
Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Bioquímica e Imunologia

**INVESTIGAÇÃO DA CONFORMAÇÃO DE
BOTHROPSTOXINA-I (PLA₂-Lys 49) DO VENENO DE
Bothrops jararacussu EM SOLUÇÃO E EM ASSOCIAÇÃO COM
MEMBRANAS ARTIFICIAIS.**

TATIANA LOPES FERREIRA

**MAIO
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Bioquímica e Imunologia

**INVESTIGAÇÃO DA CONFORMAÇÃO DE
BOTHROPSTOXINA-I (PLA₂-Lys 49) DO VENENO DE
Bothrops jararacussu EM SOLUÇÃO E EM ASSOCIAÇÃO COM
MEMBRANAS ARTIFICIAIS.**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto para obtenção do Título de
Doutor em Ciências, área de concentração
Bioquímica.

TATIANA LOPES FERREIRA

**MAIO
2008**

FICHA CATALOGRÁFICA

Ferreira, Tatiana Lopes

Investigação da Conformação de Bothropstoxina-I (PLA₂-Lys 49) do Veneno de *Bothrops Jararacussu* em Solução e em Associação com Membranas Artificiais.

Ribeirão Preto, 2008.

122 p.: il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Ward, Richard John.

1. Fosfolipases A₂; 2. mutagênese sítio-dirigida; 3. Fluorescência Intrínseca do Triptofano



Dedico este trabalho a **DEUS**
pela confiança, oportunidade e imenso amor.



AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda minha Família pelo exemplo e em especial ao

Meu **Pai** pela paciência,

Minha **Mãe** pela força,

A **Tânia** pelo afeto,

Ao **Nenê** pela alegria,

A **Nilma** e **Dinho** pela superação,

Ao **Davi** e **Laurinha** pela esperança de que tudo não é em vão.

Agradeço a minha segunda família:

Luizinho, Tininha, Dandan e Jow

Pelo companheirismo nas horas difíceis e animação.

Ao meu querido Manu

Em todo período de desenvolvimento deste trabalho

Seus olhos iluminaram minha alma,

Seu sorriso foi como brisa que abrandou a chama da dúvida,

Seus conselhos me indicaram o caminho correto,

Sua energia me deu forças para continuar,

Sua paciência acalmou o furacão de informações em minha mente,

Seu carinho me alentou no cansaço,

Mas, sobretudo, foi no seu amor que encontrei sentido para persistir e vencer.

AMO MUITO VOCÊ.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Richard John Ward do Depto. de Química da FFCLRP – USP, pela oportunidade, dedicação e amizade no processo de desenvolvimento deste trabalho e de tantos outros, o meu muito obrigado.

À FAPESP, CAPES e FAEPA pelo apoio financeiro;

Aos Profs. Dr. Pietro Ciancaglini do Depto. de Química da FFCLRP- USP, Dr. Cláudio Miguel da Costa Neto do Depto. de Bioquímica da FMRP – USP, Dr. Amando Siuiti Ito do Depto. de Física da FFCLRP – USP, Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes do Depto. de Física e Biofísica da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, pela participação na avaliação de minha Tese.

Ao Prof. Dr. Roy Eduard Larson do Depto. de Biologia Celular e Bioagentes Patogênicos da FMRP - USP pela utilização de seu laboratório durante toda minha iniciação científica e pela atenção durante a disciplina de Biologia Celular.

À Profa. Dra. Angela Kaysel Cruz do Depto. de Biologia Celular e Bioagentes Patogênicos da FMRP - USP pelo uso do laboratório

Ao Prof. Dr. Pietro Ciancaglini do Depto. de Química da FFCLRP pela utilização de seu laboratório, pela dedicação durante as disciplinas, pela ajuda em meu exame de qualificação e por sua imensa simpatia.

Ao Prof. Dr. José Roberto Giglio do Depto. de Bioquímica e Imunologia da FMRP e Prof. Dra. Laura Tiemi Okano do Depto de Química da FFCLRP pela atenção em meu exame de qualificação

À Profa. Dra. Maria Cristina Nonato, e seus alunos Patrícia e Matheus do Depto. de Físico-Química da FCFRP pela dedicação e apoio durante a disciplina de Cristalografia de Proteínas.

Aos professores Dr. Osvaldo Antônio Serra, Dr. Marcos Paulo Donate, Dra. Marcia Andréia Mesquita Silva da Veiga, Dr. Richard John Ward e Dr. Arthur Henrique Cavalcante de Oliveira pela ajuda e oportunidade em trabalhar juntos no Programa de Aperfeiçoamento do Ensino (PAE).

À Prof. Dr. Constance Oliver do Depto. de Biologia Celular e Bioagentes Patogênicos da FMRP pela disponibilização do laboratório para os experimentos de afinidade de BthTx-I sobre lipossomos.

Ao Prof. Dr. Antônio Cláudio Tedesco do Depto. de Química da FFCLRP pela disponibilização do fluorímetro de seu laboratório

À Profa. Dra. Maria Helena Goldmann e sua aluna Andréa da FFCLRP pelo seqüenciamento das amostras de DNA.

A técnica Tânia Paula Aquino Defina do Depto. de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da FMRP – USP, pela ajuda com o seqüenciamento das amostras de DNA.

Aos técnicos Pita, Silvia, Ivana Aparecida Borin e Milton Rosa Alves pela amizade e auxílio nos experimentos do projeto.

Às secretárias Ivone e Lucia do Depto. de Bioquímica e Imunologia da FMRP pela ajuda e eficiência em todos os momentos.

A todos os funcionários do Depto. de Química da FFCLRP-USP, e os secretários Lâmia, Bel, Maria, André e Emerson pela atenção nos assuntos burocráticos.

Ao Dr. Fabio Antonio Schaberle pela ajuda e companhia nos experimentos de fluorescência de tempo resolvido no Laboratório Nacional de Luz Síncotron (LNLS).

Ao meu amigo Roberto Ruller por sua amizade. Obrigado pelos ensinamentos, pelas risadas, por seu carinho e até pelas broncas, pois sei que para você serei sua eterna IC.

Aos amigos de laboratório Lica, Rachel, Carlinha, Leilinha, Paty, Lelis, Plínio, Jú, Gisele, João, dupla Lucas e Gilvan e tantos outros que por aqui deixaram sua marca Arthur (como pós graduando), Lucimara, Juliana, Cássia, Fernando, Karina, Wagninho, Cíntia, Willian, obrigado pela companhia, diversão e aprendizado. Sempre lembrarei de vocês todos com muita afeição e sempre que precisarem estarei pronta para dar minha mão e meu coração.

A todos os professores, funcionários e amigos do Depto. de Bioquímica e Imunologia da FMRP.

A todos os professores, funcionários e amigos do Departamento de Química da FFCLRP.

Finalmente, muito obrigada àqueles que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

I – INTRODUÇÃO	1
II – OBJETIVOS	14
1 – Objetivo geral	14
2 – Estratégia geral	14
3 – Objetivos específicos.....	17
III - TEORIA	18
1 – Fluorescência	18
2 – Fluorescência Intrínseca do Triptofano (FIT).....	20
3 – Espectroscopia de fluorescência no estado estático.....	21
3.1 – Espectros de Emissão de fluorescência intrínseca do triptofano (EFIT).....	21
3.2 – Anisotropia de fluorescência.	22
4 – Espectroscopia de fluorescência com resolução temporal.	23
4.1 - Fluorimetria de pulso.....	24
4.1.1 - Técnica de Contagem de fóton único correlacionada no tempo (TCSPC - Time Correlated Single Photon Counting)	26
4.2 - Fluorimetria pelo método harmônico	28
5 – Transferência de Energia por Ressonância (TER).....	33
6 – Simulação de Dinâmica Molecular.....	36
IV – MATERIAIS E MÉTODOS	38
1 – Preparação dos fragmentos	38
1.1 - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	38
1.2 - Mutagênese Sítio Dirigida	40
2 - Preparação dos vetores pT7T3 e pET3d.....	42
3 - Ligação do gene mutado ao vetor pT7T3.....	43

4 - Transformação e Seleção do gene <i>Btx-I</i> ligado em células competentes de DH5 α de <i>E. coli</i>	43
5 - Extração do DNA mutante de células DH5 α de <i>E. coli</i>	44
6 - Seqüenciamento de nucleotídeos de DNA.	45
7 - Subclonagem dos genes recombinantes mutados ao vetor de expressão pET3d	46
8 - Expressão e Purificação de BthTX-I.....	47
8.1 - Transformação rápida de <i>E. coli</i> linhagem BL21[DE3]pLysS	47
8.2 - Expressão da proteína recombinante	47
8.3 - Renovelamento de Bothroptoxina - I recombinante.....	48
8.4 - Purificação da Proteína em Cromatografia de Troca Catiônica.	49
8.4.1 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida.....	50
9 - Quantificação das proteínas recombinantes e análise da estrutura secundária utilizando Dicroísmo Circular.	50
10 - Atividade bactericida.....	52
11 – Teste de Atividade Sobre Lipossomos Encapsulados.	54
11.1 - Preparação dos lipossomos.....	54
11.2 - Preparação dos lipossomos encapsulados com calceína.	55
11.3 – Medida do tamanho da partícula.....	56
11.4 - Dosagem de fosfato dos fosfolipídios.	56
11.5 - Teste de liberação de calceína.	57
11.6 – Avaliação da afinidade das proteínas para lipossomos.....	58
12 - Avaliação da associação das proteínas com lipossomos após ultracentrifugação e análise em gel SDS-PAGE.	58
13 – Estudos sobre a cinética de atividade danificadora Ca ²⁺ -independente de BthTx-I em associação com lipossomos através de Stop-Flow.	59
14 – Medidas de associação de Bothroptoxina-I em monocamadas.	60
15 - Medida na Mudança dos Espectros de Emissão de fluorescência intrínseca do Triptofano de BthTx-I em associação com Lipossomos.	62
16 – Anisotropia de fluorescência intrínseca do triptofano.	62
16.1 - Medidas de anisotropia de BthTx-I mutada em associação com lipossomos.	62
16.2 - Curvas de desnaturação de BthTx-I recombinante mutada.	63
17 - Medidas de decaimento do tempo de vida por TCSCP.....	63
18 - Medidas de decaimento do tempo de vida e anisotropia por modulação harmônica.	64
19 – Simulações de Dinâmica Molecular.	64

20 – Cálculo eficiência de transferência de energia entre os triptofanos.	65
21 - Medidas de espectros de absorção das proteínas mutantes de BthTx-I.	65
V – RESULTADOS	66
1- Reações de PCR	66
2 - Digestão dos fragmentos com enzimas <i>Xba</i> -I e <i>Bam</i> HI.	67
3 - Sequenciamento dos mutantes de BthTx-I.	67
4 - Purificação das Proteínas Mutantes	70
5 - Análise do Espectro de Dicroísmo Circular	71
6 - Atividade bactericida dos mutantes de BthTx-I.	73
7 – Teste de atividade sobre lipossomos encapsulados.	74
7.1 – Medida do diâmetro do lipossomo.	75
7.2 - Teste de liberação de calceína	76
8 - Avaliação da associação das proteínas com lipossomos após ultracentrifugação e análise em gel SDS-PAGE.	77
10 – Modificação química dos triptofanos de variantes de BthTx-I em associação com lipossomos em experimentos de “Stop-Flow”.	79
9 – Medidas de associação de BthTx-I em monocamadas.	78
11 – Espectros de Emissão de Fluorescência Intrínseca do Triptofano (EFIT).	83
12 – Anisotropia de fluorescência intrínseca de triptofanos.	86
12.1 - Medidas de anisotropia de BthTx-I e proteínas mutantes em associação com lipossomos.	86
12.2 - Curvas de desnaturação de BthTx-I recombinante e mutantes.	88
13 – Espectroscopia de fluorescência com resolução temporal por TCSPC.	91
14 – Análise dos resultados de espectroscopia de fluorescência com resolução temporal pelo método harmônico.	93
15 – Simulação de Dinâmica Molecular de variantes de BthTx-I.	94
15.1 – Calculo do fator de orientação e distância entre os triptofanos.	94
15.2 – Cálculo da integral da sobreposição (J) dos espectros do doador e do acceptor. .97	
VI - DISCUSSÃO	99
VII - CONCLUSÕES	113

VIII – REFERÊNCIAS 114

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Reação de hidrólise de fosfatidilcolina pelas fosfolipases A ₁ , A ₂ , B, C e D, e os respectivos produtos da reação..	1
Figura 2: Estrutura da PLA ₂ de <i>Crotalus atrox</i> (brunie <i>et al.</i> , 1985).	4
Figura 3: Mecanismo de tríade catalítica de PLA ₂ s.	5
Figura 4: Detalhes do sítio de ligação de Ca ²⁺ de sPLA ₂ s que compreende os resíduos 27-33 e 49 (Ward <i>et al.</i> , 1998).	6
Figura 5: Representação da estrutura do cristal de BthTx-I.	8
Figura 6: Modelo da Atividade de Danificação de Membrana Ca ²⁺ -independente de BthTx-I proposto por da Silva Giotto <i>et al.</i> , 1998.	9
Figura 7: Representação do sítio de ligação interfacial (SRI) de BthTx-I.	10
Figura 8: Estrutura química e os ângulos de torsão de suramina.	12
Figura 9: Representação da estrutura dimérica da miotoxina Basp-II ligada aos compostos suramina e polietilenoglicol (átomos coloridos).	13
Figura 10: Estruturas quaternárias do homodímero de BthTx-I (PLA ₂ -Lys49).	16
Figura 11: Diagrama de Jablonski.	18
Figura 12: Espectro de emissão de fluorescência de fluoróforos naturais	20
Figura 13: Transição eletrônica de absorção do triptofano.	21
Figura 14: Diagrama esquemático para medidas de anisotropia de fluorescência.	22
Figura 15: Esquema do decaimento de vida de fluorescência por fluorimetria de pulso.	24
Figura 16: Diagrama esquemático do aparato experimental da técnica de correlação temporal de fótons únicos.	27
Figura 17: Esquema do decaimento de vida de fluorescência pelo método harmônico.	29
Figura 18: Exemplo de curvas de decaimento de vida de fluorescência pelo método harmônico	31
Figura 19: Esquema do equipamento de fluorescência para medidas no domínio da frequência.	32
Figura 20: Esquema ilustrativo de mutagênese sítio-dirigida por reação em cadeia de polimerase.	39

Figura 21: Esquema ilustrativo da desnaturação e modificação química de proteínas sob a forma de corpos de inclusão.	48
Figura 22: Espectros e Gráfico padrão da proteína nativa de BthTx-I.....	51
Figura 23: Esquema ilustrativo do ensaio bactericida.....	53
Figura 24: Ilustra a formação de lipossomos pelo método de evaporação de reverso de fase de Szoka e Papahadjopoulos	55
Figura 25: Esquema dos espectros de excitação e emissão de calceína.	55
Figura 26: Esquema do ensaio de atividade de danificação de lipossomos.	57
Figura 27: Mecanismo de oxidação do triptofano por NBS sugerido por Tsai <i>et al</i> , 2006.....	59
Figura 28: Esquema para análise da atividade de BthTx-I em monocamadas utilizando tensiômetro dinâmico pelo método da gota..	61
Figura 29: Resultados das etapas das reações de mutagênese sítio-dirigida.....	66
Figura 30: Gel de agarose 2% referente à digestão com enzimas de restrição <i>Xba</i> -I e <i>Bam</i> HI liberando o fragmento de 420 pb..	67
Figura 31: Eleroferograma da mutação W77H.	68
Figura 32: Eleroferograma dos 9 mutantes propostos.....	69
Figura 33: Cromatograma de Purificação	70
Figura 34: Gel de Purificação SDS-PAGE 16%..	71
Figura 35: Espectros de Dicroísmo Circular no UV distante.....	72
Figura 36: Efeito bactericida na concentração fixa de 3 µg/ml de BthTx-I recombinante e mutantes contra linhagem <i>E. coli</i> (k12).....	73
Figura 37: Medida do diâmetro dos lipossomos por espalhamento dinâmico de luz.	75
Figura 38: Liberação de calceína induzida por BthTX-I recombinante e proteínas mutadas sobre lipossomos 90% DPPC/10% DMPA	76
Figura 39: Liberação de calceína induzida por BthTx-I recombinante e proteínas mutadas sobre lipossomos 50% DPPC/50% DMPA	77
Figura 40: Avaliação da ligação de BthTx-I em lipossomos	78
Figura 41: Medidas de atividade de BthTX-I e proteínas mutantes da alça C-terminal sobre monocamadas..	79

Figura 42A: Cinéticas de Modificação química dos triptofanos com NBS de variantes de BthTx-I em associação com lipossomos.....	80
Figura 42B: Gráfico da Constante de modificação química com NBS.....	81
Figura 43: Espectros de emissão de BthTX-I recombinante e proteínas mutantes.	84
Figura 44: Medida de anisotropia das proteínas associadas com lipossomos	87
Figura 45: O esquema relaciona o modelo de equilíbrio adotado e as propriedades de anisotropia de fluorescência de BthTX-I.....	89
Figura 46: Anisotropia de ETIF em concentrações crescentes de hidrocloreto de guanidina.. ..	90
Figura 47: Simulações de Dinâmica Molecular	95
Figura 48: Gráficos do fator de orientação em função distância entre os triptofanos	97
Figura 49: Comparação das variações nas Constantes de Modificação Química dos triptofanos com as mudanças dos comprimentos de onda máximos de emissão de fluorescência	105
Figura 50: Comparação dos dados obtidos pelos métodos harmônico e pulsado.	107
Figura 51: Correlação entre os comprimentos de onda de emissão de fluorescência dos variantes de BthTx-I e os tempos de vida dos componentes rápido (A) e lento (B).	108
Figura 52: Correlação entre a distância e eficiência de transferência de energia entre os triptofanos dos variantes de BthTx-I.	111

ÍNDICE DE TABELAS

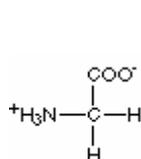
Tabela 1: Mutantes duplos com Trp único em diversas posições da molécula de BthTx-I. ...	15
Tabela 2: Oligonucleotídeo para introdução da mutação W77H. (Ruller <i>et al</i> , 2005).	40
Tabela 3: Oligonucleotídeos para introduzir as mutações na superfície de BthTX-I.....	40
Tabela 4: Valores dos espectros de EFIT da proteína recombinante de BthTx-I e mutantes em tampão e na presença de lipossomos 90% DPPC/ 10% DMPA e 50% DPPC/50% DMPA....	85
Tabela 5: Parâmetros da estabilidade das formas diméricas e monomérica obtida pela análise dos dados de anisotropia da fluorescência intrínseca.	91
Tabela 6: Tempos de vida de BthTx-I e mutantes após análise por TCSPC.....	92
Tabela 7: Tempos de vida de decaimento de fluorescência intrínseca do triptofano de BthTx-I e mutantes após análise das curvas obtidas pela técnica de modulação de fase	93
Tabela 8: Medidas da distância e do fator de orientação entre os triptofanos da interface dimérica derivadas das trajetórias calculadas por simulação molecular	96
Tabela 9: Valores da integral da sobreposição, eficiência quântica e distância de Förster para BthTx-I e proteínas mutantes.....	98
Tabela 10: Valores da eficiência e transferência de energia entre os triptofanos de BthTx-I e proteínas mutantes	98

