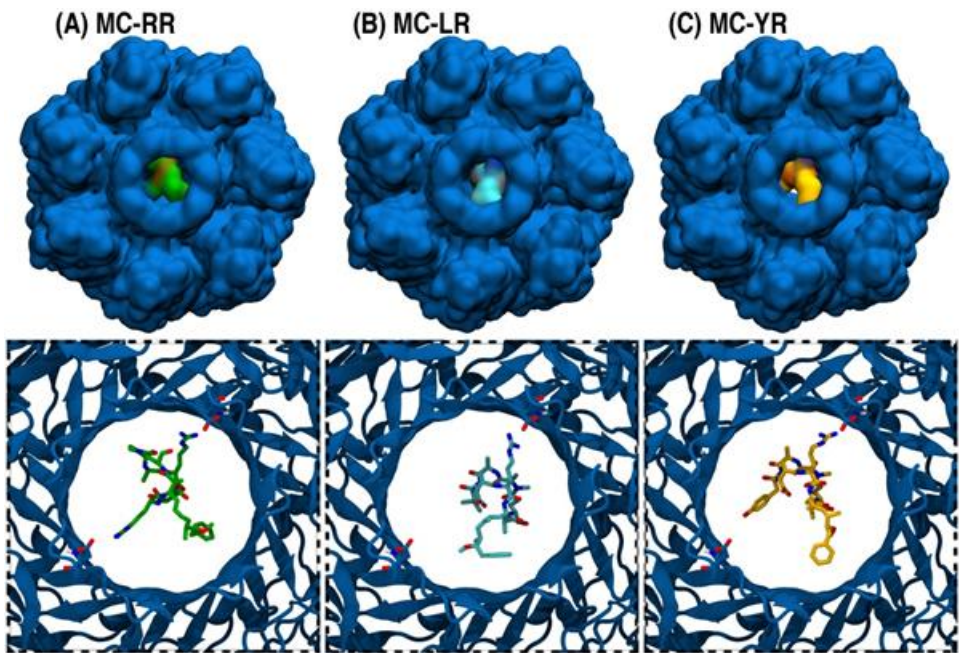
Table 1. α HL nanopore constriction region volume as a function of MCs interaction and experimental values of the blocking percentage of MCs.

Nanopore state	Volume ($\text{\AA}^3$)	Percentage of pore obstruction (theoretical)	Percentage of the ionic current blockages amplitude (experimental)
Unoccupied	1113	-	-
Occupied with LR	548	51%	70,1%
Occupied with RR	115	90%	81,6%
Occupied with YR	80	93%	91,6%

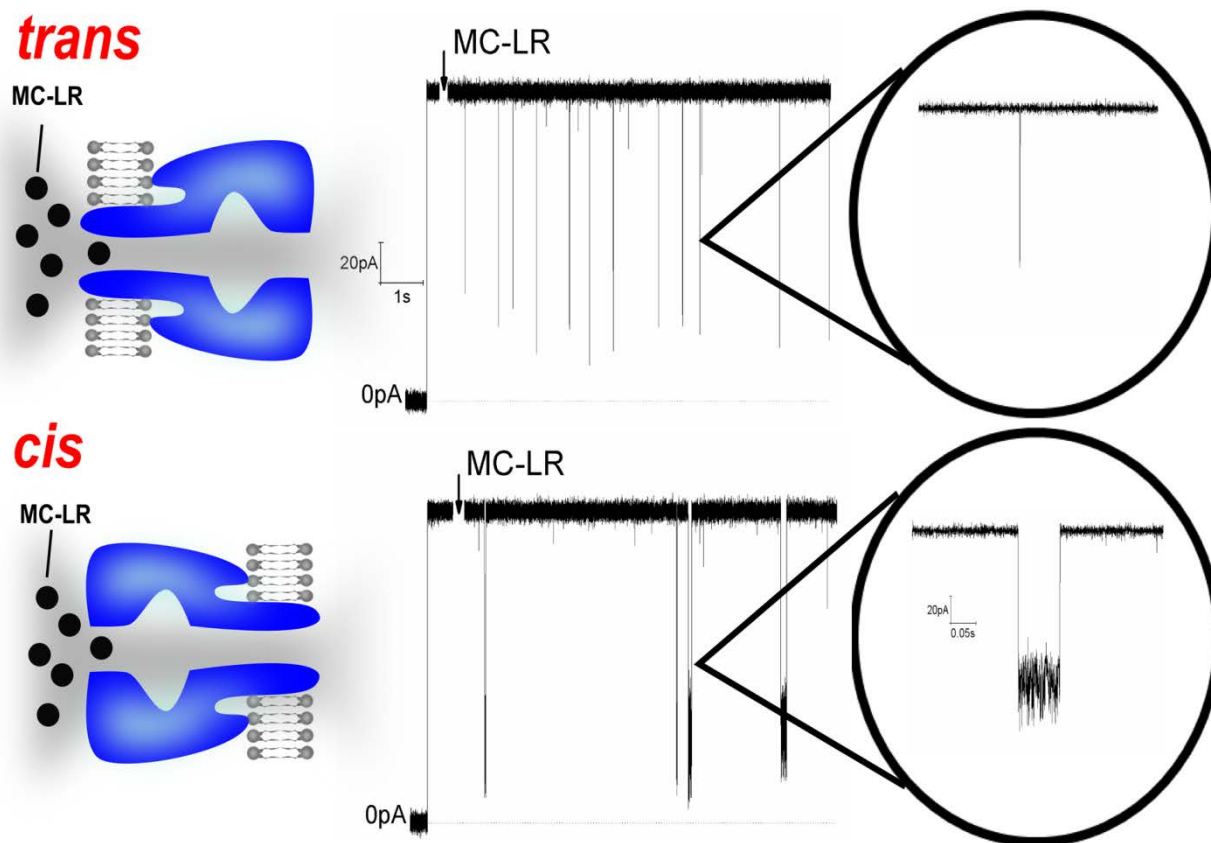
A total of 84 residues were considered for theoretical analysis, embracing amino acids 110 to 115 and 145 to 150 from the seven α HL monomers.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information. Docking analysis of interaction among MCs and α HL nanopore. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

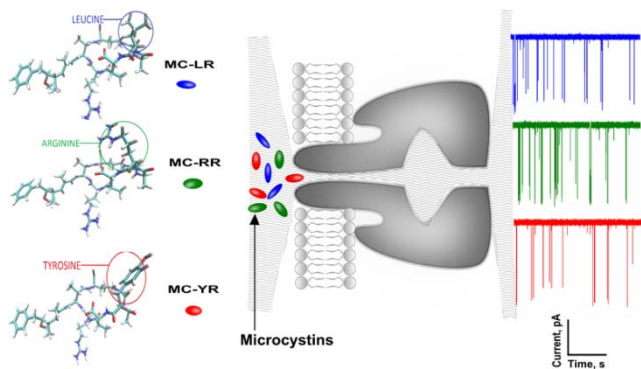


Supplementary Figure 1. Docked MCs into trans pore exit of the α HL nanopore. In the upper structures, the MCs-nanopore complexes are represented as surface in the context of the entire protein. In the lower images, the MC-RR, MC-LR and MC-YR molecular structures are shown as they interact with Asp127 residues of the pore.