ABREVIATURAS

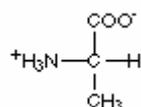
PLA₁ : fosfolipase A ₁	IPTG : isopropil- β-D-tiogalactopiranosídeo
PLA₂ : fosfolipase A ₂	ATP : adenosina trifosfato
PLB : fosfolipase B	UTR : regiões não traduzidas
PLC : fosfolipase C	ORF : janela de leitura aberta
PLD : fosfolipase D	DTT : dithiothreitol
PLA_{2s} : fosfolipasas A ₂ secretadas	DMSO : dimetilsulfóxido
cPLA₂ : fosfolipase A ₂ citosólicas	CI : corpos de inclusão
iPLA₂ : fosfolipase A ₂ independente de Ca ²⁺	NTSB : 2-nitro-5-(sulphotio)-benzoato
PAF-AH : fator de agregação de plaquetas-acetilhidrolase	SDS : dodecilsulfato de sódio
PLA₂-Asp49 : fosfolipase A ₂ com resíduo de ácido aspártico na posição 49	UV : ultravioleta
PLA₂-Lys49 : fosfolipase A ₂ com resíduo de lisina na posição 49	HEPES : 4-(2-Hidroxiethyl)1-ácido piperazineethanesulfônico
Cho : colina	GdnHCl : hidrocloreto de guanidina
P-Cho : fosfocolina	CD : difração circular
DAG : diacilglicerol	NBS : N-bromo-sucimanida
FA : ácido graxo	DMPA : dimiristoil ácido fosfatídico
LysoPC : lisofosfolipídio	DPPC : fosfatidilcolina dipalmitoil
PA : ácido fosfatídico	E. coli : <i>Escherichia coli</i>
RMN : ressonância magnética nuclear	M. luteus : <i>Micrococcus lysodeikticus</i>
SRI : sítio de reconhecimento interfacial	EFIT : espectroscopia de fluorescência intrínseca do triptofano
i-face : sítio de reconhecimento interfacial	DT : domínio do tempo
BthTX-I : bothropstoxina I	DF : domínio da frequência
kDa : quilodalton	TCSPC - Time Correlated Single Photon Counting
DNA : ácido dioxiribonucleotídeo	TAC : Time-to-Amplitude Converter
PCR : reação em cadeia de polimerase	HTER : homotransferencia de energia ressonante
EXT1 : oligonucleotídeo da extremidade 5'	CFU : unidade formadora de colônias
EXT2 : oligonucleotídeo seletivo	TP : tampão padrão (20mM HEPES, 150mM NaCl, pH7,0)
EXT3 : oligonucleotídeo da extremidade 3'	MET : Mutagênese de Escaneamento do Triptofano
MUT : oligonucleotídeo mutagênico	
cDNA : DNA complementar	
SMC : sítio múltiplo de clonagem	
OD : densidade ótica	

Nomenclatura, classificação e estrutura dos 20 aminoácidos encontrados em sistemas biológicos.

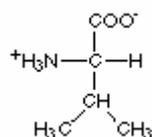
Não polares



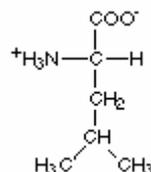
Glicina
(Gly)
(G)



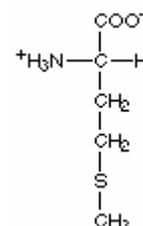
Alanina
(Ala)
(A)



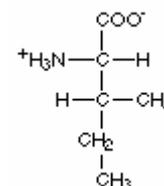
Valina
(Val)
(V)



Leucina
(Leu)
(L)

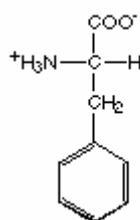


Metionina
(Met)
(M)

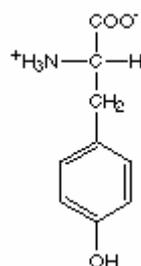


Isoleucina
(Ile)
(I)

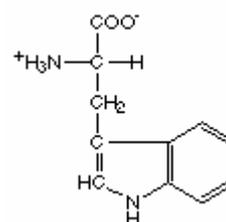
Aromáticos



Fenilalanina
(Phe)
(F)

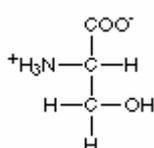


Tirosina
(Tyr)
(Y)

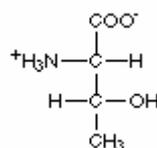


Triptofano
(Trp)
(W)

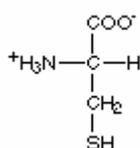
Polares não carregados



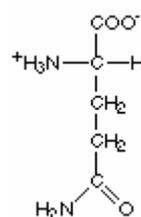
Serina
(Ser)
(S)



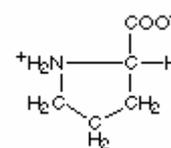
Treonina
(Thr)
(T)



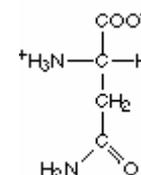
Cisteína
(Cys)
(C)



Glutamina
(Gln)
(Q)

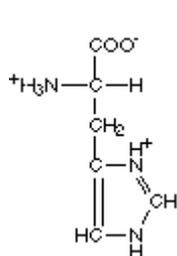


Prolina
(Pro)
(P)

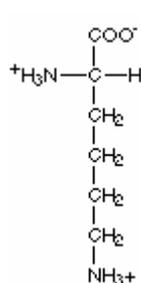


Asparagina
(Asn)
(N)

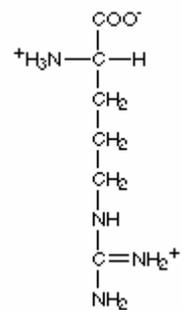
Positivamente carregados



Histidina
(His)
(H)

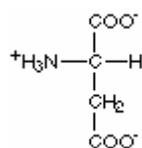


Lisina
(Lys)
(K)

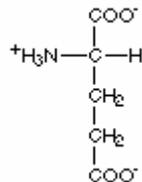


Arginina
(Arg)
(R)

Negativamente carregados



Aspartato
(Asp)
(D)



Glutamato
(Glu)
(E)

ABSTRACT

Hydrolysis of membrane phospholipids by class-II phospholipase A2 (PLA₂) is dependent on a Ca²⁺ ion co-factor coordinated in part by an Asp49 residue in the active site region. In the Lys49-PLA₂ homologues, the Asp49 is substituted by Lys and the Lys49-PLA₂s show no Ca²⁺ binding and no detectable phospholipid hydrolysis. Nevertheless, the Lys49-PLA₂s cause a rapid Ca²⁺-independent release of liposome entrapped markers, and demonstrate potent myotoxic and bactericidal activities. Bothropstoxin-I (BthTx-I) is a homodimeric Lys49-PLA₂ that is present in the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. Previous x-ray crystallography and fluorescence spectroscopy experiments have shown that the homodimer interface acts as a molecular hinge, permitting the transition between “open” and “closed” conformations of the BthTx-I dimer, and it has previously been suggested that a similar conformational transition in the membrane bound dimer underlies the Ca²⁺-independent membrane damaging activity.

With the aim of understanding the structural changes in the Lys49-PLA₂s, the interaction of the BthTx-I with model membranes has been studied by scanning tryptophan mutagenesis in conjunction with intrinsic tryptophan (Trp) fluorescence spectroscopy. The single Trp77 residue at the dimer interface has previously been substituted by histidine (W77H) without significant effects on biological function or homodimer stability. In the present study, a second round of site-directed mutagenesis using the W77H as a template produced 9 separate mutants each with a unique Trp residue located either in the dimer interface (at positions 7 and 10), dorsal surface (at positions 46 and 104), ventral surface (at positions 31 and 67) or in the C-terminal loop region (at positions 117,119 and 125). After expression in *E. coli*, refolding of the recombinant protein, and purification by cation-exchange chromatography, the mutants were characterized using a series of biochemical and biophysical analyses.

Correlation of encapsulated marker release with protein binding studies to liposome membranes demonstrated that efficient membrane permeabilization could be elicited by transient association of the protein with the target membrane. All mutants showed similar activity suggesting that hydrophobic interactions play a secondary role in determining affinity for the membrane. Increasing the proportion of negative charge in the membrane increased binding, suggesting a more important role for electrostatic interactions. Altered chemical modification kinetics of the tryptophan residues by bromosuccinamide were correlated with changes in the intrinsic tryptophan emission studies, which confirmed that residues located in the interfacial recognition site of the protein interact with the hydrophobic region of the

membrane bilayer. The results further indicate that residues in the C-terminal region of the protein interact with the surface of the bilayer, a finding that is in contrast to the current consensus of the role of this region in the mechanism of membrane damage.

Tryptophan residues in the dimer interface region may participate in resonant energy homotransfer (REHT), and this effect may be studied by alterations in the intrinsic tryptophan fluorescence anisotropy. Both the K7W and L10W mutants demonstrate reduced fluorescence anisotropy, consistent with the energy homotransfer event. Since REHT is only efficient over short distances, these data strongly support the suggestion that the BthTx-I homodimer adopts a closed conformation in solution. These experimental data show a qualitative correlation with molecular dynamics simulations, which offer the possibility to further understand the structural changes underlying the Ca^{2+} -independent membrane damaging activity of the BthTx-I.

RESUMO

A hidrólise de fosfolipídios de membrana pela fosfolipase A2 da classe-II (PLA₂) é dependente do co-factor Ca²⁺ que é parcialmente coordenado pelo resíduo de Asp49 na região do sítio ativo. Nos homólogos de Lys49-PLA₂, o Asp49 é substituído por Lys e as Lys49-PLA₂s não mostram ligação de Ca²⁺ ou hidrólise de fosfolipídios detectável. As Lys49-PLA₂s mostram uma liberação rápida Ca²⁺-independente de marcadores encapsulados em lipossomos e demonstra potentes atividade bactericida e miotóxica. Bothropstoxina-I (BthTx-I) é uma Lys49-PLA₂ homodimérica presente no veneno da serpente *Bothrops jararacussu*. Estudos precedentes de cristalografia de raio X e de espectroscopia de fluorescência mostraram que o homodímero age como uma dobradiça molecular, permitindo a transição entre as conformações “aberta” e “fechada” de BthTx-I, sugerindo previamente que transições conformacionais similares do dímero na presença de membrana pode causar a atividade de danificação de membrana Ca²⁺-independente.

Com o objetivo de compreender as mudanças estruturais de Lys49-PLA₂s, o modelo de interação do BthTx-I com membranas foi estudado utilizando mutagênese de varredura do triptofano (MVT) em conjunto com espectroscopia de fluorescência intrínseca do triptofano (Trp). O único resíduo Trp77 da interface do dímero foi substituído previamente por histidina (W77H) sem efeitos significativos na estabilidade do homodímero ou na função biológica. No estudo atual, uma segunda etapa de mutagênese sítio-dirigida utilizando W77H como molde produziu 9 mutantes separados cada um com um resíduo único de Trp localizado na interface do dímero (nas posições 7 e 10), na superfície dorsal (nas posições 46 e 104), na superfície ventral (nas posições 31 e 67) e na região da alça C-terminal (nas posições 117, 119 e 125). Após a expressão em *E. coli*, enovelamento da proteína recombinante, e purificação por cromatografia de troca catiônica, os mutantes foram caracterizados usando uma série de análises bioquímicas e biofísicas. A correlação entre a liberação do marcador encapsulado com estudos de interação da proteína com membranas de lipossomos demonstrou que uma eficiente permeabilização da membrana pode ocorrer por uma associação transiente entre a proteína e a membrana. Todos os mutantes mostraram uma atividade similar indicando que as interações hidrofóbicas possuem um papel secundário no estudo de afinidade da proteína pela membrana. Por outro lado, o aumento da proporção de carga negativa na membrana aumentou a ligação da proteína sugerindo que interações eletrostáticas possuem um papel importante nos estudos de interação. As cinéticas de modificação química dos resíduos de triptofano por bromosuccinamida foram correlacionadas com as mudanças de emissão intrínseca do

triptofano, confirmando que os resíduos situados no Sítio de Reconhecimento Interfacial (SRI) da proteína interagem com a região hidrofóbica da bicamada da membrana. Resultados adicionais indicam que os resíduos da região C-terminal da proteína interagem com a superfície da bicamada, em contraste com atual consenso sobre a função desta região no mecanismo de danificação da membrana.

Os resíduos de triptofano na região da interface dimerica podem participar da homotransferência de energia ressonante (HTER), e este efeito pode ser estudado através de alterações na anisotropia de fluorescência intrínseca do triptofano. Os mutantes K7W e L10W demonstram uma anisotropia de fluorescência reduzida, consistente com o efeito de homotransferência de energia. Uma vez que HTER é somente eficiente sob distâncias curtas, estes dados suportam fortemente a sugestão que o homodímero de BthTx-I adota uma conformação fechada em solução. Estes dados experimentais mostram uma correlação qualitativa com resultados de simulações de dinâmica molecular, que oferecem a possibilidade de compreender as mudanças estruturais subjacentes da atividade de danificação da membrana de Ca^{2+} -independente de BthTx-I.

I – INTRODUÇÃO

As fosfolipases estão agrupadas nas famílias A₁ (PLA₁), A₂ (PLA₂), B (PLB), C (PLC) e D (PLD) de acordo com a ligação que hidrolisa no fosfolipídio (**Figura 1**). As fosfolipases A₂ (EC 3.1.1.4; PLA₂) catalisam a hidrólise de ligação ácido-éster na posição *sn*-2 dos fosfolipídios, liberando ácidos graxos e lisofosfolipídios (van Deenan *et al*, 1963). As PLA₂s são encontradas na natureza tanto intra como extracelularmente, apresentando diversas funções desde danificação das membranas celulares como é o caso das PLA₂ dos venenos, até apresentando uma função no padrão da regulação da resposta inflamatória e agregação de plaquetas como é o caso das PLA₂ de mamíferos (Kudo *et al*, 1993). Estas funções regulatórias fazem com que as PLA₂ sejam um alvo em potencial para intervenção química no tratamento de doenças como artrite. Neste sentido o entendimento das interações proteína/lipídio é essencial para o desenvolvimento de novos medicamentos.

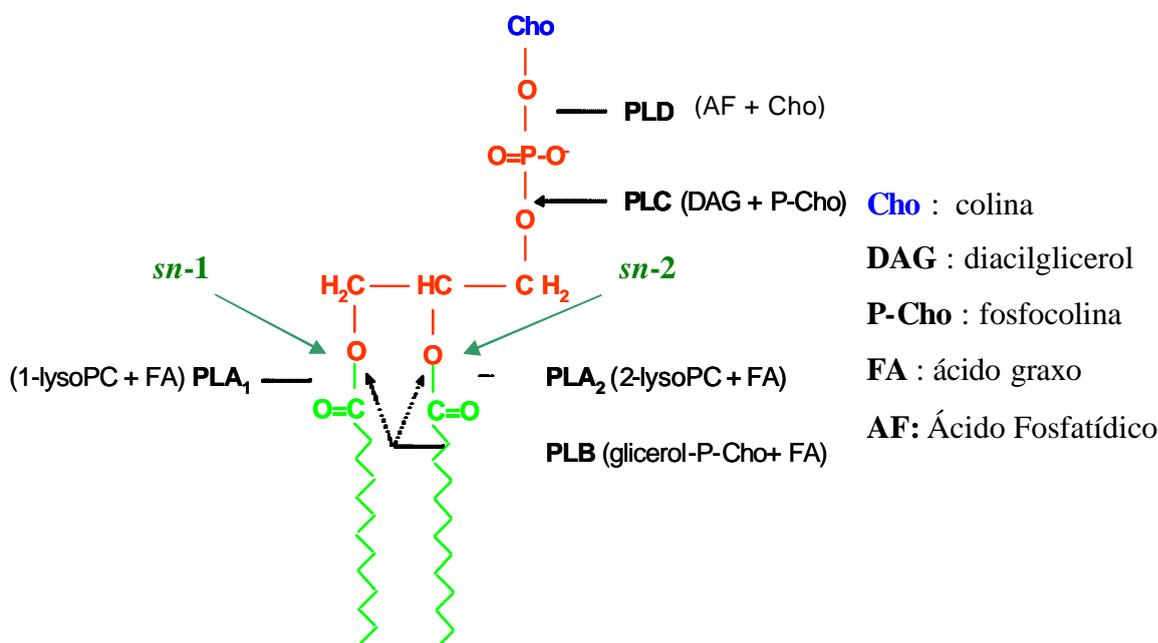


Figura 1: Reação de hidrólise de fosfatidilcolina pelas fosfolipases A₁, A₂, B, C e D, e os respectivos produtos da reação. As fosfolipases A₂ hidrolisam especificamente a ligação éster *sn*2 de fosfolipídios e liberam como produto da catálise, ácido graxo e lisofosfolipídio.

A superfamília de fosfolipases A_2 consiste em 15 grupos e muitos subgrupos e inclui cinco tipos distintos de enzimas nomeadas como PLA_2 s secretadas ($sPLA_2$), PLA_2 s citosólicas ($cPLA_2$), PLA_2 s independente de Ca^{2+} ($iPLA_2$), as PAF-acetilhidrolases (PAF-AH) e a lisosomal (Schaloske and Dennis, 2006).

As **$cPLA_2$** são proteínas de diversos tamanhos (61 – 114 kDa) e utilizam uma serina para catálise. O grupo IV $cPLA_2$ foi o primeiro a ser identificado, subsequentemente nomeado IVA, é regulado por Ca^{2+} , e sofre translocações do citosol para as membranas do retículo endoplasmático e perinuclear. A $cPLA_2$ IVA está envolvida na inflamação, formação de úlcera intestinal, danificação aguda do pulmão, danificação do cérebro por isquemia/perfuração, anafilaxia e parto (Uozumi and Shimizu, 2002).

Várias $cPLA_2$ adicionais têm sido determinadas neste grupo com base na similaridade das seqüências. Ambas $cPLA_2$ dos grupos IVB e IVC mostram uma pequena especificidade para ácidos graxos *sn*-2 (Song *et al*, 1999; Stewart *et al*, 2002). O grupo IVD mostrou certa especificidade para ácido linoleico (Chiba *et al*, 2004). O grupo IVE não mostrou ter prioridade por substratos contendo fosfatidilcolina ou fosfatidiletanolamina, no entanto o grupo IVF parece preferir fosfatidiletanolamina como substrato (Otho *et al*, 2005).