Supplementary Figure 2. Cartoon of experimental configurations for α HL nanopore (Cis side and Trans side). In the upper, Trans configuration and typical current record of α HL nanopore in the presence of MC-LR 1 μ M. In the lower images, Cis configuration. The applied potential was 40 mV.

Graphical abstract



AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Cláudio G. Rodrigues, Fax: +55 81 2126-8560; Phone: +55 81 2126-8535; E-mail: cgrufpe@gmail.com

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by the Brazilian Funding Agencies CNPq, FACEPE, Rede de Nanotecnologia Molecular e de Interfaces, and INCT-INAMI.

REFERENCES

- (1) Fawell, J.; Mitchell, R.; Everett, D.; Hill, R. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: I Microcystin-LR. *Hum. & Experimental Toxicol.* **1999**, *18*, 162–167.
- (2) Srivastava, A.; Singh, S.; Ahn, C. Y.; Oh, H. M.; Asthana, R. K. Monitoring approaches for a toxic cyanobacterial bloom. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47* (16), 8999–9013.
- (3) McElhiney, J.; Lawton, L. A. Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, *203* (3), 219–230.
- (4) Puddick, J.; Prinsep, M. R.; Wood, S. A.; Kaufononga, S. A. F.; Cary, S. C.; Hamilton, D. P. High levels of structural diversity observed in microcystins from microcystis CAWBG11 and characterization of six new microcystin congeners. *Mar. Drugs* **2014**, *12* (11), 5372–5395.
- (5) Carmichael, W. W.; Azevedo, S. M.; An, J. S.; Molica, R. J.; Jochimsen, E. M.; Lau, S.; Rinehart, K. L.; Shaw, G. R.; Eaglesham, G. K. Human Fatalities from Cyanobacteria: Chemical and Biological Evidence for Cyanotoxins. *Environ Health Perspect.* **2001**, *109* (7), 663–668.
- (6) Drobac, D.; Tokodi, N.; Simeunović, J.; Baltić, V.; Stanić, D.; Svirčev, Z. Human exposure to cyanotoxins and their effects on health. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **2013**, *64* (2), 305–316.
- (7) Pouria, S.; De Andrade, A.; Barbosa, J.; Cavalcanti, R. L.; Barreto, V. T. S.; Ward, C. J.; Preiser, W.; Poon, G. K.; Neild, G. H.; Codd, G. A. Fatal microcystin intoxication in

- 473 haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *Lancet* **1998**, 352 (9121), 21–26.
- 474 (8) Dawson, R. M. The toxicology of microcystins. *Toxicon* **1998**, 36 (7), 953–962.
- 475 (9) Gehringer, M. M. Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: A dualistic
476 response. *FEBS Lett.* **2004**, 557, 1–8.
- 477 (10) Gorchev, H. G.; Ozolins, G. Guidelines for Drinking-water Quality. *Who* **2011**, 1, 564.
- 478 (11) Paerl, H. W.; Huisman, J. Blooms like it hot. *Science* **2008**, 320 (5872), 57–58.
- 479 (12) Paerl, H. W. Mitigating Harmful Cyanobacterial Blooms in a Human- and Climatically-
480 Impacted World. *Science* 2014, *Life* **2014**, 4 (4), 988–1012.
- 481 (13) Butterwick, C.; Heaney, S. I.; Talling, J. F. Diversity in the influence of temperature on
482 the growth rates of freshwater algae, and its ecological relevance. *Freshw. Biol.* **2005**, 50
483 (2), 291–300.
- 484 (14) Poste, A. E.; Hecky, R. E.; Guildford, S. J. Evaluating microcystin exposure risk through
485 fish consumption. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, 45 (13), 5806–5811.
- 486 (15) Singh, S.; Srivastava, A.; Oh, H. M.; Ahn, C. Y.; Choi, G. G.; Asthana, R. K. Recent
487 trends in development of biosensors for detection of microcystin. *Toxicon* **2012**, 60 (5),
488 878–894.
- 489 (16) Alvarenga, L. M.; Muzard, J.; Ledreux, A.; Bernard, C.; Billiald, P. Colorimetric
490 engineered immunoprobe for the detection and quantification of microcystins. *J. Immunol.*
491 *Methods* **2014**, 406, 124–130.
- 492 (17) McElhiney, J.; Lawton, L. A.; Porter, A. J. R. Detection and quantification of microcystins

- (cyanobacterial hepatotoxins) with recombinant antibody fragments isolated from a naive human phage display library. *FEMS Microbiol Lett.* **2000**, *193*, 83–88.
- (18) Gracheva, M.E., Ed. *Nanopore-based Technology*. Humana Press: New York, 2012.
- (19) Aguiar, J. P.; Júnior, J. J. S.; Machado, D. C.; Melo, M. C. A.; Rodrigues, C. G. Biossensoriamento estocástico via nanoporo proteico individual no desenvolvimento de ferramentas analíticas. *Quim. Nova* **2015**, *38* (6), 817–827.
- (20) Gu, L. Q.; Braha, O.; Conlan, S.; Cheley, S.; Bayley, H. Stochastic sensing of organic analytes by a pore-forming protein containing a molecular adapter. *Nature* **1999**, *398* (6729), 686–690.
- (21) Gurnev, P. A.; Nestorovich, E. M. Channel-forming bacterial toxins in biosensing and macromolecule delivery. *Toxins* **2014**, *6* (8), 2483–2540.
- (22) Robertson, J. W. F.; Rodrigues, C. G.; Stanford, V. M.; Robinson, K. A.; Krasilnikov, O. V.; Kasianowicz, J. J. Single-molecule mass spectrometry in solution using a solitary nanopore. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104* (20), 8207–8211.
- (23) Bayley, H. Nanopore sequencing: From imagination to reality. *Clin. Chem.* **2015**, *61* (1), 25–31.
- (24) Kang, X. F.; Cheley, S.; Guan, X.; Bayley, H. Stochastic detection of enantiomers. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (33), 10684–10685.
- (25) Kawano, R.; Osaki, T.; Sasaki, H.; Takinoue, M.; Yoshizawa, S.; Takeuchi, S. Rapid detection of a cocaine-binding aptamer using biological nanopores on a chip. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (22), 8474–8477.