As **$iPLA_2$** são citosólicas e independentes de Ca^{2+} e assim como as $cPLA_2$ utilizam uma serina para catálise. Elas são encontradas no músculo esquelético/cardíaco, testículo, linfócito, macrófago de humanos e compreendem o grupo IV com subgrupos A-1, A-2, B, C, D, E e F. As $iPLA_2$ dos grupos VIA exibem função central na remodelagem de fosfolipídios (Balsinde *et al*, 1995), e a liberação do ácido aracdônico resulta na formação de ecosanoide (Rickard *et al*, 2005; Atsumi *et al*, 1998), expressão de proteína (Moran, *et al*, 2005), secreção (Song *et al*, 2005; Balboa *et al*, 2003), além de apresentar um papel na apoptose (Atsumi *et al*, 2000). O grupo VIB está envolvido na liberação de ácido aracdônico para formação de ecosanoide, e estudos com enantiômeros de lactona bromoenol tem ajudado a diferenciar as funções celulares entre os grupos VIA e VIB (Jenkis *et al*, 2002).

As **PAF-AHs** pertencem a um subtipo de fosfolipase A₂ que degrada especificamente PAF e lipídios oxidados relacionados, e também são conhecidas como PLA₂ associada à lipoproteínas (Lp- PLA₂). Os grupos VII (A e B) e VIII (A e B) compreendem enzimas com atividade de PAF acetilhidrolases sendo pertencentes ao grupo VII àquelas encontradas tanto no plasma quanto intracelularmente no fígado e rim de humano/bovino (Matsuzawa *et al*, 1997) e ao grupo VIII aquelas encontradas no cérebro humano (Manya *et al*, 1999).

As **sPLA₂** são pequenas proteínas (14-18 kDa) usualmente contendo de 5 a 8 pontes de sulfeto. Este grupo possui uma histidina no sítio ativo e requer níveis μM de Ca^{2+} para catálise. As sPLA₂ são encontradas em plantas, insetos, moluscos, répteis, mamíferos, fungos e compreendem os grupos I, II, III, V, IX, X, XI e XII. As sPLA₂ possuem um papel em várias doenças inflamatórias, sendo que o grupo II está presente em altas concentrações no fluído sinovial em pacientes com artrite reumatóide (Seilhamer *et al*, 1989). Também parecem possuir um papel importante na exocitose (Wei *et al*, 2003) e as sPLA₂ de mamíferos (GIIA, GV, e GIID) promovem a degranulação de mastócitos (Enomoto *et al*, 2000). Certas sPLA₂ tem um papel na morte de bactérias Gram-positivas e podem estar envolvidas na defesa do hospedeiro contra infecção bacteriana (Koduri *et al*, 2002). Evidências recentes de GV sPLA₂ sugere que estas enzimas têm um papel inato contra invasão de fungos (Satake *et al*, 2004). Os grupos V e X podem estar envolvidos na imunidade inata durante a defesa do hospedeiro contra infecção adenoviral. Assim foi sugerido que estas duas enzimas podem proteger células contra infecção através de um aumento de níveis endógenos de liso-fosfatidilcolina (Mitsuishi *et al*, 2006). A função de sPLA₂ do grupo IIA em tumorigênese é um resultado controverso, pois não está bem claro se a enzima serve como promotor ou supressor do tumor (Laye e Gill, 2003).

O primeiro nome dado as PLA₂ lisossomais purificadas do cérebro bovino foi 1-O-acilceramida sintase (ACS) por Abe e Shayman (1998). Hiraoka *et al* (2002) propôs que o grupo acil hidrolisado é transferido através de uma enzima acil para ceramida ou água

resultando ou na produção de 1-*O*-acil-ceramida (ACS atividade) ou na liberação de ácidos graxos livres (PLA₂ atividade). Hiraoka substituiu o nome ACS por PLA₂ lisosomal (LPLA₂), e de acordo com a nomenclatura de superfamília de fosfolipases, esta enzima foi nomeada agora pelo grupo XV PLA₂.

As estruturas cristalográficas de PLA₂ dos grupos I, II e III de diversas espécies foram determinadas através de difração de raios-X, tanto na presença como na ausência de cálcio bem como de inibidores específicos da atividade catalítica. As PLA₂ destes três grupos mostram um motivo conservado que compreendem duas α -hélices antiparalelas, nas quais estão localizados os resíduos do sítio ativo, associadas com uma alça rica em glicina envolvida na ligação do cálcio (Scott *et al*, 1990; Arni and Ward, 1996) (**Figura 2**).

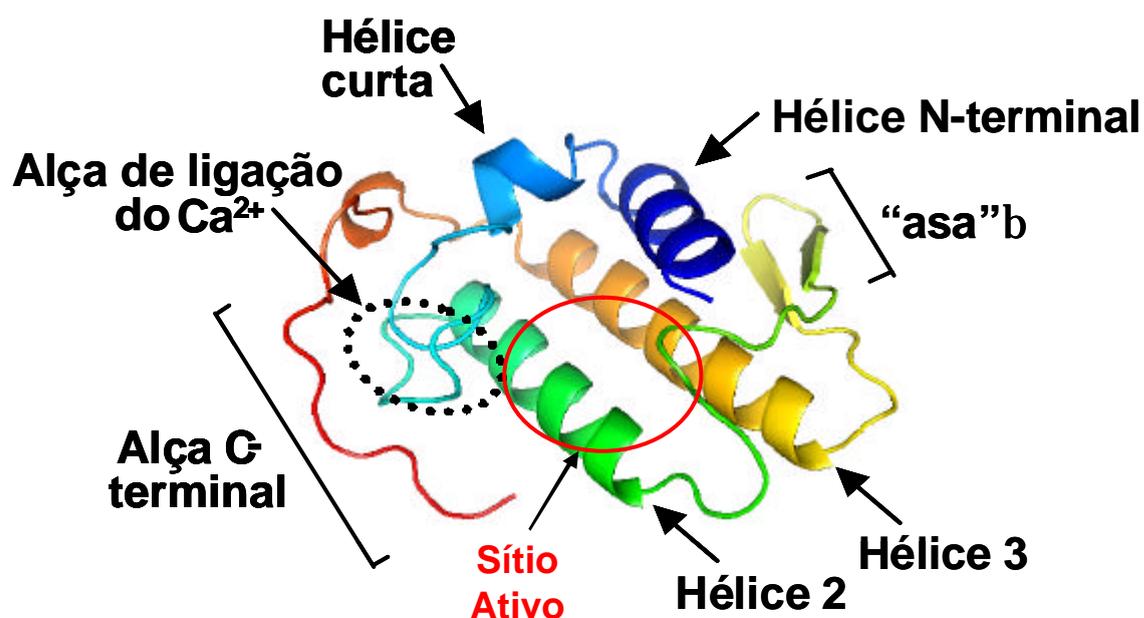


Figura 2: Estrutura da PLA₂ de *Crotalus atrox* (brunie *et al.*, 1985). A molécula está apresentada na forma de fita, sendo os resíduos pertencentes ao sítio ativo destacados pelo círculo vermelho, e a alça de ligação do Ca²⁺ pelo círculo preto.

As posições dos resíduos His48, Asp49, Tyr52 e Asp99 (usando a numeração de homologia dos grupos I e II realizadas por Renetseder *et al*, 1985), são altamente conservadas nos sítios ativos nos grupos I e II, sendo que nas PLA₂ do grupo III são encontrados resíduos em posições análogas. O resíduo Asp49 junto com três oxigênios pertencentes às carbonilas

da cadeia principal da Tyr28, Gly30 e Gly32, mostraram estar envolvidos na ligação de cálcio (Thunnissen *et al.*, 1990; Scott *et al.*, 1990). No mecanismo de ação da enzima proposto (Verheij *et al.*, 1980; Scott *et al.*, 1990), o Ca^{2+} serve como um cofator que orienta o substrato fosfolipídico no sítio ativo, e estabiliza o intermediário oxianiónico, portanto a ausência deste íon na PLA₂ torna-a cataliticamente inativa.

O mecanismo de tríade catalítica de PLA₂s (Verheij *et al.*, 1980) foi revisado (Berg *et al.*, 2001) e indicam que os resíduos Asp99, His48 e uma molécula de água formam uma tríade catalítica (**Figura 3**), iniciando uma seqüência de três etapas tendo como produtos finais das reações ácidos graxos e lisofosfolipídios.

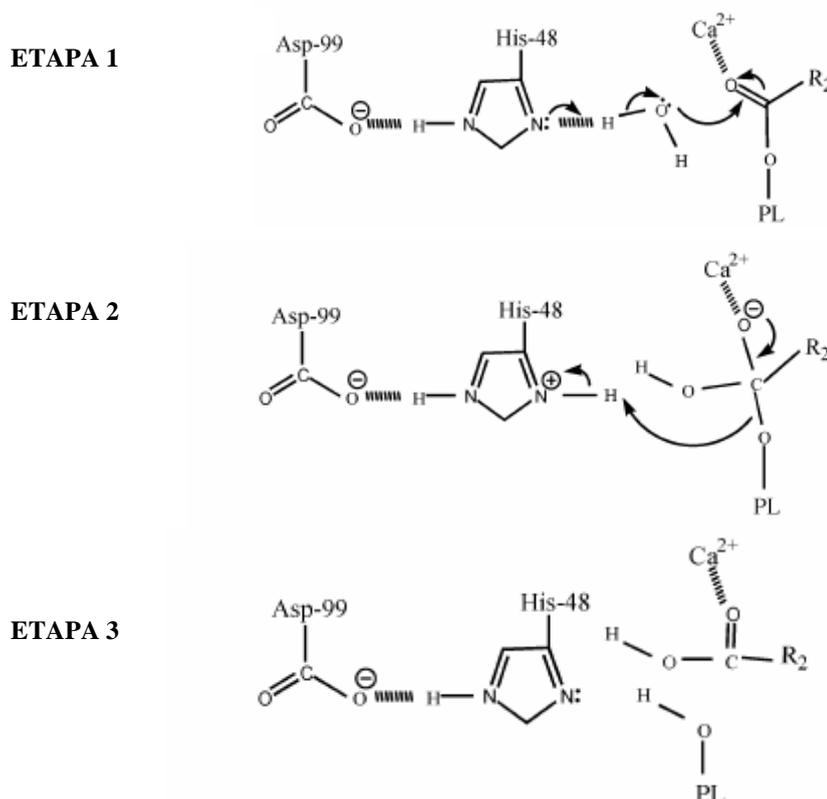


Figura 3: Mecanismo da tríade catalítica de PLA₂s. Etapa 1: desprotonação da molécula de água pela tríade catalítica His48 e Asp99; **Etapa 2:** ataque nucleofílico na ligação éster *sn*-2 do glicerofosfolipídio pela água desprotonada com a formação do intermediário tetraédrico estabilizado pelo cofator Ca^{2+} ; **Etapa 3:** quebra do intermediário da reação e a liberação dos produtos da catálise.

Uma subfamília de PLA₂ miotóxica do grupo II foi isolada a partir de venenos de serpentes *Bothrops* que inclui a miotoxina básica de *B. nummifer*, miotoxina I de *B. moojeni*, miotoxinas II de *B. asper* (Lomonte and Gutierrez, 1989) e bothropstoxina I (BthTx-I) de *B. jararacussu* (Homsí-Brandenburg *et al.*, 1988). A análise das sequências de aminoácidos de diferentes membros desta subfamília revelou que o Asp49 encontra-se substituído por uma lisina. As estruturas destas PLA₂-Lys49 determinadas através de difração de raio-X mostraram que o grupo ε-amino da Lys49 ocupa o sítio de ligação de cálcio (Arni *et al.*, 1995; Arni e Ward, 1996) (**Figura 4**). A consequência desta substituição é a perda da capacidade de ligação do cofator Ca²⁺, o que leva a ausência de atividade catalítica. A mutação sítio-dirigida feita em PLA₂ de pâncreas de porco mostrou que a substituição de Asp49 por Lys, que mimetiza a substituição observada na proteína do veneno de serpente, reduziu a atividade específica da enzima em 25.000 vezes (van den Bergh *et al.*, 1989).

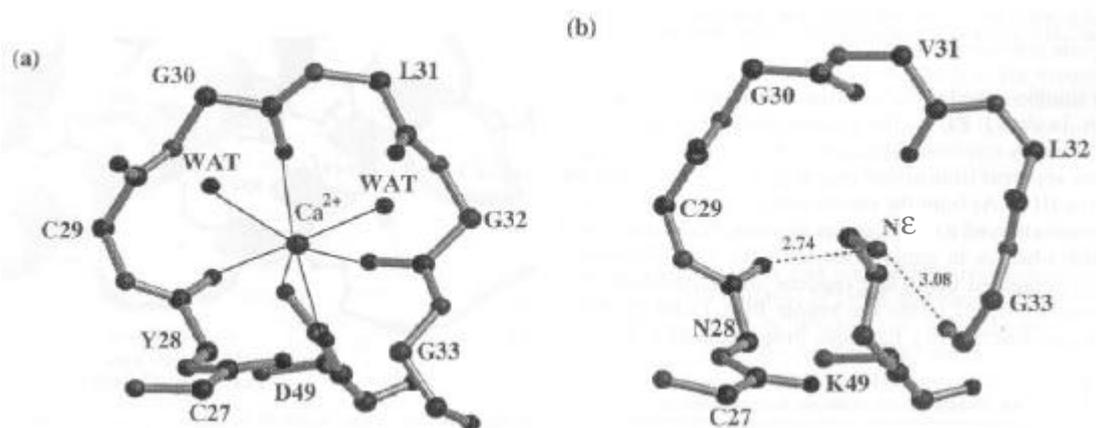


Figura 4: Detalhes do sítio de ligação de Ca²⁺ de sPLA₂s que compreende os resíduos 27-33 e 49 (Ward *et al.*, 1998). (A) PLA₂-Asp49 de *Naja naja atra*: interações dos átomos de oxigênio carbonil da alça de ligação de cálcio, átomos de oxigênio carbonil da cadeia principal das PLA₂-Asp49 e duas moléculas de água formam a coordenação pentagonal bipiramidal do Ca²⁺. (B) PLA₂-Lys49 de *Bothrops pirajai*: o átomo de Ne da cadeia lateral da Lys49 ocupa a posição do íon Ca²⁺, formando ligações de hidrogênio.

Apesar de não apresentar atividade hidrolítica, a interação da PLA₂-Lys49 com lipossomos de composição lipídica variada provoca uma liberação rápida do conteúdo aquoso dos lipossomos. Este processo é independente de íons cálcio e ocorre sem hidrólise fosfolipídica detectável (Rufini *et al.*, 1992, Pedersen *et al.*, 1995, Ward *et al.*, 2002). Em adição, estudos cinéticos de liberação do marcador fluorescente de lipossomos na ausência de Ca²⁺, utilizando tanto a toxina Asp49 quanto Lys49, demonstraram a existência de um mecanismo de ação independente da atividade hidrolítica (Rufini *et al.*, 1992; de Oliveira *et al.* 2001).

As PLA₂-Lys49 existem na forma homodimérica em solução no pH 7,0 (Francis *et al.*, 1991; da Silva Giotto *et al.*, 1998, de Oliveira *et al.*, 2001), e interações hidrofóbicas e eletrostáticas entre os aminoácidos Glu12, Trp77 e Lys80 de cada monômero contribuem para estabilização do dímero (Ruller, *et al.* 2005) (**Figura 5**).

Estudos cristalográficos e espectroscópicos de BthTx-I (da Silva Giotto *et al.*, 1998), mostraram que a interface dos monômeros age como uma "dobradiça" que, como mostrado na **Figura 6**, resulta nas formas "aberta" e "fechada" do dímero produzindo uma mudança de posição da região C-terminal. Assim, propõe-se um modelo onde esta mudança na estrutura quaternária da proteína resulta na inserção da alça C-terminal na bicamada lipídica de até 13 Å de profundidade, causando a perda da integridade da membrana (da Silva Giotto *et al.*, 1998).

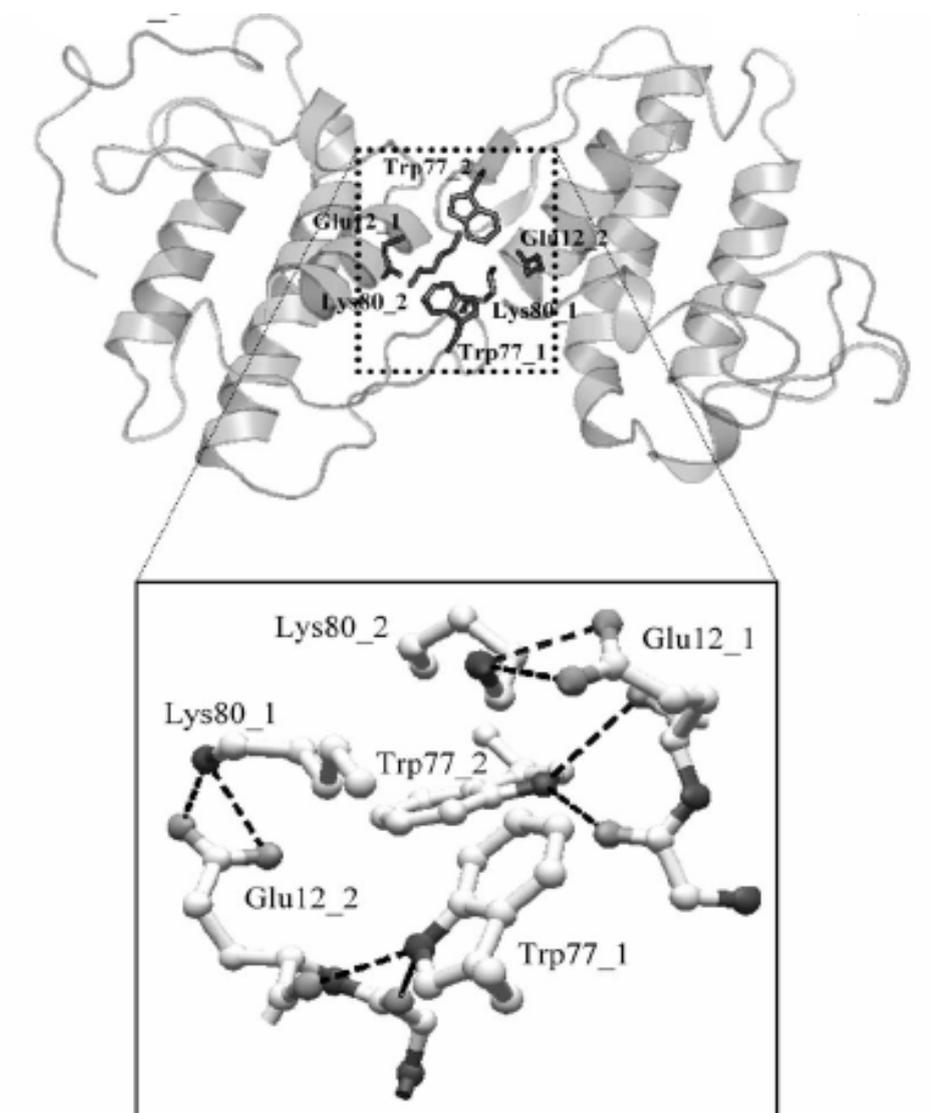


Figura 5: Representação da estrutura do cristal de BthTx-I. O homodímero é estabilizado por contatos intermoleculares entre os resíduos localizados nas hélices N-terminal e folhas β . O quadro mostra detalhes das interações intermoleculares entre os aminoácidos da cadeia principal da interface do dímero envolvendo os resíduos de Glu12, Trp77 e Lys80. Os átomos de nitrogênios são mostrados em preto, o oxigênio em cinza escuro e os carbonos em cinza claro, sendo as pontes de hidrogênio demonstradas pelas linhas pontilhadas.