- 514 (26) Baaken, G.; Halimeh, I.; Bacri, L.; Pelta, J.; Oukhaled, A.; Behrends, J. C. High-
515 Resolution Size-Discrimination of Single Nonionic Synthetic Polymers with a Highly
516 Charged Biological Nanopore. *ACS Nano* **2015**, 9 (6), 6443–6449.
- 517 (27) Rodrigues, C. G.; Machado, D. C.; Silva, A. M. B.; Júnior, J. J. S.; Krasilnikov, O. V.
518 Hofmeister effect in confined spaces: Halogen ions and single molecule detection.
519 *Biophys. J.* **2011**, 100 (12), 2929–2935.
- 520 (28) Machado, D. C.; Júnior, J. J. S.; Melo, M. C. A.; Silva, A. M. B.; Fontes, A.; Rodrigues,
521 C. G. Effects of alkali and ammonium ions in the detection of poly(ethyleneglycol) by
522 alpha-hemolysin nanopore sensor. *RSC Adv.* **2016**, 6 (61), 56647–56655.
- 523 (29) Trogen, G. B.; Annala, A.; Eriksson, J.; Kontteli, M.; Meriluoto, J.; Sethson, I.; Zdunek, J.;
524 Edlund, U. Conformational studies of microcystin-LR using NMR spectroscopy and
525 molecular dynamics calculations. *Biochemistry* **1996**, 35 (10), 3197–3205.
- 526 (30) Oostenbrink, C.; Soares, T. A.; Van Der Vegt, N. F. A.; Van Gunsteren, W. F. Validation
527 of the 53A6 GROMOS force field. *Eur. Biophys. J.* **2005**, 34 (4), 273–284.
- 528 (31) Hess, B.; Kutzner, C.; Van Der Spoel, D.; Lindahl, E. GROMACS 4: Algorithms for
529 highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *J. Chem. Theory*
530 *Comput.* **2008**, 4 (3), 435–447.
- 531 (32) Van Der Spoel, D.; Lindahl, E.; Hess, B.; Groenhof, G.; Mark, A. E.; Berendsen, H. J. C.
532 GROMACS: Fast, flexible, and free. *J. Comput. Chem.* **2005**, 26 (16), 1701–1718.
- 533 (33) Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; Hermans, J. Interaction
534 models for water in relation to protein hydration. In *Intermolecular Forces*; Pullman, B.,

- 535 Ed.; Springer Netherlands **1981**, 331–342.
- 536 (34) Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; DiNola, A.; Haak, J. R.
537 Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* **1984**, *81* (8), 3684–
538 3690.
- 539 (35) Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol.*
540 *Graphics* **1996**, *14* (1), 33–38.
- 541 (36) Baker, N. A.; Sept, D.; Joseph, S.; Holst, M. J.; McCammon, J. A. Electrostatics of
542 nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**,
543 *98* (18), 10037–10041.
- 544 (37) Fogolari, F.; Brigo, A.; Molinari, H. The Poisson-Boltzmann equation for biomolecular
545 electrostatics: A tool for structural biology. *J. Mol. Recognit.* **2002**, *15* (6), 377–392.
- 546 (38) Dolinsky, T. J.; Nielsen, J. E.; McCammon, J. A.; Baker, N. A. PDB2PQR: An automated
547 pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res.*
548 **2004**, *32*, 665–667.
- 549 (39) Sitkoff, D.; Sharp, K. A.; Honig, B. Accurate Calculation of Hydration Free Energies
550 Using Macroscopic Solvent Models. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98* (7), 1978–1988.
- 551 (40) Song, L.; Hobaugh, M. R.; Shustak, C.; Cheley, S.; Bayley, H.; Gouaux, J. E. Structure of
552 staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* **1996**, *274*
553 (5294), 1859–1865.
- 554 (41) Magalhães, C. S.; Almeida, D. M.; Barbosa, H. J. C.; Dardenne, L. E. A dynamic niching
555 genetic algorithm strategy for docking highly flexible ligands. *Inform. Sciences* **2014**, *289*,

- 556 206–224.
- 557 (42) Voss, N. R.; Gerstein, M. 3V: Cavity, channel and cleft volume calculator and extractor.
558 *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 555–562.
- 559 (43) Rodrigues, C. G.; Machado, D. C.; Chevtchenko, S. F.; Krasilnikov, O. V. Mechanism of
560 KCl enhancement in detection of nonionic polymers by nanopore sensors. *Biophys. J.*
561 **2008**, *95* (11), 5186–5192.
- 562 (44) Bezrukov, S. M. Ion channels as molecular coulter counters to probe metabolite transport.
563 *J. Membr. Biol.* **2000**, *174* (1), 1–13.
- 564 (45) Branton, D.; Deamer, D. W.; Marziali, A.; Bayley, H.; Benner, S. A.; Butler, T.; Di
565 Ventra, M.; Garaj, S.; Hibbs, A.; Huang, X.; Jovanovich, S. B.; Krstic, P. S.; Lindsay, S.;
566 Ling, X. S.; Mastrangelo, C. H.; Meller, A.; Oliver, J. S.; Pershin, Y. V.; Ramsey, J. M.;
567 Riehn, R.; Soni, G. V.; Tabard-Cossa, V.; Wanunu, M.; Wiggin, M.; Schloss, J. The
568 potential and challenges of nanopore sequencing. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26* (10), 1146–
569 1153.
- 570 (46) Gu, L. Q.; Wanunu, M.; Wang, M. X.; McReynolds, L.; Wang, Y. Detection of miRNAs
571 with a nanopore single-molecule counter. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2012**, *12* (6), 573–584.
- 572 (47) Movileanu, L.; Schmittschmitt, J. P.; Scholtz, J. M.; Bayley, H. Interactions of peptides
573 with a protein pore. *Biophys. J.* **2005**, *89* (2), 1030–1045.
- 574 (48) Zhao, Q.; Jayawardhana, D. A.; Wang, D.; Guan, X. Study of peptide transport through
575 engineered protein channels. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113* (11), 3572–3578.
- 576 (49) Maagd, P. G. Jan.; Hendriks, A. Jan.; Seinena, W.; Sijma, D. T. H. M. pH-Dependent

- 577 hydrophobicity of the cyanobacteria toxin microcystin-LR. *Wat. Res.* **1999**, 33 (3), 677-
578 680.
- 579 (50) Noskov, S. Y.; Im, W.; Roux, B. Ion Permeation through the α -Hemolysin Channel:
580 Theoretical Studies Based on Brownian Dynamics and Poisson-Nernst-Planck
581 Electrodiffusion Theory. *Biophys. J.* **2004**, 87, 2299–2309.
- 582 (51) Bhattacharya, S.; Muzard, J.; Payet, L.; Math, J.; Bockelmann, U.; Aksimentiev A.;
583 Viasnoff V. Rectification of the Current in α -Hemolysin Pore Depends on the Cation
584 Type: The Alkali Series Probed by Molecular Dynamics Simulations and Experiments. *J.*
585 *Phys. Chem.* **2011**, 115 (10), 4255–4264;
- 586 (52) Breton M. F., Discala F., Bacri L., Foster D., Pelta J. and Oulchaed A. Exploration of
587 Neutral Versus Polyelectrolyte Behavior of Poly(ethylene glycol)s in Alkali Ion Solutions
588 using Single-Nanopore Recording. *J. Phys. Chem. Lett.*, **2013**, 4 (13), pp 2202–2208.
- 589 (53) Liu, I., L. A. Lawton, and P. K. Robertson. Mechanistic studies of the photocatalytic
590 oxidation of microcystin-LR: an investigation of byproducts of the decomposition process.
591 *Environ. Sci. Technol.* **2003**, 37(14), 3214-3219.
- 592