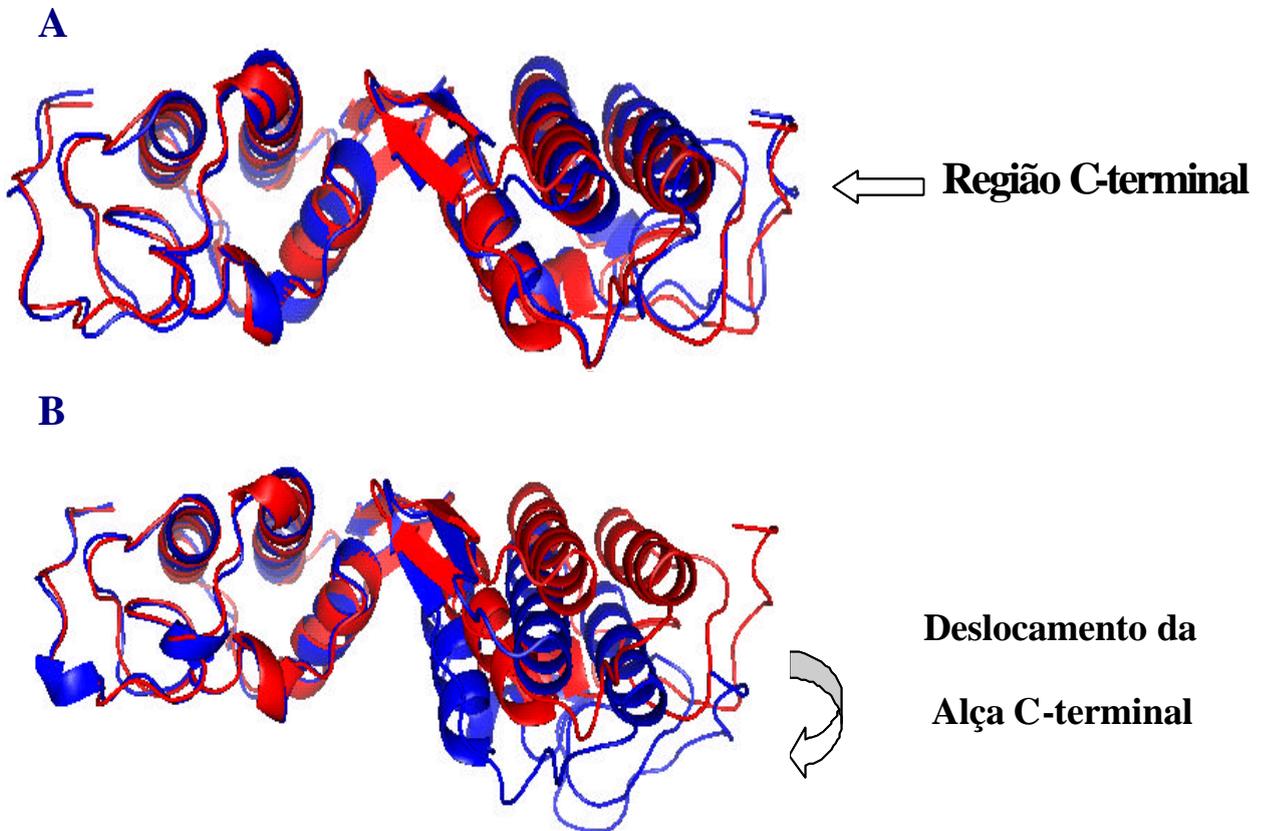


Figura 6: Modelo da Atividade de Danificação de Membrana Ca^{2+} -independente de BthTx-I proposto por da Silva Giotto *et al*, 1998. Estruturas sobrepostas do dímetro de BthTx-I em azul e vermelho, sendo em (A) as estruturas “abertas” em solução e em (B) a estrutura azul na conformação “fechada” com deslocamento da Alça C-terminal após contato com a membrana.

A preferência das PLA₂s de venenos por diferentes substratos fosfolipídicos é determinada pela topologia de superfície específica da região da proteína que interage com a superfície da membrana. Estudos cristalográficos e de RMN indicaram uma superfície protéica de ligação interfacial comum para as PLA₂s dos grupos I/II. Esta superfície denominada de sítio de reconhecimento interfacial, SRI (Pieterse *et al.*, 1974) ou “i-face” (Ramirez & Jain, 1991) é composta por uma fenda hidrofóbica altamente conservada que se liga a cadeia de ácido graxo do substrato fosfolipídico, e um anel de resíduos carregados e polares. O SRI da forma dimérica de BthTx-I, uma PLA₂-Lys49 está representado na **Figura 7**.

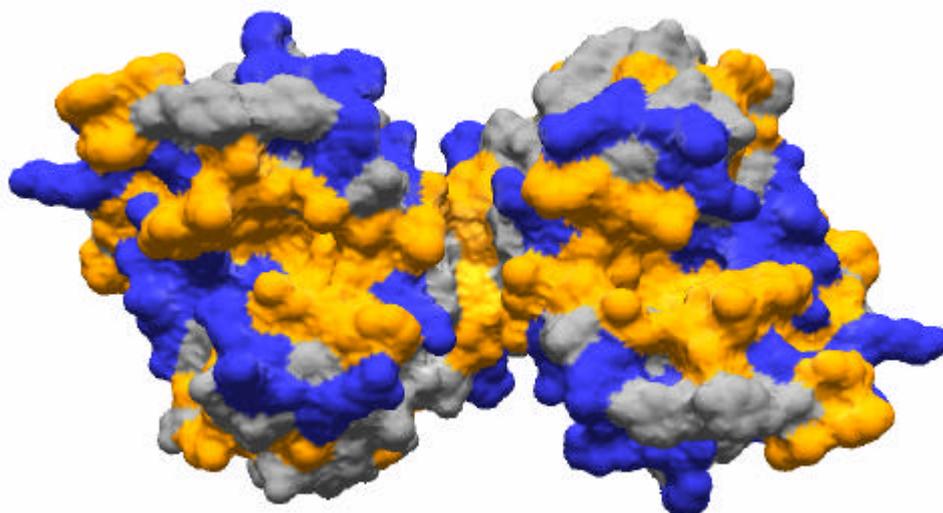


Figura 7: Representação do Sítio de Ligação Interfacial (SRI) de BthTx-I.

Vista ventral mostrando a superfície do SRI. Em azul destacam-se os resíduos carregados e polares formando um círculo ao redor da fenda de resíduos hidrofóbicos destacados em amarelo.

Em Lys-49-PLA₂ os resíduos da alça C-terminal contribuem para formação do anel do SRI e experimentos de mutagênese sítio dirigida com a substituição das cargas positivas desta região mostraram que estes resíduos interagem eletrostaticamente com as cargas negativas nos

fosfolipídios da membrana, e esta interação eletrostática seria responsável por um deslocamento da região C-terminal, facilitando assim seu contato com a membrana (Chioato *et al*, 2002).

Estudos utilizando ensaios de atividade de danificação em lipossomos encapsulados com calceína foram realizados com mutantes dos resíduos E12, W77 e K80 localizados na região da interface dimérica. (Ruller *et al*, 2005). Os resultados demonstraram que embora a redução da fração dimérica em solução reduza significadamente a atividade de danificação, devido a diminuição da estabilidade do dímero, a forma monomérica de BthTx-I retêm aproximadamente 21% de atividade apresentada pelo homodímero (Ruller *et al*, 2005).

Com objetivo de compreender a interação entre BthTx-I e moléculas anfifílicas, Bortoleto-Bugs *et al*, 2004 estudaram a interação de dodecilsulfato de sódio (SDS) com a proteína, mostrando que ocorre a ativação da atividade de danificação de membranas pela ligação de aproximadamente quatro moléculas de SDS para cada sítio específico do homodímero de BthTx-I. Outros estudos demonstraram que a ligação SDS/proteína na proporção de 10 a 40 moléculas de SDS por monômero de BthTx-I induz uma série de distorções reversíveis na α -hélice da proteína, e estas mudanças na proteína são acompanhadas por uma transição na organização da associação de SDS (Bortoleto-Bugs *et al*, 2007). Neste sentido foi proposto um mecanismo de ligação do dímero na membrana em que os fosfolipídios são primeiro perturbados e assim coletados na superfície do SRI da proteína. Este evento é acompanhado com mudanças na estrutura de BthTx-I e a reorganização dos fosfolipídios na bicamada da membrana induz uma diminuição da integridade da bicamada (Bortoleto-Bugs *et al*, 2007). Este mecanismo denominado Modelo de Nucleação Micelar explica em partes os resultados observados sobre as mudanças estruturais da proteína quando interage com a bicamada, porém não há evidencias concretas de que este processo ocorra durante a atividade de danificação Ca^{2+} -independente.

O modelo de nucleação micelar admite que o SRI da forma dimérica de Lys49-PLA₂ está exposto em solução. Entretanto, recentemente Murakami *et al* (2005) demonstrou uma nova estrutura, com a superfície do SRI escondido entre os dois monômeros para o dímero de BaspII, uma miotoxina II de *Bothrops asper*, ligada à suramina, uma droga sintética polisulfonada, desenvolvida inicialmente para o tratamento anti-tripanosomal, e outros poliânions capaz de inibir a atividade miotóxica de análogos de fosfolipases A₂ Lys49 tanto *in vitro* quanto *in vivo* (**Figura 8**). Nesta estrutura, representada na **Figura 9**, o anel hidrofóbico de naftaleno está localizado na alça de ligação do cálcio no monômero A, entre os resíduos 27 a 35, e estabilizado por pontes de hidrogênio nos resíduos de arginina na posição 34A e lisina na posição 53A. O segundo anel de naftaleno liga na porção similar do segundo monômero interagindo com Arg34B e Lys53B.

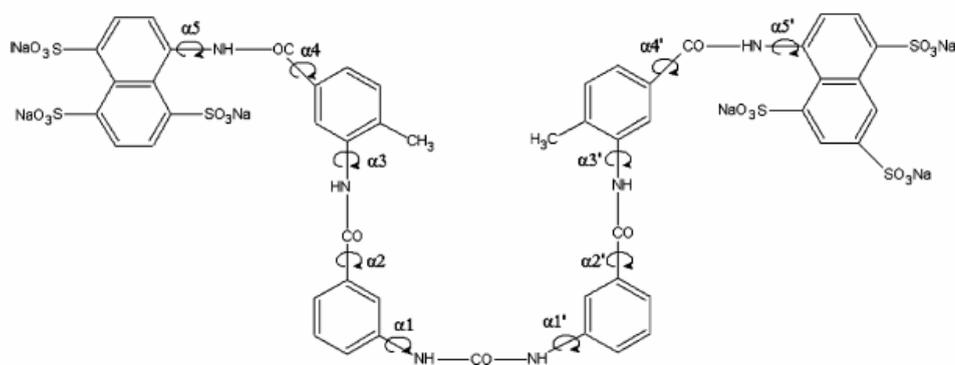


Figura 8: Estrutura química e os ângulos de torção de suramina.

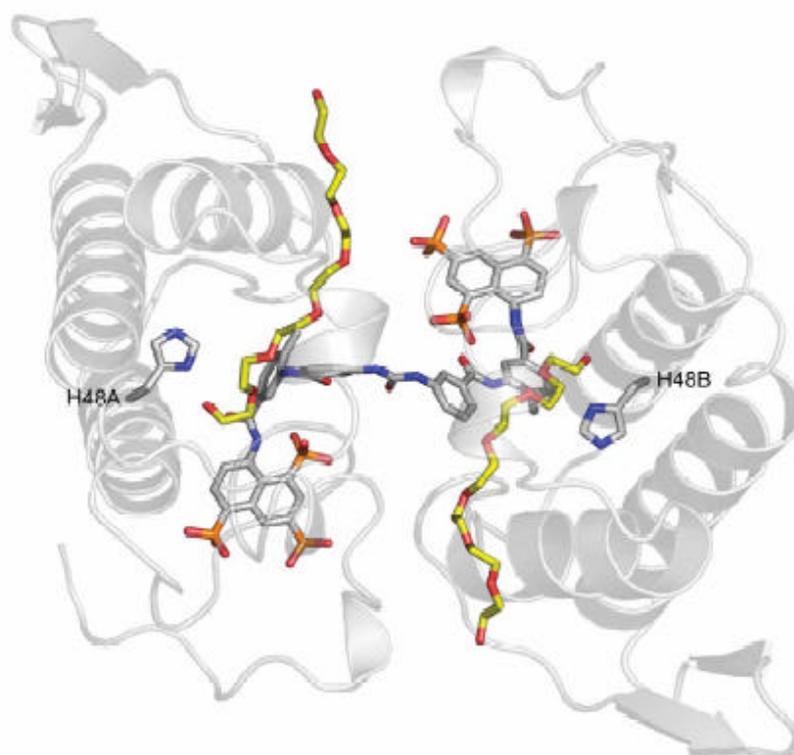


Figura 9: Representação da estrutura dimérica da miotoxina Basp-II ligada aos compostos suramina e polietilenoglicol (átomos coloridos). A droga suramina encontra-se ligada próximo à alça de ligação do cálcio.

Apesar da estrutura cristalina da ligação de suramina nesta nova conformação quaternária ser bem definida, a estrutura deste modelo dimérico para homólogos de PLA₂-Lys49 não é claramente determinada em solução aquosa. Portanto, neste trabalho serão apresentadas os resultados obtidos utilizando a técnica de Mutagênese de Escaneamento do Triptofano (MET) no estudo da conformação do homodímero de BthTx-I em solução bem como ensaios de interação da molécula com membranas artificiais.

II – OBJETIVOS

1 – Objetivo geral

O objetivo principal do estudo é investigar as mudanças na conformação quaternária e na estrutura secundária da molécula de BthTx-I envolvidas no mecanismo de danificação à membrana. Neste sentido empregamos uma série de análises espectroscópicas de proteínas recombinantes mutadas de BthTx-I que contém resíduos únicos de Trp inseridos na superfície do SRI por mutagênese sítio-dirigida e investigamos as transições estruturais que ocorrem com a molécula em solução e quando associada aos lipossomos.

2 – Estratégia geral

A estrutura cristalina de BthTx-I revela um triptofano único na posição 77 (Trp77) localizado na interface do dímero e interações eletrostáticas e hidrofóbicas contribuem para estabilizar a forma dimérica (Arni *et al*, 1995). A importância da ligação de hidrogênio entre o anel indol da cadeia lateral do triptofano 77 de um monômero com oxigênio carbonil da cadeia principal nos átomos dos resíduos 11 e 12 da outra molécula foi demonstrado através de mutagênese sítio-dirigida (Ruller *et al*, 2005). A substituição do único triptofano pelo resíduo de histidina mostra uma conservação no padrão intermolecular da ligação de hidrogênio, preservando todas as funções biológicas, quando comparado com a proteína nativa, tais como atividade de danificação de membrana Ca^{2+} - independente e miotoxicidade. Portanto, neste estudo utilizamos o mutante Trp77His (W77H) de BthTx-I como molde para uma adicional série de mutações sítio-dirigidas, no qual duplos mutantes com triptofanos únicos na superfície da proteína foram criados. Estas mutações estão exemplificadas na **Tabela 1**.

Nove diferentes mutantes foram produzidos para criar duplos mutantes cada qual com um único resíduo de triptofano localizados na interface do dímero (posições 7 and 10), na

superfície dorsal oposta ao SRI (posições 46 and 104), superfície ventral (posições 31 and 67) e na Alça C-terminal (posições 117,119 e 125).

Tabela 1: Mutantes duplos com Trp único em diversas posições de BthTx-I.

MUTANTE	ABREVIATURA	REGIÃO DA ESTRUTURA	LOCALIZAÇÃO DA MUTAÇÃO
1 - W77H/ K7W	K7W/H	Interface dimérica	Interface dimérica
2 -W77H/ L10W	L10W/H	Interface dimérica	Interface dimérica
3 - W77H/V31W	V31W/H	Superfície Ventral	Alça da ligação de Ca ²⁺
4 - W77H/ Y46W	Y46W/H	Superfície Dorsal	Hélice 2
5 - W77H/D67W	D67W/H	Superfície Ventral	Hélice 2
6 - W77H/ I104W	I104W/H	Superfície Dorsal	Hélice 3
7 - W77H/ Y117W	Y117W/H	Superfície Ventral	Alça C-terminal
8 -W77H/ Y119W	Y119W/H	Superfície Ventral	Alça C-terminal
9 -W77H/ F125W	F125W/H	Superfície Lateral	Alça C-terminal

A superfície ventral corresponde à face do SRI, a interface dimérica corresponde à região de conexão entre os dois monômeros e a superfície dorsal à face oposta ao SRI.

- 1) Lisina (K) na posição 7 é substituída por triptofano, obtendo o mutante **K7W/H**.
- 2) Leucina (L) na posição 10 é substituída por triptofano, obtendo o mutante **L10W/H**.
- 3) Valina (V) na posição 31 é substituída por triptofano, obtendo mutante **V31W/H**.
- 4) Tirosina (Y) na posição 46 é substituída por triptofano, obtendo o mutante **Y46W/H**.
- 5) Ácido aspartico (D) na posição 67 é substituída por triptofano, obtendo mutante

D67W/H

- 6) Isoleucina (I) na posição 104 é substituída por triptofano, obtendo mutante **I104W/H**.
- 7) Tirosina (Y) na posição 117 é substituída por triptofano, obtendo mutante **Y117W/H**.
- 8) Tirosina (Y) na posição 119 é substituída por triptofano, obtendo mutante **Y119W/H**.
- 9) Fenilalanina (F) na posição 125 é substituída por triptofano, obtendo mutante **F125W/H**.

As posições dos triptofanos em toda superfície da molécula de BthTx-I estão representadas na **Figura 10**.

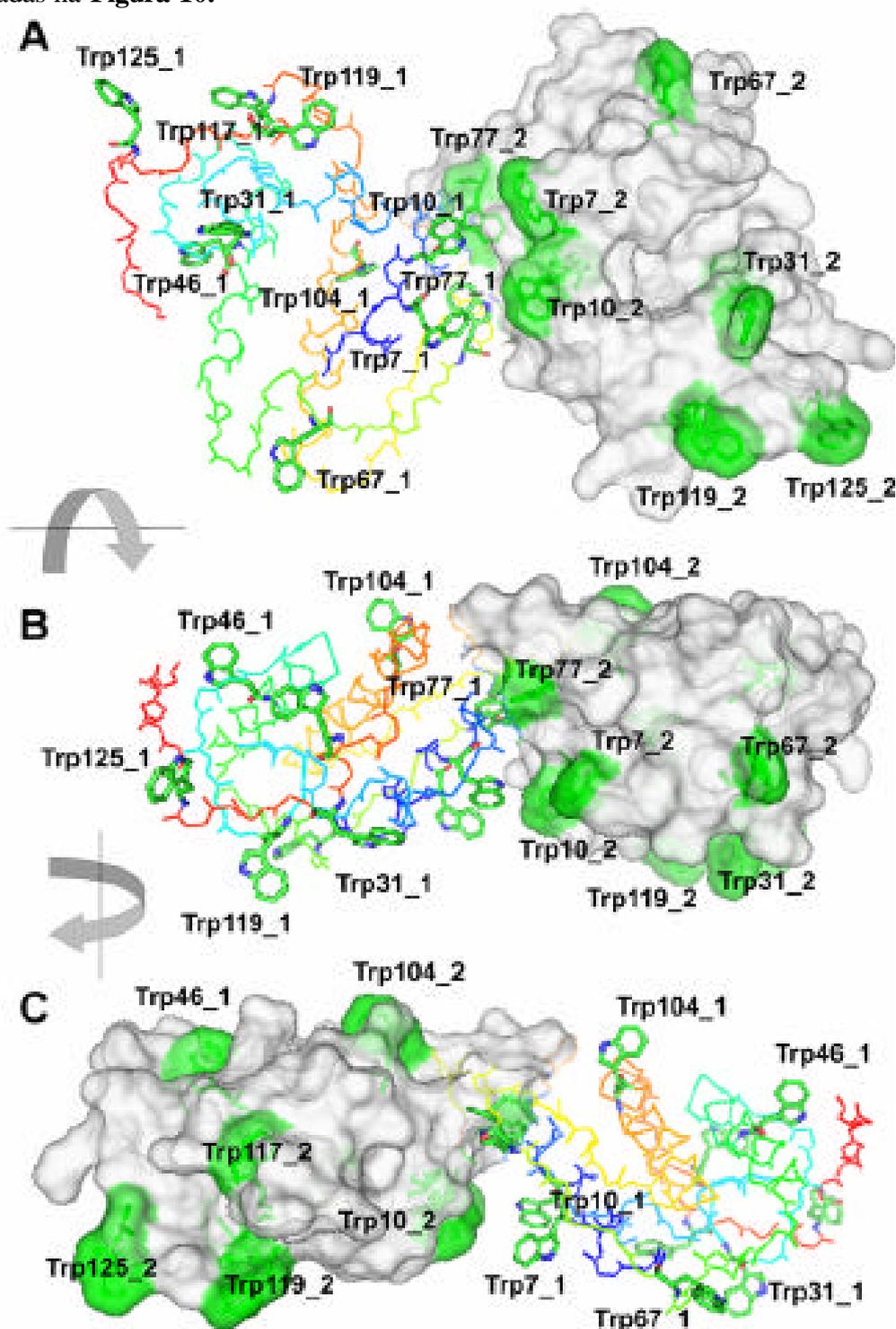


Figura 10: Estruturas quaternárias do homodímero de BthTx-I (PLA₂-Lys49). (A) Vista dorsal representando o SRI do dímero, (B) e (C) mostram as orientações relativas pela rotação ao redor dos eixos horizontal (A para B) e vertical (B para C). O monômero 1 está colorido de acordo com sua posição dentro da cadeia (N-terminal coloridos em azul, C-terminal em vermelho e os Trp_s em verde) e os resíduos de triptofanos na superfície da molécula estão demonstrados no monômero 2.

3 – Objetivos específicos

Os objetivos específicos dentro do trabalho proposto são:

- ✓ Mutagênese sítio-dirigida para produção de mutantes com triptofanos únicos na superfície da proteína, expressão, enovelamento e purificação das proteínas mutantes.
- ✓ Avaliar a interação das proteínas com membranas artificiais através da caracterização bioquímica e biofísica das proteínas mutantes em solução e na presença de lipossomos com 10% e 50% de carga negativa.
- ✓ Analisar a conformação da estrutura quaternária das proteínas através de medidas de homotransferência de energia por ressonância (HTER) entre os triptofanos da interface dimérica (posições 7, 10 e 77) com intuito de avaliar a conformação dímica proposta por da Silva Giotto *et al*, e entre os triptofanos da posição 31 com intuito de avaliar conformação dímica proposta por Murakami *et al*.
- ✓ Iniciar estudos de correlação entre os resultados obtidos através de simulação de dinâmica molecular e os resultados de HTER para os mutantes da interface dimérica.

III - TEORIA

1 – Fluorescência

A luminescência é a emissão de luz de alguma substância, sendo classificada em duas categorias: fluorescência e fosforescência dependendo da natureza do estado excitado. Quando a emissão resultante do retorno dos elétrons ao estado fundamental é associada a uma mudança na rotação do elétron o processo é chamado de fosforescência e quando não ocorre mudança na rotação é chamado de fluorescência. A taxa de emissão de fluorescência é tipicamente de 10^8 s^{-1} e o tempo de vida da fluorescência (τ) é da ordem de 10^{-8} s . A absorção e emissão de luz são ilustradas pelo diagrama de nível de energia que foi sugerido por Alexander Jablonski em 1935 (**Figura 11**). No diagrama está representado o estado fundamental (S_0), os outros níveis S_1 , S_2 , S_n e subníveis de energia.

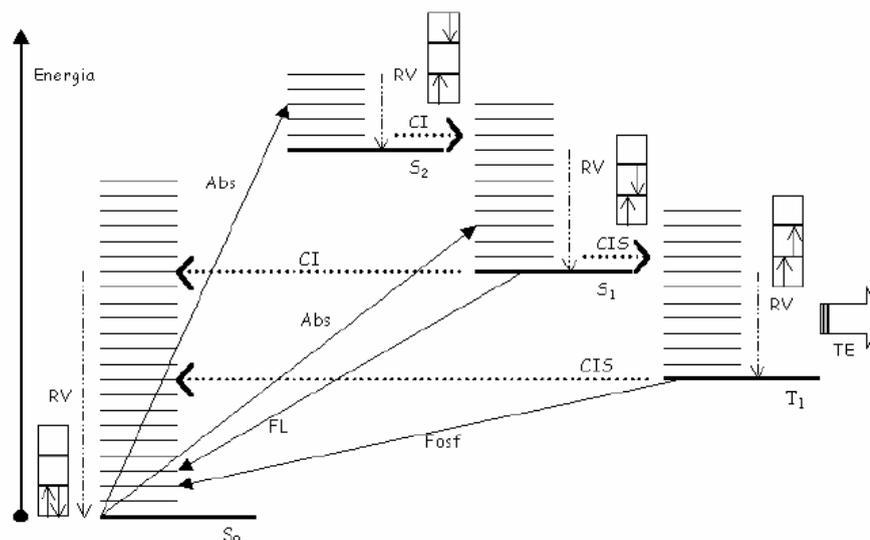


Figura 11: Diagrama de Jablonski. Abs : absorção de energia, CI: conversão Interna, CSI: conversão Intersistema, Fosf: emissão de fosforescência, FL: emissão de fluorescência, RV: relaxação vibracional, TE: transferência de energia.

A absorção de um fóton de luz ocorre em torno de 10^{-15} s e leva o fluoróforo a uma transição de um estado energético baixo (S_0) a um nível de energia maior (S_1 ou S_2). Quando um elétron está em um orbital de maior energia, como no estado excitado singlete (S_1), e possui a orientação da rotação oposta ao do elétron do orbital de menor energia, esses dois elétrons são ditos pareados. A emissão de fluorescência, cujo tempo de vida varia entre 10^{-7} e 10^{-9} s, resulta de um decaimento do estado excitado equilibrado termicamente S_1 (singlete), com suas rotações dos elétrons pareados para o estado nativo (ou fundamental S_0). As moléculas em S_1 podem também sofrer uma conversão para o estado tripleto (T_1) cujos elétrons não estão pareados, ou seja, suas rotações têm a mesma orientação. O retorno do estado tripleto ao estado fundamental necessita da inversão da rotação dos elétrons e a fosforescência resulta dessa emissão ($T_1 \rightarrow S_0$), e sendo a inversão da rotação desfavorável, a fosforescência é mais lenta com tempo de vida entre 10^{-1} e 10^{-4} s. (Lakowicz, 1983).

Os fluoróforos são divididos em duas classes: intrínsecos e extrínsecos. Os fluoróforos intrínsecos são aqueles que ocorrem naturalmente e os extrínsecos são aqueles adicionados na estrutura da molécula que não possui propriedades espectrais. Na maioria das proteínas, o grupo indol do resíduo de triptofano é responsável por mais de 90% do total de fluorescência seguido pelos resíduos de tirosina e fenilalanina.

Os espectros de fluorescência são geralmente apresentados em um gráfico da intensidade de fluorescência em função do comprimento de onda (λ). As mudanças na intensidade e no comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) dos espectros de emissão permitem avaliar vários fenômenos como associação de ligantes, interações proteína-proteína, desnaturação, entre outros. Em particular, os estudos de fluorescência dos aminoácidos aromáticos Tyr e Trp fornecem informações sobre as mudanças estruturais nas regiões da proteína onde se encontram estes resíduos.

2 – Fluorescência Intrínseca do Triptofano (FIT).

As proteínas podem conter três aminoácidos que contribuem para sua fluorescência: tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe) e o triptofano (Trp). (Lakowicz, 1991). A absorção das proteínas em 280nm é devida aos resíduos de tirosina e de triptofano. Em comprimentos maiores, como 295nm, a absorção é primariamente do resíduo de triptofano. Isso sugere que este resíduo pode ser seletivamente excitado entre 295 a 305nm. O comprimento de onda de emissão máxima do triptofano na água é de 348nm sendo altamente dependente da polaridade do microambiente (**Figura 12**)

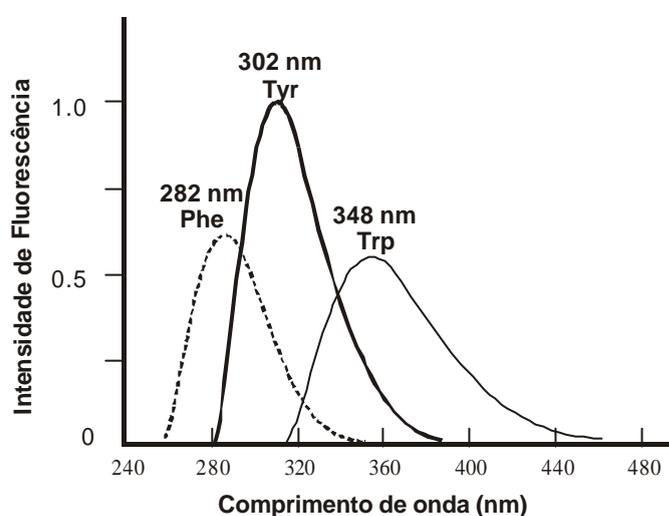


Figura 12: Espectro de emissão de fluorescência de fluoróforos naturais. O aminoácido fenilalanina emite em 282 nm, seguida da tirosina em 302 nm e o triptofano em 348 nm (Lakowicz, 1991).

O sucesso da aplicação dos métodos de fluorescência requer considerável atenção nos detalhes experimentais e um conhecimento da instrumentação utilizada. Basicamente existem duas classes de espectrofluorímetros: os fotoestacionários e os pulsados. Os espectrofluorímetros que operam em condições fotoestacionárias excitam as espécies em modo contínuo, obtendo-se os espectros eletrônicos de emissão e de excitação. Os espectrofluorímetros pulsados excitam as espécies por meio de pulsos de radiação, obtendo-se os tempos de decaimento do estado eletrônico excitado e os espectros resolvidos no tempo.

3 – Espectroscopia de fluorescência no estado estático

3.1 – Espectros de Emissão de fluorescência intrínseca do triptofano (EFIT).

A emissão de fluorescência do Trp é altamente dependente da polaridade de seu microambiente. Para o triptofano, o grupo indol e seus derivados, o comprimento de onda de absorção (240 – 300 nm) consiste na sobreposição das transições dos estados excitados 1L_a e 1L_b . Estes estados possuem energias semelhantes, e dependendo do microambiente ao redor do fluoróforo, estes estados podem ter a energia reduzida. A polaridade do grupo indol é complexa porque as transições eletrônicas 1L_a e 1L_b possuem diferentes orientações na molécula (**Figura 13**). Cada estado tem um distinto momento de dipolo, e, portanto cada estado responde diferentemente à polaridade do solvente.

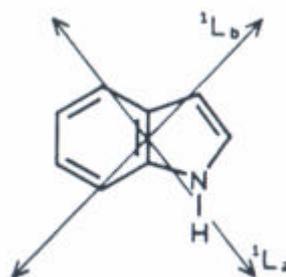


Figura 13. Transição eletrônica de absorção do triptofano.

Uma descrição quantitativa dos efeitos ambientais nos espectros de emissão de fluorescência é um tópico complexo na espectroscopia de fluorescência devido à influência do solvente e dos resíduos vizinhos no momento dipolo do fluoróforo. No entanto alguns efeitos básicos podem ser considerados na interpretação dos espectros de emissão de fluorescência:

- 1- Toda a fluorescência de uma proteína é devida aos resíduos aromáticos (fluoróforos intrínsecos) a menos que a proteína contenha outro componente fluorescente (fluoróforos extrínsecos).
- 2- Se λ_{\max} (comprimento de onda de emissão de fluorescência máximo) é modificado para comprimentos de onda mais curtos (blue-shift) quando a proteína está num

solvente polar como a água, assim o triptofano deve estar num ambiente interno ou não polar.

- 3- A presença de resíduos positivamente carregados modifica o λ_{\max} para comprimentos de onda longos (red-shift).

3.2 – Anisotropia de fluorescência.

A polarização e anisotropia de emissão são conseqüências da diferença média angular que ocorre no fluoróforo entre a excitação e a emissão dos fótons (Lakowicz, 1983). A polarização da emissão dos fluoróforos intrínsecos nas proteínas pode ser resultante de vários fenômenos; o movimento das cadeias laterais dos resíduos fluorescentes da proteína, a difusão rotacional do fluoróforo durante o tempo de vida excitado que depende do raio e da forma da molécula em estudo, e também um componente devido à anisotropia intrínseca do fluoróforo.

As medidas de anisotropia de fluorescência podem ser mensuradas como ilustradas na **Figura 14**. A amostra é excitada com luz polarizada verticalmente (o vetor elétrico de excitação é orientado paralelamente ao eixo z). As medidas das intensidades de emissão I_v e I_h são feitas através de polarizadores que estão orientados paralelamente (vv) e perpendicularmente (vh) à luz polarizada de excitação.

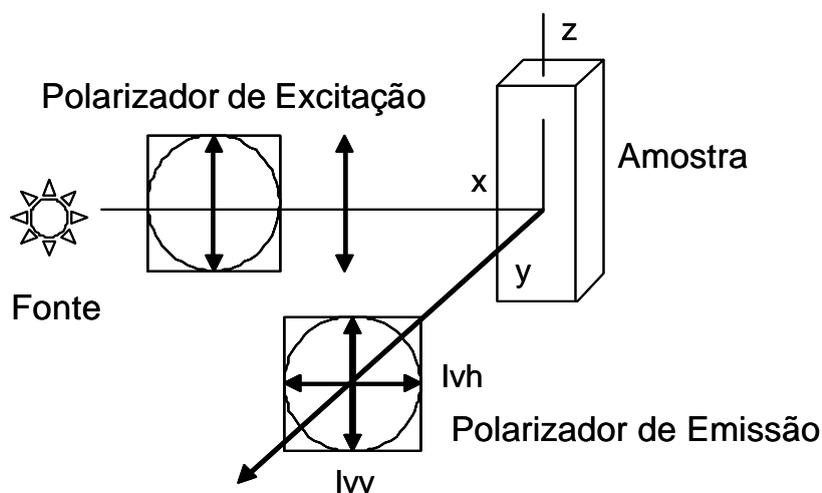


Figura 14. Diagrama esquemático para medidas de anisotropia de fluorescência.

A polarização (P) e anisotropia de emissão (r) são definidas pelas **equações 1 e 2**:

$$P = (I_{vv} - C_f I_{vh}) / (I_{vv} + C_f I_{vh}) \quad (1)$$

$$r = (I_{vv} - I_{vh}) / (I_{vv} + I_{vh}) \quad (2)$$

Onde: I_{vv} e I_{vh} : são as intensidades de fluorescência dos componentes horizontais e verticais da emissão com excitação usando luz polarizada no plano vertical. C_f : corresponde ao fator de correção que varia com o aparelho utilizado. A anisotropia é independente do total da intensidade da amostra.

Estas duas medidas são relacionadas pelas **equações 3 e 4**:

$$r = 2P / (3 - P) \quad (3)$$

$$P = 3r / (2 + r) \quad (4)$$

A dependência da anisotropia de fluorescência na difusão rotacional permite uma variedade de aplicações da técnica na área de bioquímica. No caso de macromoléculas protéicas esta difusão rotacional tem base na rotação da proteína inteira, giros de resíduos de aminoácidos fluorescentes (triptofano e tirosina) e mobilidade dos elementos de estrutura secundária (α -hélices e folhas $-\beta$). Com este método, também se pode monitorar a desnaturação e as transições da estrutura quaternária de proteínas.

4 – Espectroscopia de fluorescência com resolução temporal.

O tempo médio em que a molécula permanece no estado excitado, antes de retornar ao estado fundamental representa o tempo de vida de fluorescência da substância. Tal informação nos revela a taxa de transição entre os estados, a frequência de encontros

colisionais com agentes supressores, além das taxas de transferência de energia e reações dos estados excitados, fornecendo um entendimento mais profundo sobre a molécula de interesse do que as medidas no tempo estático.

Atualmente existem dois métodos para coleta e análise dos dados dos tempos de decaimento de vida e anisotropia: o método pulsado e o método harmônico ou fase-modulado. No método harmônico, a amostra é excitada com uma luz senoidalmente modulada, e utiliza-se o deslocamento de fase e a demodulação da emissão relativas à luz incidente para o cálculo do tempo de vida. No método pulsado, a amostra é excitada com um breve pulso de luz e o decaimento da intensidade da fluorescência é medido pela diferença no tempo de detecção entre os fótons de excitação e emissão.

4.1 - Fluorimetria de pulso.

Na fluorimetria de pulso a amostra é excitada com um pulso de luz e o tempo de decaimento τ é calculado a partir do tempo que a intensidade decresce de $1/e$ do valor de $t = 0$. Alternativamente, o tempo de vida pode ser determinado da curva $\log F(t)$ versus t , como demonstrado na **Figura 15**.