7 CONCLUSÕES

Neste trabalho, investigamos o potencial do nanoporo formado pela alfatoxina em detectar e identificar três variantes estruturais de MCs, bem como as interações envolvidas na formação do complexo MCs-nanoporo. Logo, encontramos que:

1. O nanoporo da alfatoxina mostrou-se eficiente na detecção, quantificação e identificação das MCs LR, RR e YR, por apresentar três perfis característicos de bloqueio.
2. O nanoporo da alfatoxina é capaz de distinguir simultaneamente e em tempo real três variantes estruturais de MCs.
3. Utilizando métodos computacionais, observamos que interações de caráter eletrostáticas contribuem de forma significativa com as interações entre as MCs e o nanoporo.
4. O perfil positivamente carregado adquirido pela MC-RR favorece sua interação com o nanoporo, o que não ocorre com as MCs LR e YR.
5. O menor perfil de hidratação da MC-LR favorece sua interação com o nanoporo, quando comparado com a MC-YR.
6. O nanoporo da alfatoxina se mostrou uma promissora ferramenta de auxílio às técnicas já empregadas para o monitoramento de MCs em meio aquoso.

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, M.; YADAV, S.; PATEL, C.; RAIPURIA, N.; AGRAWAL M. K. Bioassay methods to identify the presence of cyanotoxins in drinking water supplies and their removal strategies. *Euro. J. Exp. Bio.* (2):321-336, 2012.

AGUIAR, J. P.; JÚNIOR, J. J. S.; MACHADO, D. C.; MELO, M. C. A.; RODRIGUES, C. G. Biossensoriamento estocástico via nanoporo proteico individual no desenvolvimento de ferramentas analíticas. *Quim. Nova*, Vol. 38, No. 6, 817-827, 2015.

ASTIER, Y.; BAYLEY, H.; HOWORKA, S. Protein components for nanodevices. *Curr. Opin. Chem Biol.* 9:576-584, 2005.

AYUMI, H. I.; MICHIO, N.; MASAO, S. The design of molecular sensing interfaces with lipid-bilayer assemblies, *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 27, No. 6, 2008.

BAKER, N. A.; SEPT, D.; HOLST, M.J.; MCCAMMON, J.A. The adaptive multilevel finite element solution of the Poisson–Boltzmann equation on massively parallel computers. *IBM J. Res. Develop.* 45, 427–438, 2001.

BAŞTUĞ T. & KUYUCAK S. Molecular dynamics simulations of membrane proteins. *Biophys Rev.* 4:271–282, 2012.

BAYLEY H. & CREMER P. S. Stochastic sensors inspired by biology. *Nature.* 413 (13): 226-230, 2001.

BECK, C.; KNOOP, H.; ANMANN, I. M.; STEUER, R. The diversity of cyanobacterial metabolism: genome analysis of multiple phototrophic microorganisms. *BMC Genomics*, V.13, n.56, p.1-17, 2012.

BELKIN M.; MAFFEO C.; WELLS D. B.; AKSIMENTIEV A. Stretching and Controlled Motion of Single-Stranded DNA in Locally Heated Solid-State Nanopores. *ACS NANO*. 7, 6816–6824. 2013.

BELLUZO M. S.; RIBONE M. É.; AND LAGIER C. M. Assembling Amperometric Biosensors for Clinical Diagnostics. *Sensors*. 8, 1366-1399, 2008.

BERNARDI, R. C.; MELO, M. C. R.; SCHULTEN K. Enhanced sampling techniques in molecular dynamics simulations of biological systems. *Biochimica et Biophysica Acta* 1850 872–877. 2015.

BEZRUKOV, S. M.; KRASILNIKOV, O. V.; YULDASHEVA, N.; BEREZHKOVSII, A. M.; RODRIGUES, C. G. Field-Dependent Effect of Crown Ether (18-Crown-6) on Ionic Conductance of α -Hemolysin Channels. *Biophys J*. 8:3162–3171, 2004.

BRAHA, O.; WALKER, B.; CHELEY, S.; KASIANOWICZ, J. J.; SONG, L.; GOUAUX, J. E.; BAYLEY, H. Designed protein pores as components for biosensors. *Chem Biol*. 4:497–505, 1997.

CAMPA`S M. AND MARTY J. L. Highly sensitive amperometric immunosensors for microcystin detection in algae. *Biosensors Bioelectron*. Available online 21 June 2006.

CHORUS I. Cyanobacterial toxin research and its application in Germany: a review of the current status. *Environ.Toxicol*. 8: 1520-4081. 2002.

COLQUHOUN D. AND SIGWORTH F. J. Fitting and statistical analysis of single-channel records. In *Single Channel Recording*. B. Sakmann and E. Neher, editors, 2^aEd. Plenum Publishing Corp., New York. Cap 18. 397-430, 2009.

CONLEY, D. J.; PEAERL, H. W.; HOWARTH, R. W.; BOESCH, D. F.; SEITZINGER, S. P.; HAVENS, K. E.; LANCELOT, C.; LIKENS, G. E. Controlling Eutrophication: Nitrogen and Phosphorus. *Science*, v.323, p.1014-1015, 2009.

DIAS R. P.; LI L.; SOARES T. A.; ALEXOV E. Modeling the Electrostatic Potential of Asymmetric Lipopolysaccharide Membranes: The MEMPOT Algorithm Implemented in DelPhi. *Journal of C. Chemistry*. 35, 1418–1429. 2014.

DELANO, W. L. Unraveling hot spots in binding interfaces: progress and challenges. *Curr Opin Struct Biol*. 12(1):14-20, 2002.

DÖRR, F. A.; PINTO, E.; SOARES, R. M.; OLIVEIRA, F.; AZEVEDO, S. M. Microcystins in South American aquatic ecosystems: Occurrence, toxicity and toxicological assays. *Toxicon*. 56: 1247e1256, 2010.

DURRANT J. D. AND MCCAMMON J. A. Molecular dynamics simulations and drug discovery. *BMC Biology*, 9:71, 2011.

FERREIRA L. G., SANTOS R. N., OLIVA G. AND ANDRICOPULO A. D. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. *Molecules*. 20, 13384-13421, 2015.

FISCHER W. J., ALTHEIMERA S., CATTORIB V., MEIERB P. J., DIETRICH D.R., HAGENBUCH B. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxic. and A. Pharmacology*. 203, 257–263, 2005.