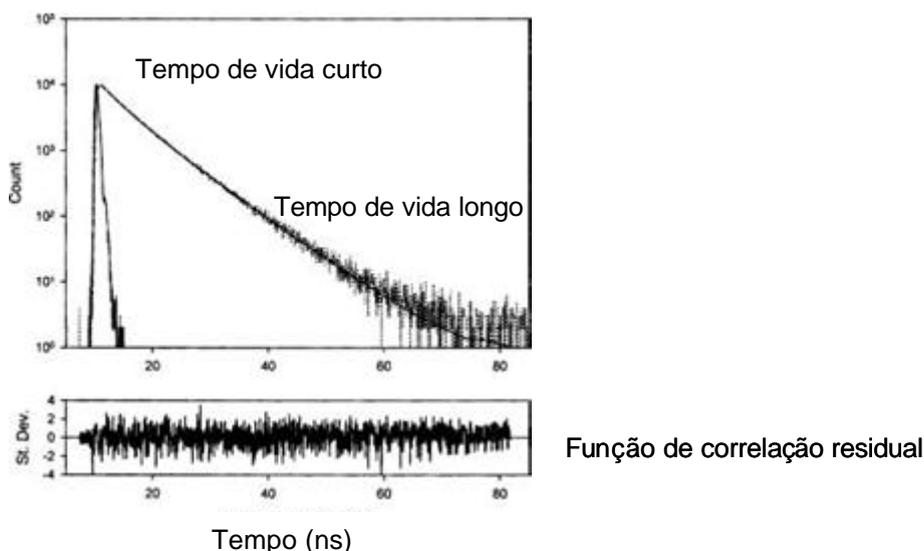


Figura 15: Esquema de decaimento de vida de fluorescência por fluorimetria de pulso.

Admitindo que uma amostra seja excitada com um pulso de luz, o resultado da emissão dependente do tempo é chamado função resposta ao impulso. Para decaimentos mais complexos, a função pode ser representada por um modelo multiexponencial:

$$I_f(t) = \sum_i \mathbf{a}_i \exp(-t/\mathbf{t}_i) \quad (5)$$

Onde os valores de \mathbf{a}_i são os fatores pré-exponenciais e o \mathbf{t}_i são os valores do tempo de decaimento. Para uma mistura de mais de um fluoróforo em que cada um mostra um simples decaimento de tempo, temos:

$$f_i = \int_0^{\infty} \mathbf{a}_i \exp(-t/\mathbf{t}_i) dt = \mathbf{a}_i \mathbf{t}_i \quad (6)$$

Onde \mathbf{t}_i é o decaimento de vida de um dos fluoróforos e f_i é a contribuição fracional deste fluoróforo na emissão total que colocado na **equação 5** resulta em:

$$I_f(t) = \sum_i f_i \mathbf{t}_i^{-1} \exp(-t/\mathbf{t}_i) \quad (7)$$

Nas medidas dos decaimentos de tempo resolvido o objetivo é determinar a função $F(t)$. Sendo as larguras dos pulsos de excitação da mesma ordem às dos tempos de decaimento, o tempo zero não é definido, e, portanto, não podemos determinar o início da contagem do tempo de vida.

Podemos considerar o pulso da lâmpada como um grande número de pulsos estreitos a cada tempo t_i , com iguais larguras ϕt , onde ϕt é muito menor do que o tempo de decaimento observado. Cada pulso individual gera um outro pulso como resposta

$$R_i(t) = L(\mathbf{t}_i) \Delta t F(t - \mathbf{t}_i) \quad (t > \mathbf{t}_i) \quad (8)$$

O tempo $(t - t_i)$ serve para nos lembrar que o tempo do decaimento é contado a partir do instante da excitação, que é t_i . Para $t < t_i$, subentende-se que $R_i(t) = 0$. Faz-se aqui uma mudança de variáveis $\mu = t - t_i$. O total do decaimento é somado sobre todos os pulsos:

$$R(t) = \sum_{m=0}^{t-t_i} L(t-m)F(m)\Delta m \quad (9)$$

Conforme μt se aproxima de zero, tal soma se torna uma integral deconvolução:

$$R(t) = \int_{m=0}^{t-t_i} L(t-m)F(m)\Delta m \quad (10)$$

Nas medições experimentais, são obtidas as curvas de decaimento total $R(t)$ e a do perfil da lâmpada $L(t)$. Como o interesse é observar a curva de decaimento líquido $F(t)$, sem o efeito causado pelo pulso de excitação, se torna necessário fazer a deconvolução da integral da **equação 10**.

O software de aquisição de dados além de calcular todos os parâmetros necessários para obtenção dos tempos de vida da amostra, também analisa a função de autocorrelação residual (**Figura 15**), que possibilita avaliar a qualidade do ajuste feito, pois apresenta os desvios observados entre os dados experimentais e a curva ajustada. (Lakowicz, 1991)

4.1.1 Técnica de Contagem de fóton único correlacionada no tempo (TCSPC - Time Correlated Single Photon Counting)

Medidas do decaimento da intensidade de fluorescência podem ser feitas em um espectrofluorímetro com resolução temporal, baseado no método de correlação temporal de fótons únicos. O método baseia-se na excitação da amostra com pulsos de luz, onde os fótons

da excitação são correlacionados temporalmente com os fótons emitidos pela amostra. Os princípios dessa técnica podem ser compreendidos examinando-se o esquema experimental da

Figura 16 a seguir:

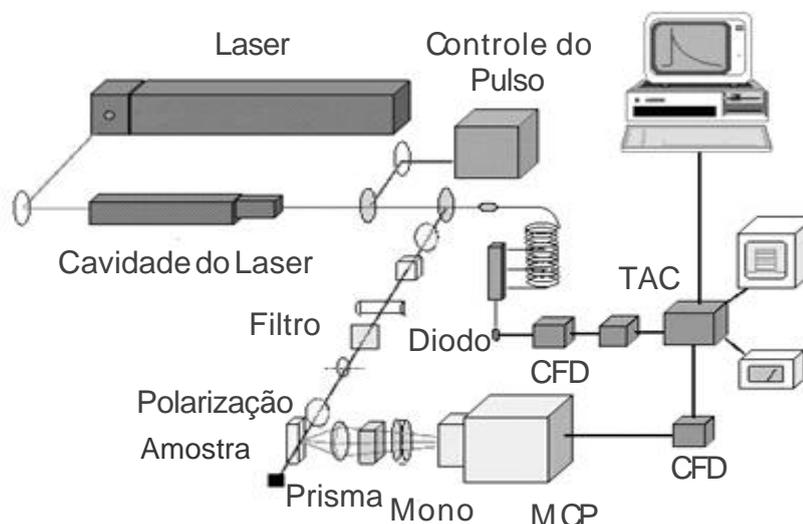


Figura 16: Diagrama esquemático do aparato experimental da técnica de correlação temporal de fótons únicos. Mono = monocromador, MCP = Multi Channel Plate, CFD = constant fraction discriminator, TAC = time-amplitude converter.

(fonte: www.chemistry.msu.edu/BlanchardLab/img002.jpg).

O experimento começa com um pulso de luz de excitação incidindo sobre uma amostra. TCSPC é uma técnica digital que conta fótons correlacionados temporalmente em relação ao pulso de excitação. O ponto central do método está no conversor tempo-amplitude, ou Time to Amplitude Converter (TAC).

A amostra é excitada repetitivamente usando-se uma fonte de luz pulsada, geralmente um laser; cada pulso é opticamente monitorado por um fotodiodo ou fotomultiplicadora que produz um sinal inicial usado para disparar a rampa de tensão do TAC. A rampa de tensão pára quando o primeiro fóton proveniente da fluorescência da amostra é detectado (sinal de parada). O TAC gera então um pulso de saída, cuja voltagem é proporcional ao tempo entre o sinal inicial e o sinal de parada. Um analisador multicanal (MCP - Multi Channel Plate) converte esse sinal de tensão em um valor de tempo usando um conversor analógico-digital, e

através da soma de todos os pulsos constrói um histograma de contagens *versus* canais de tempo.

Durante a aquisição dos dados, não deve haver mais de um fóton detectado a cada cem pulsos de laser, porque a eletrônica permite somente a detecção do primeiro fóton emitido pela amostra. Uma vez que esse primeiro fóton é detectado, o tempo morto da eletrônica impede a detecção de outro fóton proveniente do mesmo pulso de excitação. Lembremos que a emissão é um evento aleatório. Logo após o pulso de excitação são emitidos muito mais fótons em tempos curtos do que fótons em tempos longos. Se todos pudessem ser medidos, então o histograma dos tempos de chegada representaria o decaimento da intensidade. No entanto, se muitos fótons chegam e somente o primeiro é contado, o decaimento da intensidade seria distorcido e apresentaria um tempo muito curto.

4.2-Fluorimetria pelo método harmônico.

No método harmônico a amostra é excitada com uma luz de intensidade modulada com frequência angular ω ($\omega=2\pi f$, sendo f a frequência de modulação da luz). A intensidade de luz incidente é variada em alta frequência, e como consequência a emissão de fluorescência apresenta uma modulação de frequência. Por causa do tempo de vida dos fluoróforos, a emissão é atrasada no tempo relativo da excitação. Este atraso é medido como uma mudança de fase (ϕ) a qual pode ser usada para calcular o tempo de decaimento (Lakowicz, 1991).

Outra observação é a existência de uma diminuição na intensidade de emissão relativa da excitação modulada. Este efeito, chamado demodulação, pode também ser usado para o cálculo do decaimento do tempo de vida da amostra (**Figura 17**).

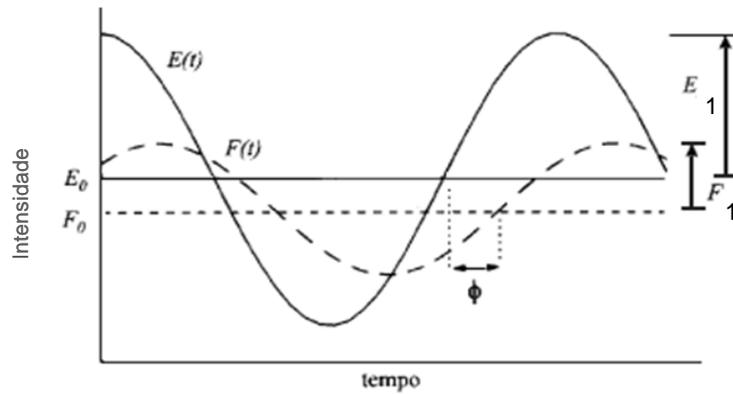


Figura 17: Esquema do decaimento de vida de fluorescência pelo método harmônico. $\Delta\phi$ é a variação na fase e M é medida da demodulação.

Medidas da fase e do fator de demodulação da fluorescência fornecem dados para duas determinações independentes do tempo de vida da fluorescência. Estes dados estão relacionados com a intensidade da fluorescência, $I_f(t)$, pela transformada de Fourier seno e cosseno, escritas conjuntamente da forma:

$$I_f(\omega) = \int_0^{\infty} I_f(t) \exp(-i\omega t) dt \quad (11)$$

Considerando, o caso de um único tempo de vida a intensidade da fluorescência, dada pela **equação 7**, fica escrita como:

$$I_f(t) = \frac{1}{t} \exp(-t/\tau) \quad (12)$$

Que substituído na equação 11 resulta em:

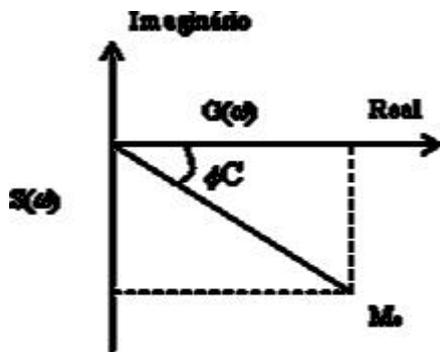
$$I_f(\omega) = \frac{1}{\tau} \int_0^{\infty} \exp\left[-\left(\frac{1}{\tau} + i\omega\right)t\right] dt = \frac{1 - i\omega\tau}{1 + \omega^2\tau^2} \quad (13)$$

Então $I_f(\omega)$ pode ser uma função com uma parte real (G) e outra imaginária (S):

$$G(w) = \frac{1}{1 + w^2 t^2} \quad (14)$$

$$S(w) = \frac{wt}{1 + w^2 t^2} \quad (15)$$

Que correspondem ao fator M_c , ilustrado no esquema a seguir, que é o módulo da função e uma diferença na fase ϕ_C .



$$M_c = (S^2(w) + G^2(w))^{1/2} = (1 + w^2 t^2)^{1/2} \quad (16)$$

$$\operatorname{tg} \phi_C = S(w) / G(w) = wt \quad (17)$$

Portanto os tempos de vida dados pelas **equações 16 e 17** são:

$$t_p = \frac{1}{w} \operatorname{tg} \phi_C \quad (18)$$

$$t_M = \frac{1}{w} \left(\frac{1}{M_c^2} - 1 \right)^{1/2} \quad (19)$$

Para um único decaimento exponencial τ_p e τ_M devem ser idênticos para todas as frequências de modulação. Quando os tempos de vida obtidos da fase e da modulação, considerando-se um único decaimento, são diferentes, deve-se fazer a análise com o modelo multi-exponencial. Nesta situação, as funções $S(\omega)$ e $G(\omega)$ são somas das contribuições de cada cromóforo, e são escritas como:

$$S(\omega) = \sum_i \frac{f_i \omega t_i}{1 + \omega^2 t_i^2} \quad (20)$$

$$G(\omega) = \sum_i \frac{f_i}{1 + \omega^2 t_i^2} \quad (21)$$

Tanto com este modelo como no caso de um único decaimento exponencial são usados valores iniciais para as frações de cada componente f_i (no caso de um só decaimento há uma única fração e $f = 1$) e para os tempos de vida de cada componente t_i . As funções $S(\omega)$ e $G(\omega)$ são calculadas pelas **equações 20 e 21**, para as frequências de modulação usadas nas medidas. O fator de modulação $M_c(\omega)$ e a fase $\phi_c(\omega)$ são obtidos através das **equações 16 e 17** e estes valores são comparados com valores de $f(\omega)$ e $M(\omega)$, obtidos experimentalmente (**Figura 18**). Realiza-se então um procedimento de ajuste baseado em uma análise de mínimos quadrados não-linear para se deduzir os tempos de vida e as frações de cada componente. A função minimizada é:

$$C^2 = \frac{1}{2n - p - 1} \left[\sum_w \left(\frac{f(\omega) - f_c(\omega)}{d_f} \right)^2 + \sum_w \left(\frac{M(\omega) - M_c(\omega)}{d_M} \right)^2 \right] \quad (22)$$

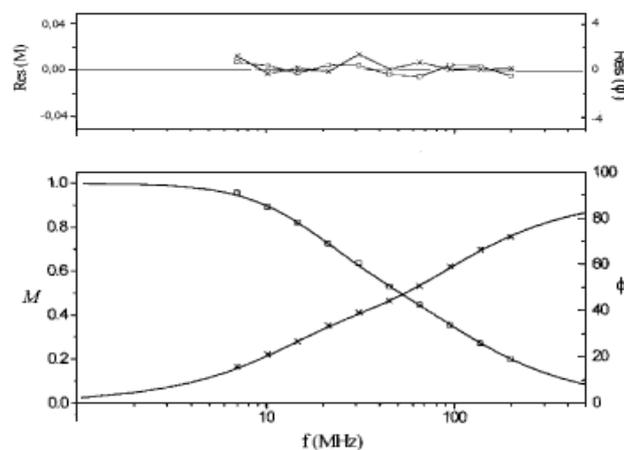


Figura 18: Exemplo de curvas de decaimento de vida de fluorescência pelo método harmônico. Em alta frequência modulada, o ângulo da fase diminui e a modulação aumenta (Nakaema & Sanches, 1999).

Onde n é o número de frequências de modulação usadas, p é o número de parâmetros livres no ajuste e $d\phi$ e dm são as incertezas nos valores da fase e modulação. Para uma interpretação consistente nos dados adota-se os valores de $d\phi=0.2$ e $dm=0.004$. (Nakaema & Sanches, 1999).

O equipamento básico consiste de uma lâmpada de Xe cuja luz é focada em um monocromador e é depois modulada por uma célula de Pockel no intervalo de frequência de 0,4 a 350 MHz (**Figura 19**). O equipamento utiliza o princípio de "correlação cruzada" para se fazer medidas de fase e modulação em frequências altas. (Nakaema & Sanches, 1999). Um sintetizador de frequência gera um sinal modulado que controla a célula de Pockel. Com um divisor de feixes, uma parte da luz é enviada a uma fotomultiplicadora de referência que mede a intensidade e a fase da luz incidente.

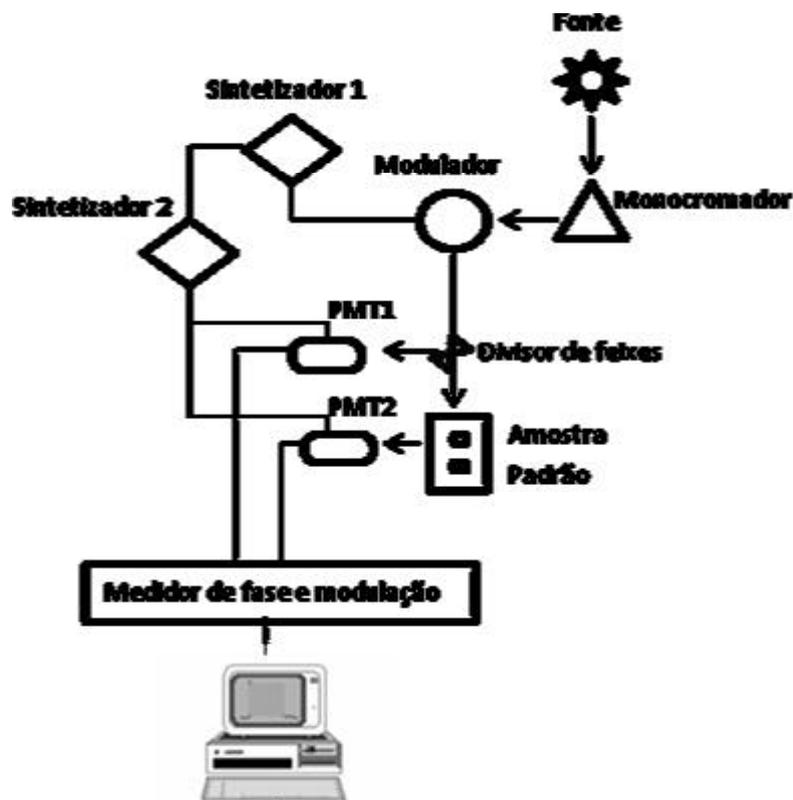


Figura 19: Esquema do equipamento de fluorescência para medidas no domínio da frequência.

O compartimento da amostra é equipado com uma torre girante que permite a troca fácil entre a amostra e uma substância padrão. A luz emitida é detectada por uma outra fotomultiplicadora, depois de passar por um filtro de seleção de comprimento de onda. Um segundo sintetizador, em fase com o primeiro, gera o sinal que modula a resposta das duas fotomultiplicadoras. Os dois sintetizadores têm frequências ligeiramente diferentes, diferença que corresponde à frequência de "correlação cruzada".

Em uma medida típica, o atraso na fase e a modulação são medidos para uma substância padrão em relação ao sinal gerado pela fotomultiplicadora de referência. Esta medida é feita para que se consiga a referência para $t = 0$. (Nakaema & Sanches, 1999)

5 -Transferência de Energia por Ressonância (TER).

A transferência de energia por ressonância ocorre quando o comprimento de onda de emissão de fluorescência de um fluoróforo (doador) sobrepõe-se ao comprimento de onda de absorção de outro fluoróforo nas proximidades (aceptor) (Packard *et al*, 1997). O mecanismo de transferência de energia por ressonância é definido como uma interação dipolo-dipolo fraca entre dois fluoróforos.

$$k_T = 1 / t_d (R_0/R)^6 \quad (23)$$

Onde k_T é a taxa de transferência, t_D é o tempo de vida do doador na ausência de acceptor, R é a distância doador-receptor, R_0 é a “distância crítica” de Förster (Å), na qual a eficiência da transferência de energia é de 50%.

A etapa fundamental na aplicação prática de transferência de energia à biofísica experimental está no cálculo do valor da distância de Förster (R_0) para o par doador-receptor.

$$R_0^6 = 8.785 \times 10^{-5} (k^2 f_D J) / n^4 \quad (24)$$

Os fatores mais importantes neste cálculo são a integral da sobreposição (J) dos espectros do doador e do receptor, o rendimento quântico do doador na ausência do receptor (f_D), o fator de orientação entre as transições de dipolos de duas moléculas (k), e n o índice de refração do meio. (Lakowicz, 1983). Deste modo, a integral da sobreposição é calculada de acordo com a equação:

$$J(I) = \frac{\int_0^{\infty} I_D(I) e(I) I^4 dI}{\int_0^{\infty} I_D(I) dI} \quad (25)$$

Onde $e(\lambda)$ é o coeficiente de extinção molar expresso em mol/cm, $F_D(\lambda)$ a intensidade de fluorescência normalizada, e λ o comprimento de onda (em cm).

O cálculo da integral de sobreposição sugere que para os doadores que possuem um elevado rendimento quântico e aceptores com coeficientes de extinção elevados, a integral de sobreposição será maior, produzindo um valor maior de R_0 .

A transferência de energia demonstra uma dependência no fator de orientação k^2 , o qual pode ser descrito como:

$$k^2 = (\cos^2 \theta_T - 3 \cos \theta_d \cos \theta_a)^2 \quad (26)$$

Onde θ_T é o ângulo entre o dipolo de transição do doador e o dipolo de absorção do receptor, e θ_d e θ_a são os ângulos entre estes dipolos e a soma vetor do doador e receptor. O fator de orientação dipolo-dipolo entre o doador e o receptor depende do alinhamento dos dois

dipolos, e varia de 0 (perpendicular em ambos os dipolos) a 2 (dipolos paralelos), assim o valor de k^2 pode alternar de 0 à 4. No estudo descrito aqui, o fator de orientação pode ser calculado a partir de dados de simulação molecular entre os fluoróforos.

Do ponto de vista cinético, a eficiência da transferência de energia por ressonância é definida pela razão da taxa de transferência de energia (k_T) pelo inverso da soma do tempo e vida do doador t_D com a taxa de transferência (k_T):

$$E = \frac{k_T}{t_d^{-1} + k_T} \quad (27)$$

A eficiência de transferência de energia é frequentemente calculada do relativo rendimento da fluorescência na presença (F_{da}) e ausência do aceptor (F_d), ou o tempo de vida sobre estas respectivas condições:

$$E = 1 - (t_{da}/t_d) \quad (28)$$

$$E = 1 - (F_{da}/F_d) \quad (29)$$

A **equação 28** pode ser derivada da **equação 27**, assumindo que $t_{da} = (k_d + k_T)^{-1}$ e $k_T = t_{da}^{-1} - t_d^{-1}$. Assim, a eficiência de transferência de energia pode ser diretamente relatada como:

$$E = R^{\phi}_0 / (R^{\phi}_0 + R^{\phi}) \quad (30)$$

A **equação 30** mostra o cálculo de E assumindo que a interação doador-receptor não altera o tempo de vida do doador. Em proteínas, TER entre os resíduos de Tyr e Trp resulta na diminuição de intensidade de emissão. Além disso, as diferenças de orientações dos

vetores de emissão do doador e do aceptor, o TER resulta em uma diminuição na anisotropia do sistema.

Nesse contexto, tem sido observada a homotransferência entre resíduos de Trp quando os mesmos se encontram próximos no arranjo protéico (de Oliveira *et al.*, 2001), o que também pode resultar em uma diminuição da anisotropia intrínseca destes fluoróforos.

6 – Simulação de Dinâmica Molecular

Com a possibilidade de correlacionar os dados de simulação de dinâmica molecular com os resultados de HTER foram realizados cálculos com as proteínas mutantes da interface dimérica e o mutante W77H/V31W, em colaboração com Dr. Marcos Roberto Lourenzoni, especialista em Simulação Molecular da empresa VERDARTIS – DESENVOLVIMENTO BIOTECNOLOGICO S/S LTDA, Ribeirão Preto – SP.

A simulação molecular é um método teórico que usa algoritmos computacionais para calcular as posições de todos os átomos de uma proteína com base em suas propriedades físico-químicas fundamentais ao longo do tempo, atuando nos graus de liberdade intramolecular de uma maneira análoga à minimização de energia.

O objetivo da dinâmica molecular é prever a energia associada a uma dada conformação de uma molécula, porém, as energias da dinâmica molecular não têm significado de quantidades absolutas, pois somente diferenças de energia entre duas ou mais conformações têm significado físico. A equação para os potenciais de interação de um dado sistema em estudo juntamente com os parâmetros necessários para descrever o comportamento de diferentes tipos de átomos e ligações, é chamada de campo de força. A escolha do campo de força depende, em grande parte, do sistema a ser estudado e das propriedades do mesmo que serão investigadas. Embora uma descrição refinada das vibrações atômicas seja relevante, as conformações das macromoléculas dependem mais das torções,

das repulsões, atrações de van der Waals e das interações eletrostáticas. (<http://www.fisica.uel.br/atomol/simula%C3%A7%C3%A3o.html>)

O resultado de uma simulação é uma série temporal de estruturas que podem ser analisadas para obter informações a respeito da dinâmica da proteína. O cálculo fornece as coordenadas atômicas da estrutura em cada fração de tempo, e usando os dados gerados por uma simulação da forma dimérica dos mutantes de BthTx-I, foram extraídas as coordenadas dos grupos indol dos Trps, e utilizados para calcular as variações nos fatores de orientação e distância entre os Trps ao longo de um tempo de 10 ns.

IV – MATERIAIS E MÉTODOS

1 - Preparação dos fragmentos

1.1 - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase permite introduzir uma mutação em qualquer molécula de DNA de fita dupla (Nelson e Long, 1989), utilizando-se oligonucleotídeos específicos ("*primers*") e um molde que contenha o gene clonado.

Os componentes envolvidos nesta reação são basicamente os mesmos do processo de replicação que ocorre no interior das células: DNA que contém o segmento a ser amplificado, nucleotídeos (A,T,C e G), enzima DNA polimerase, dois iniciadores (pequena seqüência de DNA complementar ao DNA alvo).

A reação ocorre em um termociclador que através de sucessivas mudanças de temperatura, direciona as três etapas da reação:

1. Desnaturação: ocorre a separação da dupla fita de DNA molde por meio da elevação da temperatura para ~ 94°C.

2. Anelamento: uma vez separadas as fitas de DNA, a temperatura da reação é reduzida para ~ 60°C e os iniciadores anelam-se um em cada fita molde, nas respectivas seqüências complementares vizinhas à região alvo da amplificação.

3. Extensão: eleva-se a temperatura para ~ 72°C para que a enzima Taq DNA polimerase posicione-se junto aos iniciadores que se anelaram anteriormente e comece a duplicação da fita molde, adicionando os nucleotídeos que contenham as bases nitrogenadas complementares à fita molde.

Após o término deste ciclo, todo o processo é repetido a partir da desnaturação até a extensão por várias vezes até que se obtenha uma quantidade razoável do DNA a ser amplificado.

A **Figura 20** demonstra todas as etapas envolvidas no processo de mutagênese sítio-dirigida e posteriormente foram descritos os oligonucleotídios utilizados.

MUTAGÊNESE SÍTIO DIRIGIDA POR PCR

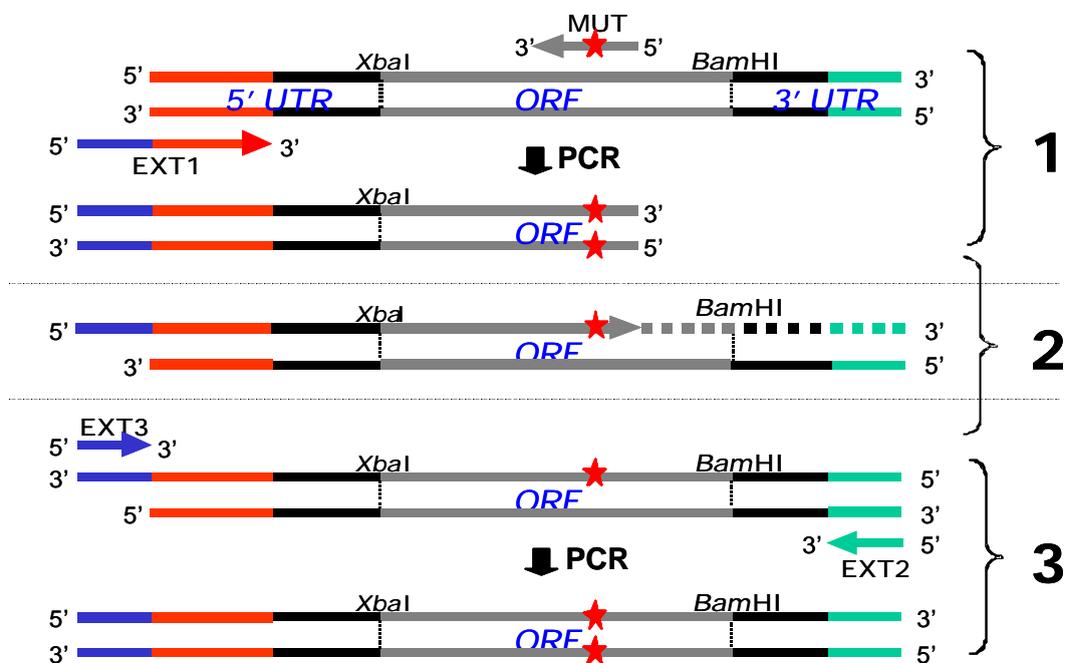


Figura 20: Esquema ilustrativo de mutagênese sítio-dirigida por reação em cadeia de polimerase. EXT1, EXT2, EXT3 E MUT: oligonucleotídios complementares a seqüência molde; *Xba I* e *BamHI* representam as posições dos sítios de restrição enzimáticos; ORF: janela de leitura aberta; UTR: regiões não traduzidas.

Na reação foram utilizados os seguintes oligonucleotídios:

EXT1 (5' para 3'): CGA AAG CAG AGA AAA GAT GCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG

EXT2 (5' para 3'): CGA AAG CAG AGA AAA GAT GCC

EXT3 (5' para 3'): GAC AGC TAT CGC GAT TGC AGT GGC

Os oligonucleotídios mutagênicos mostrados nas **Tabela 2** e **Tabela 3**.

Tabela 2: Oligonucleotídeo para introdução da mutação W77H. (Ruller *et al*, 2005).

<i>MUTANTE</i>	<i>OLIGONUCLEOTÍDIO (5' para 3')</i>
W77H	CTT GTC CTT GTG GCT ATA GGA

Tabela 3: Oligonucleotídeos para introduzir as mutações na superfície de BthTX-I.

<i>MUTANTE</i>	<i>OLIGONUCLEOTÍDIOS (5' para 3')</i>
K7W	AAA CTC GAG CCC ACC CAT
L10W	TTT TAC TAG ACC GTT CTC
V31W	TTG ACA CCG ACC GAA CCG GC
Y46W	TTG TGC ACC CAG CAG CAG CG
D67W	CCG ACG ACC GGG TTT TTC C
I104W	CAC CGT ACC ACG GAG GC
Y117W	G ATA CCT ACC TTT TTT GTT
Y119W	TT CAC GTG ACC CCT ATA TTT
F125W	TT GCA ACC AGG TTT CAG

1.2 - Mutagênese Sítio Dirigida

Todo o processo para gerar os mutantes propostos baseou-se em seqüências de reações em PCR, como mostra na **Figura 20** e monitoradas através de análise em gel de agarose 2%, coradas em brometo de etídio (0,05µg/mL).

Para todas as reações utilizou-se o vetor de pET3a + *Btx*-I com mutação na posição 77 onde foi substituído um triptofano por uma histidina. (W77W).

Primeira Etapa: neste passo foi incorporada e amplificada a fita dupla de DNA o oligo EXT1 e o oligo mutagênico. Para tanto foi utilizado a mistura de 1 X tampão de PCR

(20mM Tris-HCl, pH8.4, 50mM KCl), 2pMol do oligo EXT1, 100pMol do oligo mutante, 2,5mM dNTPmix, 1mM MgCl₂, 1 fMol vetor pET 3a + *BTx-I* (W77H) linearizado, 2,5U de Taq DNA Polimerase – (Platinum-Promega) completando-se o volume com água estéril para 50μl. A reação inicial ocorreu em miniciclador (Mastercycle Gradient - Eppendorf) onde foi efetuado o programa REC1, que consistiu dos passos:

- 1 – 96°C por 5 min,
- 2 - 96°C por 2 min,
- 3 - 50°C por 90 s,
- 4 – 72°C por 2 min, com 25 ciclos repetidos a partir do passo 2.

O fragmento com o tamanho específico para cada mutação gerada foi analisado e extraído do gel de agarose 2%, com posterior purificação com Kit GeneClean (Q-BIOgene).

Segunda Etapa: chamada de reação de extensão, pois consiste em estender e completar a seqüência do fragmento de DNA mutado gerado na etapa 1. Fez-se a reação com 1mM MgCl₂, 1X tampão de PCR, 2,5mM dNTPmix, 2,5U de Taq DNA polimerase, 1 fMol de vetor pET3a + *BTX-I* linearizado, 1 pMol do fragmento mutante amplificado na primeira etapa, completando-se o volume final para 50μl com água estéril. A reação foi colocada novamente no miniciclador e agora utilizando o programa EXT para a extensão do DNA, que consistiu em.

- 1 - 96°C por 2min,
- 2 – 96°C por 1min,
- 3 – 55°C por 30 s e 72°C por 1 min, sendo os ciclos repetidos 5x a partir do passo 2.

Terceira Etapa: é a reação pela qual é selecionada e amplificada somente a fita de DNA híbrido que contenha a mutação, utilizando para tanto o oligo **EXT2** que é complementar a uma porção de **EXT1**. Na reação adicionaram-se dois oligos: 20pMol de EXT2 (5'-terminal) e 20pMol de EXT3 (3'-terminal), quando posteriormente seguimos novamente o programa de amplificação descrito na primeira etapa.

O fragmento de 520 pb foi extraído e purificado em gel de agarose 2% com Kit GeneClean (Q-BIOgene). A amostra foi então digerida com enzimas *XbaI* e *BamHI* (10 U cada) por 1h e 30 min a 37°C e inativação das enzimas foi feita submetendo-as a uma temperatura de 65°C por 15 min. Analisou-se o fragmento de 420 pb em gel nativo de agarose 2%, com posterior extração do fragmento com o Kit de extração Kit GeneClean (Q-BIOgene), e quantificação em biofotometro (Eppendorf).

2 - Preparação dos vetores pT7T3 e pET3d

O vetor pT7T3-18U (Amersham-Pharmacia) é um vetor pequeno de 2883 pb que contém um sítio múltiplo de clonagem (SMC), além de possuir uma cópia do gene para LacZ.

O vetor pET3d (Studier e Moffatt, 1986; Rosenberg et al., 1987; Studier et al., 1990) possui uma seqüência promotora forte para o fago T7 e inclui sítios de restrição para as enzimas *BamHI* e *XbaI*, além de apresentar um marcador seletivo para resistência a ampicilina.

Os vetores foram digeridos com enzimas de restrição *Xba-I* e *Bam-HI* (10 U cada) em tampão OPA (One-Phor-All: 10 mM acetato de magnésio e 50 mM acetato de potássio pH 7.5). Incubando-se à 37°C por 3 h. Os vetores digeridos foram aplicados gel de agarose 0,8%, e posteriormente cortou-se a banda do vetor correspondente a forma linear digerida, e purificou-se com kit GeneClean (Q-BIOgene) e quantificado em biofotometro (Eppendorf).

3 - Ligação do gene mutado ao vetor pT7T3.

Foi utilizado para uma reação total de 20µl, 4 µl do tampão 5X de T4 DNA ligase (Tris-HCl 250 mM, MgCl₂ 50 mM, ATP 5 mM, DTT 5 mM e 25% peso/volume de polietileno glicol-8000), 1 µL da enzima T4 DNA ligase e o fragmento mutado juntamente com o vetores pT7T3 na proporção 3:1 (fragmento:vetor). Completou-se o volume com água autoclavada, incubando-se por 5 min a 45°C para separação das extremidades coesivas do vetor as quais poderiam ser aneladas, e posteriormente acrescentou-se a enzima, e então a amostra foi submetida à temperatura ótima de ação da T4 DNA ligase de 14°C por 12 horas.

4 - Transformação e Seleção do gene *Btx-I* ligado em células competentes de DH5a de *E. coli*

Realizou-se uma transformação padrão para introdução do plasmídeo pT7T3 + *Btx-I* dos mutantes *E. coli* linhagem DH5α (Sambrook, *et al.*,1989). Para tanto necessitou-se da preparação de células competentes de DH5α, as quais foram multiplicadas lançando-se uma placa em meio LB (Tryptôna 0,5%, NaCl 1%, extrato de levedura 0,5%), dexando-as crescer durante a noite à 37°C. Posteriormente lança-se algumas colônias em tubos contendo 5 ml de LB, durante 12 h sob agitação de 180 rpm, à 37°C para crescimento do pré-inóculo. Retira-se 2 ml para análise do crescimento das bactérias, e inocula-se novamente os 3 ml em culturas de 500ml de LB, deixando-se sob agitação de 180 rpm durante 2 à 3 horas até que a densidade ótica de cultivo atinja o OD₆₀₀ 0.3. Transfere-se a cultura para tubos de polipropileno, incubando-os então por 5 min no gelo. Centrifuga-se por 10 min à 3.000 g (Sollvall 5C 5B) em 4°C. Após descarte do sobrenadante, o sedimentado foi ressuspensionado em 100 mL de tampão gelado de Ca²⁺/glicerol (CaCl₂ 60 mM, PIPES – 1,4-Piperazin-bis-(ethansulfonsaeure) - 10 mM, glicerol 15%). Repetiu-se a etapa de centrifugação e as células ressuspensionadas em 100ml do tampão Ca²⁺/glicerol, e incuba-se no gelo por 30 min.

Novamente centrifuga-se por 10 min à 3.000 rpm_s em 4°C e ressuspende-se em 12 ml do tampão gelado. Foi então distribuído em alíquotas de 50µl e estocados à -70°C.