GAGLIARDI L. J. AND SHAIN D. H. Polar electrostatic forces drive poleward chromosome motions. *Cell Division*. 9:5. 2014.

GEHRINGER M. M. Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response. FEBS Letters. 557: 1-8, 2004.

GRAVES, P. R.; HAYSTEAD, T. A .J. Molecular biologist's guide to proteomics. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66 (1), 39–63, 2002

GRAY, G. S.; KEHOE, M. Infect Immun. Primary sequence of the alpha-toxin gene from *Staphylococcus aureus* wood 46. 46(2):615-8, 1984.

GU, L.Q.; BRAHA, O.; CONLAN, S.; CHELEY, S.; BAYLEY, H. Stochastic sensing of organic analytes by a pore-forming protein containing a molecular adapter, Nature, 398:686-690, 1999.

HANWELL, M. D.; CURTIS, D. E.; LONIE, D. C.; VANDERMEERSCH, T.; ZUREK E.; HUTCHISON, G. R. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. J. Cheminformatics.4, 17. 2012.

HERRANZ, S.; MARKÉTA, B.; MARAZUELA, M. D.; HOMOLA, J.; MORENO-BONDI, M. C. An SPR biosensor for the detection of microcystins in drinking water. Anal Bioanal Chem. 3856-8, 2010.

HESS, B.; VAN DER SPOEL, D.; LINDAHL, E. Gromacs 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. J. Chem. Theor. Comput., 4, 435–447, 2008.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: visual molecular dynamics. J Mol Graph. 14, 1, 33-8, 27-8, 1996.

HONIG B. AND NICHOLLS A. Classical Electrostatics in Biology and Chemistry. Science, New Series. 268, 1144-1149. 1995.

JASIONEK, G.; A. ZHDANOV, J.; DAVENPORT, L. B. AND PAPKOVSKY, D. B. Mitochondrial toxicity of microcystin-LR on cultured cells: application to the analysis of contaminated water samples. *Environ. Sci. Technol.* 44: 2535-2541, 2010.

KARPLUS, M. & MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nat Struct Biol.* (9):646-52, 2002.

KASIANOWICZ, J. J.; HENRICKSON, J. E.; WEETALL, H. H.; ROBERTSON, B. Simultaneous multianalyte detection with a nanometer-scale pore. *Anal. Chem.* 73:2268-2272, 2001.

KASIANOWICZ, J. J.; HENRICKSON, S. E.; MISAKIAN, M.; WEETALL, H. H.; ROBERTSON, B. Structure and dynamics of confined polymers (eds Kasianowicz, J. J., Kellermayer, M. S. Z. & Deamer, D.W.) 141–163 (Kluwer, Dordrecht), 2002.

KASIANOWICZ, J. J.; ROBERTSON, J. W. F.; CHAN, E. R.; REINER, J. E.; STANFORD, V. M. Nanoscopic Porous Sensors *Annu. Rev. Anal. Chem.* 1, 737, 2008.

KAWANO, R.; OSAKI, T.; SASAKI, H.; TAKINOUE, M.; YOSHIZAWA, S.; TAKEUCHI, S. Rapid detection of a cocaine-binding aptamer using biological nanopores on a chip. *J. Am. Chem. Soc.* 133 (22), 8474–8477, 2011

KISSINGER P. T. Biosensors - a perspective. *Biosensors and Bioelectronics.* 20 2512–2516, 2005.

KRASILNIKOV, O. V.; MERZLYAK, P. G.; YULDASHEVA, L. N.; RODRIGUES C. G.; BHAKDI, S.; VALEVA, A. Electrophysiological evidence for heptameric stoichiometry of ion channels formed by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin in planar lipid bilayers. *Mol. Microbiol.* 37(6):1372-8, 2000.

LEACH A. R. Molecular modelling, principles, applications. Prentice Hall, New York, 2001.

LAWTON, L. A.; EDWARDS, C.; CODD, G. A. Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. *Analyst* 119:1525–1530, 1994.

LU H.; GIORDANO F.; NING Z. Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. *Genomics Prot. Bioinf.* 14, 265–279, 2016.

MACHADO, D. C.; JÚNIOR, J. J. S.; MELO, M. C. A.; SILVA, A. M. B.; FONTES, A.; RODRIGUES, C. G. Effects of alkali and ammonium ions in the detection of poly(ethyleneglycol) by alpha-hemolysin nanopore sensor. *RSC Adv.* 6 (61), 56647–56655, 2016.

MAFFEO, C.; BHATTACHARYA, S.; YOO, J.; WELLS, D.; AKSIMENTIEV, A. Modeling and Simulation of Ion Channels. *Chem. Rev.* 112, 6250–6284, 2012.

MAGALHÃES, C. S.; ALMEIDA, D. M.; BARBOSA, H. J. C.; DARDENNE, L. E. A dynamic niching genetic algorithm strategy for docking highly flexible ligands. *Inform. Sciences*, 289, 206–224, 2014.

MOHAMED, Z. A.; HUSSEIN, A. A. Depuration of microcystins in tilapia fish exposed to natural populations of toxic cyanobacteria: A laboratory study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, New York, v.63, p.424-429, 2006.

MONTAL M. & MUELLER P. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proc Nat Acad Sci USA.* 69(12):3561-3566, 1972.

MOVILEANU, L.; SCHMITTSCHMITT, J. P.; SCHOLTZ, J. M.; BAYLEY, B. Interactions of peptides with a protein pore. *Biophys J.* 89:1030–1045, 2005.

MOVILEANU L. Watching Single Proteins Using Engineered Nanopores. *Protein & Peptide Letters.* 21, 235-246, 2014.

MSAGATI, T. A. M.; SIAME, B. A.; SHUSHU, D. D. Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. *Aquatic Toxicology* 78:382–397, 2006.

NISHIWAKI-MATSUSHIMA, R.; OHTA, T.; NISHIWAKI, S.; SUGANUMA, M.; KOHYAMA, K.; ISHIKAWA, T.; CARMICHAEL, W. W. & FUJIKI, H. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 118: 420-424, 1992.

OOSTENBRINK, C.; SOARES, T. A.; VAN DER VEGT, N. F. A.; VAN GUNSTEREN, W. F. Validation of the 53A6 GROMOS force field. *European Biophysics Journal*, V 34, 4, p. 273-284, 2005.

PAERL, H. W. & HUISMAN, J. Blooms Like It Hot. *Science.* 320, 57-58, 2008.

PEARSON, L.; MIHALI, T.; MOFFITT, M.; KELLMANN, R.; NEILAN, B. On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. *Mar Drugs.* 8, 1650-1680, 2010.

POL-FACHIN, L.; VERLI, H. AND LINS, R. D. Extension and validation of the GROMOS 53A6glyc parameter set for glycoproteins. *Journal of Computational Chemistry* V. 35, 29, p. 2087–2095, 2014.

POURIA, S.; ANDRADE, A.; BARBOSA J.; CAVALCANTI, R. L; BARRETO, V. T. S.; WARD, C. J.; PREISER, W.; POON, G. K.; NEILD, G. H.; CODD, G. A.

Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *Lancet*. 352: 21-26, 1998.

PUDDICK, J.; PRINSEP, M. R.; WOOD, S. A.; KAUFONONGA, S. A. F.; CARY, S. C.; HAMILTON, D. P. High levels of structural diversity observed in microcystins from microcystis CAWBG11 and characterization of six new microcystin congeners. *Mar. Drugs*. 12(11), 5372–5395, 2014.

RAVI H. K.; STACH M.; SOARES T. A.; DARBRE T.; REYMONDA J. L.; CASCELLA M. Electrostatics and flexibility drive membrane recognition and early penetration by the antimicrobial peptide dendrimer bH1. *Chem. Commun.* 49, 8821—8823. 2013.

REIS, E. C. Docking e análise do modo de ligação de três moléculas pequenas, um benzimidazol e dois compostos de crômio, nos sulcos do dna 5'-cgcgaaattcgcg-3'. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho". São Paulo, São Paulo, 2008.

ROBERTSON, J. W. F.; RODRIGUES, C. G.; STANFORD, V. M.; RUBINSON, K. A.; KRASILNIKOV, O. KASIANOWICZ, J. J. Single-molecule mass spectrometry in solution using a solitary nanopore. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (20), 8207–8211, 2007.

ROBERTSON, J. W. F.; KASIANOWICZ J. J.; BANERJEE, S. Analytical Approaches for Studying Transporters, Channels and Porins. *Chem. Rev.* 112, 6227–6249, 2012.

RODRIGUES C. G. Transporte de moléculas orgânicas através de poros nanoscópicos unitários. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, 2006.

RODRIGUES, C., MACHADO, D., CHEVTCHENKO S., KRASILNIKOV O. Mechanism of KCl Enhancement in Detection of Nonionic Polymers by Nanopore Sensors. *Biophysical Journal*, v. 95, p. 5186-5192, 2008.

RODRIGUES, C. G.; CHEVTCHENKO, S. F.; KRASILNIKOV, O. V.; MACHADO, D. C.; DE AGUIAR J. P.; SILVA JUNIOR, J. J. Use of a protein nanopore for the detection, identification, quantification and real-time monitoring of microcystins in aqueous systems. Patent, WO2013026123 A1, 2013.

RUSU, V. H.; BARON, R.; LINS, R. D. PITOMBA. Parameter Interface for Oligosaccharide Molecules Based on Atoms. *J. Chem. Theory Comput.* 10 (11), p. 5068–5080, 2014.

SANGOLKAR, L. N.; MASKE, S. S.; CHAKRABARTI, T. Methods for determining microcystins (peptide hepatotoxins) and microcystin producing cyanobacteria. *Wat. Res.* 40, 3485–3496, 2006.

SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. P.; WERNER, V. R.; DOGO, C. R.; RIOS, F. R.; CARVALHO, L. R. Review of toxic species of Cyanobacteria in Brazil. *Algological Studies* 126: 249-263, 2008.

SCHMIDT, J. R.; WILHELM, S. W.; BOYER, G. L. The Fate of Microcystins in the Environment and Challenges for Monitoring. *Toxins.* 12;6(12):3354-3387, 2014.

SHAW, D. E.; MARAGAKIS, P.; LINDORFF-LARSEN, K.; PIANA, S.; DROR, R. O.; EASTWOOD, M. P.; BANK, J. A.; JUMPER, J. M; SALMON, J.K.; SHAN, Y.; WRIGGERS, W. Atomic-level characterization of the structural dynamics of proteins. *Science*, 330, 15, 341-346, 2010.

SINGH, S.; SRIVASTAVA, A.; OH, H. M.; AHN C. Y.; CHOI, G. G.; ASTHANA, R. K. Recent trends in development of biosensors for detection of microcystin. *Toxicon* 60 878–894, 2012.

SOARES, T. A., Ferreira, R. Applications of the Poisson-Boltzmann Equation to the Calculation of pH-Dependent Properties in Proteins. *Quím. Nova.* v.27, p.640 - 647, 2004.

SONG, L.; HOBAUGH, M. R.; SHUSTAK, C.; CHELEY, S.; BAYLEY, H.; GOUAUX, J. E. Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science.* 13; 274:1859-66, 1996.

SOTHISELVAM, S.; LIU, B.; HAN, W.; RAMU, H.; KLEPACKI, D.; ATKINSON, G. C.; BRAUER, A.; REMM, M.; TENSON, T.; SCHULTEN, K.; VÁZQUEZ-LASLOP, N.; MANKIN, A. S. Macrolide antibiotics allosterically predispose the ribosome for translation arrest. *PNAS.* v. 111 n. 27, 9804–9809, 2014.

THÉVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 16, p. 121-131, 2001.

UNIAGUA – UNIVERSIDADE DA ÁGUA. Disponível em <http://www.uniagua.org.br>. Acesso em 01 fev. 2015.

UNITED NATIONS. The Right to Water. Office of the United Nations High Commissioner for Human Rights United Nations Office at Geneva. 14,465. 2010.

TRINDADE, P. B. C. B. AND MENDONÇA, A. S. F. Eutrofização em reservatórios – Estudo de caso: reservatório de Rio Bonito (ES). *Eng Sanit Ambient.* 19(3), 275-282, 2014.

VERLI H. Bioinformática da Biologia à flexibilidade molecular. -- Porto Alegre, 2014.

VAN GUNSTEREN, W. F.; BAKOWIES, D.; BARON, R.; CHANDRASEKHAR, I.; CHRISTEN, M.; DAURA, X.; GEE, P.; GEERKE, D. P.; GLATTLI, A.; HÜNENBERGER, P. H.; KASTENHOLZ, M. A.; OOSTENBRINK, C.; SCHENK, M.; TRZESNIAK, D.; VAN DER VEGT, N. F. A.; AND, YU H. B. Biomolecular Modeling: Goals, Problems, Perspectives. *Angew. Chem. Int. Ed.* 45, 4064 – 4092, 2006.

WADE K. R.; HOTZE E. M.; KUIPER M. J.; MORTON C. J.; PARKER M. W.; TWETEN R. K. An intermolecular electrostatic interaction controls the prepore-to-pore transition in a cholesterol-dependent cytolysin. *PNAS.* 112. 2204–2209. 2015.

WANG, G.; WANG, L.; HAN, Y.; ZHOU, S.; GUAN, X. Nanopore stochastic detection: Diversity, sensitivity, and beyond. *Acc. Chem. Res.* 46 (12): 2867–2877, 2013.

WELLER, M. G. Immunoassays and Biosensors for the Detection of Cyanobacterial Toxins in Water. *Sensors.* 13, 15085-15112, 2013.

ZACHARIAS M. Protein-Protein Complexes: Analysis, Modeling and Drug Design. London, Imperial College Press. 2010.

APÊNDICE A - Topologia dos resíduos (MASP, ADDA, DEGLU e MDA)

```

[ ADDA ]
[ atoms ]
  N      N      -0.31000  0
  H      H      0.31000  0
  C18    CH1     0.00000  1
  C19    CH3     0.00000  1
  CA     CH1     0.00000  1
  C16    CH2     0.00000  1
  C15    CH2     0.00000  1
  C13    CH1     0.00000  2
  C14    CH3     0.00000  2
  C12    CH2     0.00000  2
  C10    CH1     0.00000  2
  C11    CH3     0.00000  2
  C2     CH1     0.24100  3
  O11    OA      -0.48200  3
  C1     CH3     0.24100  3
  C3     CH2     0.00000  3
  C4     C       0.00000  4
  C5     C      -0.14000  4
  H5     HC      0.14000  4
  C6     C      -0.14000  4
  H6     HC      0.14000  4
  C7     C      -0.14000  4
  H7     HC      0.14000  4
  C8     C      -0.14000  4
  H8     HC      0.14000  4
  C9     C      -0.14000  4
  H9     HC      0.14000  4
  O      O      -0.45000  5
  C      C       0.45000  5

[ bonds ]
  C      0      gb_5
  C18    C      gb_27
  CA     CB      gb_27
  C      +N      gb_10
  N      H      gb_2
  C18    C19     gb_27
  N      CA      gb_21
  CA     C18     gb_27
  CA     C16     gb_27
  C16    C15     gb_27
  C15    C13     gb_27
  C13    C14     gb_27
  C13    C12     gb_27
  C12    C10     gb_27
  C10    C11     gb_27
  C10    C2      gb_27
  C2     O11     gb_18
  C2     C3      gb_27
  O11    C1      gb_18
  C3     C4      gb_27
  C4     C5      gb_16
  C4     C9      gb_16
  C5     H5      gb_3
  C5     C6      gb_16
  C6     H6      gb_3
  C6     C7      gb_16
  C7     H7      gb_3
  C7     C8      gb_16
  C8     H8      gb_3
  C8     C9      gb_16
  C9     H9      gb_3

[ exclusions ]
; ai    aj
  C3     H5
  C3     H9
  C3     C6
  C3     C8
  C4     H6
  C4     H8
  C4     H7
  C5     H9
  C5     C8
  C5     H7
  H5     C9
  H5     H6
  H5     C7
  C9     C6
  C9     H7
  H9     H8
  H9     C7
  C6     H8
  H6     C8
  H6     H7
  H8     H7

```

```
[ angles ]
; ai aj ak gromos typ
-C N CA ga_31
-C N H ga_32
H N CA ga_18
O C +N ga_33
C18 C +N ga_19
N CA C18 ga_13
N CA C16 ga_13
CA C18 C19 ga_13
C16 CA C18 ga_13
CA C18 C ga_15
C19 C18 C ga_15
C18 CA C16 ga_13
C18 C O ga_30
CA C16 C15 ga_15
C16 C15 C13 ga_15
C15 C13 C14 ga_15
C15 C13 C12 ga_15
C14 C13 C12 ga_15
C12 C10 C11 ga_15
C12 C10 C2 ga_13
C13 C12 C10 ga_15
C11 C10 C2 ga_13
C10 C2 O11 ga_13
C10 C2 C3 ga_15
O11 C2 C3 ga_13
C2 O11 C1 ga_13
C2 C3 C4 ga_15
C3 C4 C5 ga_27
C3 C4 C9 ga_27
C5 C4 C9 ga_27
C4 C5 H5 ga_25
C4 C5 C6 ga_27
H5 C5 C6 ga_25
C5 C6 H6 ga_25
C5 C6 C7 ga_27
H6 C6 C7 ga_25
C6 C7 C8 ga_27
C6 C7 H7 ga_25
H7 C7 C8 ga_25
C7 C8 H8 ga_25
C7 C8 C9 ga_27
H8 C8 C9 ga_25
C4 C9 C8 ga_27
C4 C9 H9 ga_25
C8 C9 H9 ga_25
```

```
[ impropers ]
; ai aj ak al gromos type
C C18 +N O gi_1
N -C CA H gi_1
CA N C18 C16 gi_2
C19 CA C C18 gi_2
C15 C14 C12 C13 gi_1
C10 C12 C11 C2 gi_2
C10 O11 C3 C2 gi_2
C4 C5 C9 C3 gi_1
C4 C5 C6 C7 gi_1
C4 C9 C8 C7 gi_1
C5 C4 C9 C8 gi_1
C5 C4 C6 H5 gi_1
C5 C6 C7 C8 gi_1
H6 C5 C7 C6 gi_1
C9 C4 C5 C6 gi_1
C9 C8 C7 C6 gi_1
C7 C6 C8 H7 gi_1
H8 C9 C7 C8 gi_1
C9 C4 C8 H9 gi_1
```

```
[ dihedrals ]
; ai aj ak al gromos type
-CA -C N CA gd_14
-C N CA C18 gd_39
H N CA C18 gd_34
C19 C18 CA N gd_34
CA C16 C15 C13 gd_34
C18 CA C16 C15 gd_34
C16 C15 C13 C12 gd_34
C15 C13 C12 C10 gd_34
C13 C12 C10 C2 gd_34
C12 C10 C2 C3 gd_34
C10 C2 O11 C1 gd_34
C10 C2 C3 C4 gd_34
C2 C3 C4 C9 gd_40
```

```

[ MDA ]
[ atoms ]
  N      N      -0.31000      0
  CM     CH3     0.31000      0
  CA     CH1     0.00000      1
  CB     CH3     0.00000      1
  C      C       0.45000      2
  O      O      -0.45000      2
[ bonds ]
  N      CM      gb_21
  CA     N       gb_21
  CA     CB      gb_27
  C      CA      gb_27
  C      O       gb_5
  C      +N      gb_10
[ angles ]
; ai      aj      ak      gromos type
  -C      N       CA      ga_31
  -C      N       CM      ga_22
  CB      CA      N       ga_13
  CM      N       CA      ga_31
  C       CA      N       ga_13
  C       CA      CB      ga_13
  O       C       CA      ga_22
[ impropers ]

; ai      aj      ak      al      gromos type
  N      -C      CA      CM      gi_1
  CA     N       C       CB      gi_2
  C      CA      +N      O       gi_1
[ dihedrals ]
; ai      aj      ak      al      gromos type
  -CG     -C      N       CA      gd_14
  C       CA      N       -C      gd_39
  N       CA      C       +N      gd_40

[ DGLU ]
[ atoms ]
  N      N      -0.31000      0
  H      H       0.31000      0
  CA     CH1     0.00000      1
  CB     CH2     0.00000      1
  CG     CH3     0.00000      1
  CD     C       0.27000      2
  OE1    OM      -0.63500      3
  OE2    OM      -0.63500      3
  C      C       0.45000      4
  O      O      -0.45000      4
[ bonds ]
  N      H       gb_2
  N      CA      gb_21
  CA     CB      gb_27
  CA     CD      gb_27
  CB     CG      gb_27
  CD     OE1     gb_6
  CD     OE2     gb_6
  CG     C       gb_27
  C      O       gb_5
  C      +N      gb_10
[ angles ]
; ai      aj      ak      gromos type
  -C      N       H       ga_32
  -C      N       CA      ga_31
  H      N       CA      ga_18
  N      CA      CB      ga_13
  N      CA      CD      ga_13
  C      CG      CB      ga_13
  CB     CA      CD      ga_15
  CA     CB      CG      ga_15
  CA     CD      OE1     ga_22
  CA     CD      OE2     ga_22
  OE1    CD      OE2     ga_38
  CG     C       O       ga_30
  +N     C       CG      ga_19
  O      C       +N      ga_33
[ impropers ]
; ai      aj      ak      al      gromos type
  N      -C      CA      H       gi_1
  C      CG      +N      O       gi_1
  CD     OE1     OE2     CA      gi_1
  CA     N       CB      CD      gi_2
[ dihedrals ]
; ai      aj      ak      al      gromos type
  -C18    -C      N       CA      gd_14
  -C      N       CA      CD      gd_39
  -C      N       CA      CB      gd_39
  N      CA      CB      CG      gd_34
  CA     CB      CG      CD      gd_34
  CB     CA      CD      OE1     gd_40
  CA     CB      CG      C       gd_34
  CB     CG      C       +N      gd_34

```

```

[ MASP ]
[ atoms ]
  N      N      -0.31000      0
  H      H      0.31000      0
  CA     CH1     0.00000      1
  CB     CH1     0.00000      1
  C4     CH3     0.00000      1
  CG     C       0.27000      2
  OD1    O       -0.63500      3
  OD2    OM      -0.63500      3
  C       C      -0.45000      4
  O       O       0.45000      4
[ bonds ]
  N      H      gb_2
  N      CA     gb_21
  CA     CB     gb_27
  CB     C       gb_27
  CB     C4     gb_27
  CA     CG     gb_27
  CG     OD1    gb_5
  CG     OD2    gb_13
  C       O      gb_5
  C      +N     gb_10
[ angles ]
; ai    aj    ak    gromos type
  -C     N     H     ga_32
  -C     N     CA    ga_31
  H      N     CA    ga_18
  N      CA    CG    ga_13
  CB     CA    CG    ga_13
  N      CA    CB    ga_13
  C4     CB    C     ga_13
  CA     CB    C4    ga_15
  CA     CB    C     ga_15
  CB     C     O     ga_30
  CA     CG    OD1   ga_22
  CA     CG    OD2   ga_22
  OD1    CG    OD2   ga_38
  CB     C     +N    ga_19
  O      C     +N    ga_33

[ impropers ]
; ai    aj    ak    al    gromos type
  N     -C    CA    H     gi_1
  CA     N    C     CB    gi_2
  CG     OD1  OD2   CA    gi_1
  CB     CA    C     C4    gi_2
  C      CB   +N    O     gi_1
[ dihedrals ]
; ai    aj    ak    al    gromos type
  -CA    -C    N     CA    gd_14
  -C     N     CA    CB    gd_39
  N      CA    CB    C4    gd_34
  CA     CB    C     +N    gd_40
  CB     CA    CG    OD1   gd_40

```

ANEXO A - Artigo publicado na RSC Advances - Royal Society of Chemistry

RSC Advances



PAPER



Cite this: *RSC Adv.*, 2016, 6, 56647

Effects of alkali and ammonium ions in the detection of poly(ethyleneglycol) by alpha-hemolysin nanopore sensor†

Dijana C. Machado, Janilson J. S. Júnior, Maria C. A. Melo, Annielle M. B. Silva, Adriana Fontes and Claudio G. Rodrigues*

Nanopores have emerged as molecule detectors and more studies are necessary to clarify the analyte–nanopore interaction. Here, we report the influence of cations of the Hofmeister series on a simple bimolecular complexation reaction between poly(ethyleneglycol) (PEG) and α -hemolysin (α HL) nanopore at the single-molecule level. The kinetic constants (on-rate and off-rate) of interaction of PEG molecules with α HL nanopore depend strongly on the type of cation. In the case of on-rate constant, the difference reaches several dozen times. As a consequence of this, both transition rate and detection limit of the nanopore-based sensor were changed. An inverse relationship was demonstrated for the off-rate constant and the solubility of PEG. Except lithium, the other alkali metal cations significantly affect the interaction of PEG with the nanopore and, similarly to potassium, they also bind to this polymer. Thus, the PEG/ α HL nanopore interaction can be strongly influenced by the type of cation. The cation-induced specific effect on polymer detection with a single α HL nanopore appears to occur by competition of the cation and PEG by water. Finally, our results represent a guide to select the appropriate physicochemical conditions that enhance the analyte–nanopore interaction, thereby improving the sensitivity of nanopore-based sensors.

Received 10th April 2016
Accepted 7th June 2016

DOI: 10.1039/c6ra09234a

www.rsc.org/advances

Impact Factor: 3.289

ANEXO B - Artigo publicado na Química Nova

Quim. Nova, Vol. 38, No. 6, 817-827, 2015

<http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20150073>

BIOSSENSORIAMENTO ESTOCÁSTICO VIA NANOPORO PROTEICO INDIVIDUAL NO DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS ANALÍTICAS

Juliana P. Aguiar, Janilson J. S. Júnior, Dijanah C. Machado, Maria C. A. Melo e Cláudio G. Rodrigues*

Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife – PE, Brasil

Recebido em 30/12/2014; aceito em 02/02/2015; publicado na web em 30/04/2015

STOCHASTIC BIOSENSING BY A SINGLE PROTEIN NANOPORE IN THE DEVELOPMENT OF ANALYTICAL TOOLS. Studies employing a single protein nanopore as a molecular recognition element in the development of analytical devices - biosensors, spectrometers, DNA sequencing - have increased considerably in the last decade. Several studies show the potential of these bionanostructures for future stochastic biosensing technology. Stochastic biosensing is an approach that relies on the observation of individual binding events between analyte molecules and a single receptor. This approach is inherent to the organisms that use a single protein nanopore as a key element to start, manage and maintain the chemical and biophysical processes of living cells. Here, we discuss alpha-toxin as a bacterial exotoxin and prototype of a protein nanopore in real-time detection and characterization of molecules in aqueous systems.

Keywords: alpha-toxin; biosensor; nanopore; stochastic biosensing.

Impact Factor: 0.617