Para a transformação das células com vetor, juntamente com o controle positivo (pT7T3 + *Btx-I*, forma nativa) e negativo (pT7T3 sem inserto), utilizou-se estas células competentes de DH5α, juntamente com 10µl do gene mutado ligado ao vetor pT7T3, 20 mM de MgCl₂ e 10 mM de CaCl₂, completado o volume da reação para 100 µl com água estéril. Incubou-se a mistura no gelo por 20 min, e posteriormente submeteu-a a um choque térmico por 10 min. a temperatura ambiente. Adicionou-se 1 mL de meio LB (Tryptôna 0,5%, NaCl 1%, extrato de levedura 0,5%), deixando regenerar por 1 h a 37°C sob agitação de 200 rpm. Centrifugou-se a 2000 rpm por 1 min, descartando-se 900 µL do sobrenadante e ressuspendeu-se as células com 200 µL de LB restante.

Posteriormente lançou-se as células transformadas em placas de meio LB sólido contendo 100 µg/mL de ampicilina, 400 µg/mL X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídio), 500 µg/mL de IPTG (isopropil-tio-β-galactosídio) para seleção do plasmídeo pT7T3+*Btx*. O vetor pT7T3 possui uma cópia do gene para LacZ o qual codifica βgalactosidase, capaz de degradar X-gal produzindo um fenótipo azul para colônia. Quando o gene de *Btx-I* é incorporado ao vetor nos dos sítios de restrição das enzimas *Bam*HI e *Xba*-I, o gene do LacZ é interrompido, deixando de produzir βgalactosidase e conseqüentemente temos um fenótipo branco para a colônia.

5 - Extração do DNA mutante de células DH5a de *E. coli*

Após crescimento de 12 horas dos transformantes, inoculou-se uma colônia com fenótipo branco em tubos contendo 3 ml de meio LB e antibiótico ampicilina (100 µg/mL), deixando-se crescer por 12 h. A cultura foi centrifugada por 1 min à 12000 g, com posterior descarte do sobrenadante. O sedimentado foi ressuspendido em tampão GET (Tris 25 mM

pH 8,0; glicose 50 mM; EDTA 10 mM), adicionando-se 200 µL de solução de lise (NaOH 0,2 N e SDS - dodecil sulfato de sódio, lauril sulfato de sódio, pH 7,2) e 150 µL de 3M de acetato de potássio. A amostra foi centrifugada por 10 min à 12000 g, transferindo o sobrenadante para tubos limpos. Acrescentou-se 1 mL de etanol absoluto, deixando à -70°C por 15 min. Novamente centrifugou-se por 5 min à 12000 g, com descarte do sobrenadante. Adicionou-se 1 mL de etanol 70% e centrifugou-se por 5 min à 12000 g, deixando o sedimentado secar totalmente a temperatura ambiente. Posteriormente foi ressuspendido em 100 µL de RNase (200µg/mL) e incubou-se à 37° C por 3h. Assim foi adicionado 50 µL de fenol equilibrado (Tris -HCl, pH 8,0), centrifugando por 2 min à 12000 g retirando a fase aquosa. A precipitação do DNA foi realizada adicionando-se 10% do volume da amostra com acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 2,5 X o volume da amostra com etanol absoluto gelado, deixando por 15 min a -70° C. Posteriormente centrifugou-se por 10 min à 12000 g com descarte do sobrenadante, e o sedimentado foi lavado com 1 mL de etanol 70%. Após centrifugação e descarte do etanol, deixou-se o precipitado secar e então ressuspendeu-se em 20 µL de TE (Tris10mM pH8,0, EDTA 1mM).

6 - Seqüenciamento de nucleotídeos de DNA.

Após extração do DNA plasmidial foi realizado as reações para seqüenciamento automático (Seqüenciador ABI 377-18) utilizando-se o kit (ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reacton, com AmpliTaq DNA Polymerase, FS – *Perkin-Elmer*). Misturou-se 1µl de solução “Big Dye” (mix contendo; finalizador A-Dye marcado com dicloro[R6G], finalizador C-Dye marcado com dicloro[ROX], finalizador G-Dye marcado com dicloro[R110], finalizador T-Dye marcado com dicloro[TAMRA], desoxinucleosídeos trifosfatos (dATP, dCTP, dITP e dUTP), DNA polimerase AmpliTaq, com pirofosfatase termoestável.) 3µl de tampão 2.5X (200mM Tris, 5mM MgCl₂, pH 9,0), 200ng de DNA, 3-5

pMoles do iniciador para seqüenciamento opcional 5' ou 3' do gene, completando o volume final de 10µl com água estéril.

Em seguida a solução foi deixada sob as seguintes condições em termociclador; **1-** 96°C por 2min., **2-** 96°C por 30 segundos, **3-** 50°C por 15 segundos e **4-** 60°C por 4min. Este ciclo de 2 a 4 foi repetido 40x, em seguida, após o final da polimerização, a temperatura foi estabilizada a 10°C. As amostras foram precipitadas e lavadas, para isso transferiu-se o volume das reações para recipientes de maior volume (1,5ml), onde foram adicionados 80µl de isopropanol 75%, misturou-se e deixou-se incubando por 15 min. a temperatura ambiente. Fez-se uma centrifugação por 20 min a 12000 g e descartou-se o sobrenadante e ao sedimentado foi adicionado 1 mL de etanol 70%, centrifugou-se novamente por 10min a 12000 g descartando-se novamente o sobrenadante e o sedimentado foi deixado secar por alguns minutos, sendo ressuspensionado em 4µL de tampão "Loading 2x formamida" (10X TBE, 90% formamida e 0.5% azul de bromofenol), e incubado a 96°C por 2min., sendo as amostras foram aplicadas em gel de seqüenciamento padrão 4,25% (18g uréia, 5,3mL acrilamida 40%, 0,5g de resina, 5ml TBE 10X, 250µl APS 10% e 35µl de TEMED), sendo analisadas, após corrida durante 12hs no seqüenciador automático ABI 377-18.

7 – Subclonagem dos genes recombinantes mutados ao vetor de expressão pET3d

Os genes contendo as mutações desejadas, verificadas através de seqüenciamento automático foram digeridas com enzimas *Xba*-I e *Bam*HI, e subclonados em vetor pET3d seguindo os mesmos protocolos descritos para o vetor pT7T3.

Para certificar-se que a ligação entre o vetor e o fragmento mutante de 420 pb ocorreu corretamente foi realizado uma reação de digestão com as enzimas *Xba*I e *Bam*HI (10 U cada). Novamente foi determinado a seqüência de nucleotídeos para validação da mutação definitiva.

8 - Expressão e Purificação de BthTX-I

8.1 - Transformação rápida de *E. coli* linhagem BL21[DE3]pLysS

Células hospedeira da linhagem de *E. coli*, BL21[DE3] (pLysS) foram dispersadas em uma placa de petri, que cresceu por 12 h em meio sólido seletivo HDM (1,5% de ágar, 15g de triptone, 25g de levedura e 10mM de MgSO₄, pH, 7,5 e água) com cloranfenicol (34µg/ml).

Posteriormente foram dispersadas de 2 a 3 colônias de bactéria em tampão de transformação TFB (200µl) gelado, deixando-se incubar por 15 minutos no gelo, repetindo 2 vezes a adição de 3,5% de DnD (acetato de potássio 10 mM pH7,5; DMSO 90%; DTT 1M) (7µl para cada 200µl de tampão) com incubação por 10 minutos. Posteriormente foram adicionados a solução contendo plasmídeo 1µg do DNA em volume ≤20µl, incubando no gelo por 30 min, com posterior choque térmico de 42°C por 2 minutos, deixando as células resfriando no gelo por dois minutos. Assim, foram adicionados em seguida 0,8ml de meio SOB incubando-as por 30 min. à 37°C sob agitação moderada para que ocorra a regeneração. Em seguida inoculou-se as células em placa de petri com meio HDM sólido seletivo (34µg/ml de cloranfenicol, 100µg/ml de ampicilina e 1,5% de ágar).

8.2 - Expressão da proteína recombinante .

Um pré inóculo foi preparado por inoculação em 3 ml de meio líquido HDM seletivo (100 µg/ml de ampicilina e 34µg/ml de cloranfenicol), deixando crescer por 12 h sob agitação e temperatura constante. Após o crescimento destes pré-inóculos, foram transferidos à volumes de 500 ml de meio líquido seletivo HDM, deixando-os crescer sob agitação de 180 rpm à 37°C até que atingiram o OD₆₀₀ ente 0.4-0.6. Fez-se então a indução da expressão da proteína com IPTG 600µM, e uma dose reforço de 150 µg/ml de ampicilina, incubando-as por aproximadamente 8h em agitação e temperatura constante. Posteriormente as culturas foram

centrifugadas a 5000 g (centrífuga Sorvall 5C 5B) desprezando-se o sobrenadante e guardando o sedimento à -20°C.

8.3 - Renovelamento de Bothroptoxina - I recombinante

Durante a expressão são formados agregados da proteína recombinante de baixa solubilidade denominados corpos de inclusão (CI), localizados no citoplasma da célula hospedeira. Portanto, para solubilização da proteína foi necessário o rompimento das células para liberação destes corpos. Com a proteína solubilizada foi utilizado um processo de renovelamento para atingir a conformação nativa correta de BthTx-I.

O sedimento de células da cultura de 500 ml foi tratado com tampão de lise (50 mM Tris pH 8,0, 20 mM EDTA, 0.5% Triton X-100) e então fez-se três repetições de sonicação (60 Sonic Desmenbrator Fisher Scientific) e centrifugação, até que ocorresse a lise completa das células e a liberação dos corpos de inclusão. Estes CI foram então guardados à -20°C.

O processo de renovelamento iniciou-se com a lavagem dos corpos de inclusão com 3M de uréia, 50 mM de Tris-HCl pH 8,0 e EDTA 20mM, incubando por 1h à 55°C. Após centrifugação, o sedimento fora homogeneizado com 4,8M de tiocianato de guanidina pH 8,0 e 25 mM de NTSB (2-nitro-5-(sulphotio)-benzoato) por 1 h, para adicionar grupos de $-SO_3^-$ às cisteínas reduzidas, aumentando a solubilidade da biomolécula (**Figura 21**).



Figura 21: Esquema ilustrativo da desnaturação e modificação química de proteínas sob a forma de corpos de inclusão.

A proteína modificada foi submetida a uma filtração em colunas contendo Biogel P6 (exclusão molecular de 1000 - 6000) 6,2 x 5 cm, previamente equilibrada com 2M de hidrocloreto de guanidina, 20 mM de Tris e 2 mM de EDTA de pH 8,0, para retirar o excesso de NTSB. A amostra obtida de aproximadamente 1,5 ml foi adicionado 25 mM Tris-HCl, 10 mM cistina e 80 mM cisteína pH7,5 e incubou-se por 1h, posteriormente completou-se o volume para 2 ml com Tris-HCl 25 mM pH 7,5 e deixou-se por mais 1h. O renovelamento da proteína foi completada na presença de resina de acrilamida (Biogel P6) equilibrada com o tampão 20mM Tris pH 7,5, 0,3 M hidrocloreto de guanidina, 3mM cisteína oxidada e 6mM cisteína reduzida. Para evitar a formação de agregados, as proteínas foram deixadas sob agitação moderada por aproximadamente 40h à 25°C.

8.4 - Purificação da Proteína em Cromatografia de Troca Catiônica.

A cromatografia de troca catiônica pode ser conceituada como um método físico-químico de separação controlada pela variação do pH e força iônica, no qual os constituintes da amostra a serem separados são particionados entre duas fases, uma estacionária (a matriz da resina) e a outra móvel que percorre através da primeira. No processo utilizou-se uma coluna de dimensões 2 x 10cm previamente empacotada com resina SOURCE 15S (Amersham-pharmacia). Essa resina é fortemente catiônica e sua matriz apresenta grupos metilsulfonato. A cromatografia foi realizada em HPLC (Shimadzu), sendo a proteína injetada na coluna em alíquotas de 50 ml e eluída em um gradiente linear de NaCl, com fluxo de 1 mL.min⁻¹, previamente programado para uma subida de 0 a 100% do tampão salino em 20 min, sendo a detecção realizada por absorção de luz ultravioleta em 280 nm.

Os cromatogramas do perfil de eluição das proteínas mutantes foram comparados com os cromatogramas da proteína purificada do veneno da cobra. As proteínas purificadas foram então dializadas em tampão Tris-HCL 5 mM pH 7,5 por 48 horas e concentradas no liofilizador para posterior quantificação e análise em gel SDS-PAGE 16%.

8.4.1 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida.

A eletroforese é um dos métodos mais convenientemente utilizados para a separação e análise qualitativa de moléculas. O gel mais comum para proteínas é o de poliacrilamida (PAGE) com SDS (dodecilsulfato de sódio) adicionado. O gel é composto por polímeros intercalados de acrilamida e bisacrilamida para formar fina malha cruzada dos compostos, e uma vez que suas cargas estão igualadas negativamente pelo SDS, as proteínas são separadas pelo seu peso molecular. Assim, as moléculas peptídicas menores atravessam a malha mais rapidamente que as de maior tamanho em direção ao pólo positivo do campo elétrico.

Para análise em gel de poliacrilamida das proteínas mutantes foi feito um gel de 16% não desnaturante, no qual foi preparado por polimerização de uma mistura de acrilamida/bisacrilamida na razão 29:1, em uma tampão (0.3M Tris-HCl, pH 7-8.8), com 0.05% de persulfato de amônio + 0.007% TEMED. A polimerização foi feita em cuba de eletroforese, e as amostras das proteínas submetidas a um campo elétrico de 30 V. A corrida durou em torno de 2 h e no fim do processo o gel foi corado com Comassie Blue para a visualização das frações eluídas da coluna de cromatografia.

9 - Quantificação das proteínas recombinantes e análise da estrutura secundária utilizando Dicroísmo Circular.

A análise de moléculas quirais em solução pode ser realizada a partir de espectros de dicroísmo circular (CD). Esta técnica é extremamente sensível à assimetria quiral do sistema. O CD é definido como a diferença de absorção A , obtida entre a polarização circular da luz para a esquerda e para a direita .

$$CD = A_e - A_d \quad (31)$$

O sinal de CD é verificado em comprimentos de onda em que a amostra absorve fótons. Dependendo da orientação das moléculas na amostra e da transição eletrônica que está

sendo estudada, o sinal pode ser positivo ou negativo (D ou L). O espectro de CD nas regiões do UV distante (abaixo de 250 nm) é usado para avaliação da estrutura de proteínas, pois a estrutura secundária e a consequência de ângulos de rotação livre das ligações da cadeia principal que resulta em orientações definidas dos resíduos vizinhos, gerando sinais de CD específicos. Estes sinais são utilizados como fonte de análise comparativa de estruturas secundárias de diferentes proteínas.

O ensaio foi feito utilizando amostras das proteínas com fator de diluição de 40 vezes em tampão contendo 20 mM HEPES, com um espectropolarímetro Jasco 810, e cubeta de quartzo 0,1 mm. Assim, foi realizado a média de 3 medidas de espectro, e após a subtração do branco, a quantificação da proteína foi realizada preparando uma curva padrão de espectros de CD, mostrada na **Figura 22**. Foi feita várias concentrações de BthTx-I (10 à 500 µg/ml) medindo a elipticidade correspondente. Utilizando o cálculo:

$$C_{\text{proteína}} = [(\theta_{222} + 0,1751) / -0,0137] * \text{fator diluição} \quad (32)$$

Foi medido a elipticidade em 222 nm e assim calculamos a concentração de proteína

na amostra.

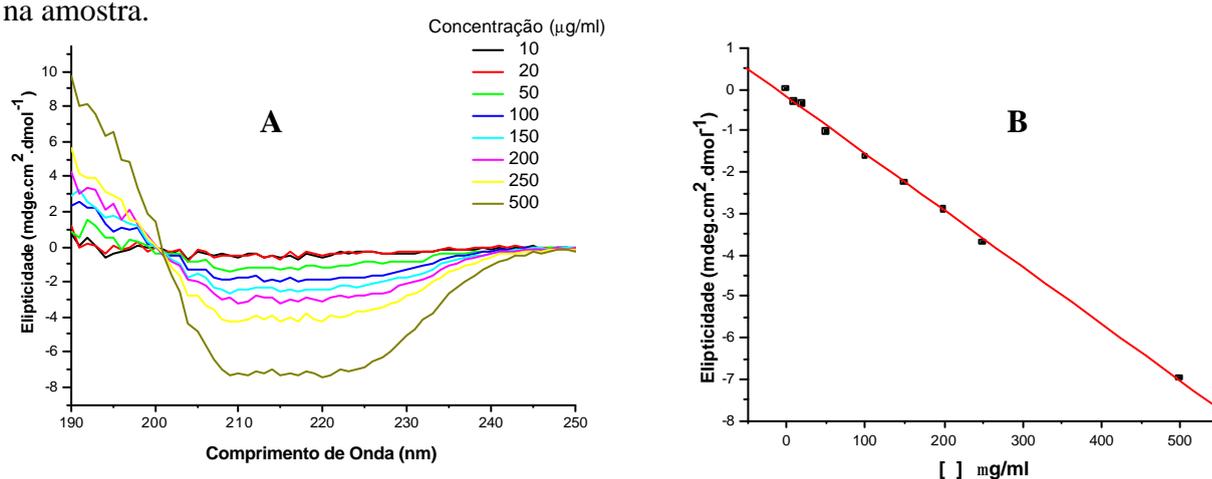


Figura 22: Espectros e Gráfico padrão da proteína nativa de BthTx-I. Em **A** os espectros da proteína nativa em uma faixa de concentração de 10 à 500 µg/ml e em **B** a curva padrão obtida destes espectros em θ_{222} .

10 - Atividade bactericida.

Para as condições de crescimento foram utilizados meio LB (10 mM de Na₂HPO₄, 1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, pH 7,4) e temperatura a 37°C. Uma curva padrão de crescimento foi feita para avaliar o número de unidades formadoras de colônia (CFU)/mL correspondente à densidade óptica de 0,7 em 660 nm. As células de *E. coli* foram lançadas em meio sólido e incubadas a 37°C durante a noite. Após 24 h, 5 ml de meio LB foram inoculados com duas a três colônias e mantidas sob agitação a 150 rpm, 37°C por 12 h. Posteriormente, 1 mL da cultura de bactérias foi disperso em 50 mL do meio específico, (diluição 1: 50), o qual foi mantido sob agitação a 180 rpm na temperatura descrita, até atingir a densidade óptica de 0,7 em 660 nm. Estas células foram diluídas no tampão descrito, e ajustadas para 4 x 10⁶ CFU/mL, 100 µl desta suspensão de células contendo 4 x 10⁵ CFU/mL foram incubadas com concentrações variáveis entre 0 e 130 µg/mL de BthTx-I e mutantes, por 2 h a 37°C. Após o término desse período, utilizou-se a técnica de diluição em placas e as bactérias sobreviventes foram contadas após o crescimento de 12 h em placa de petri com LB sólido. (Páramo *et al*, 1998). A **Figura 23** representa o esquema ilustrativo do ensaio bactericida.

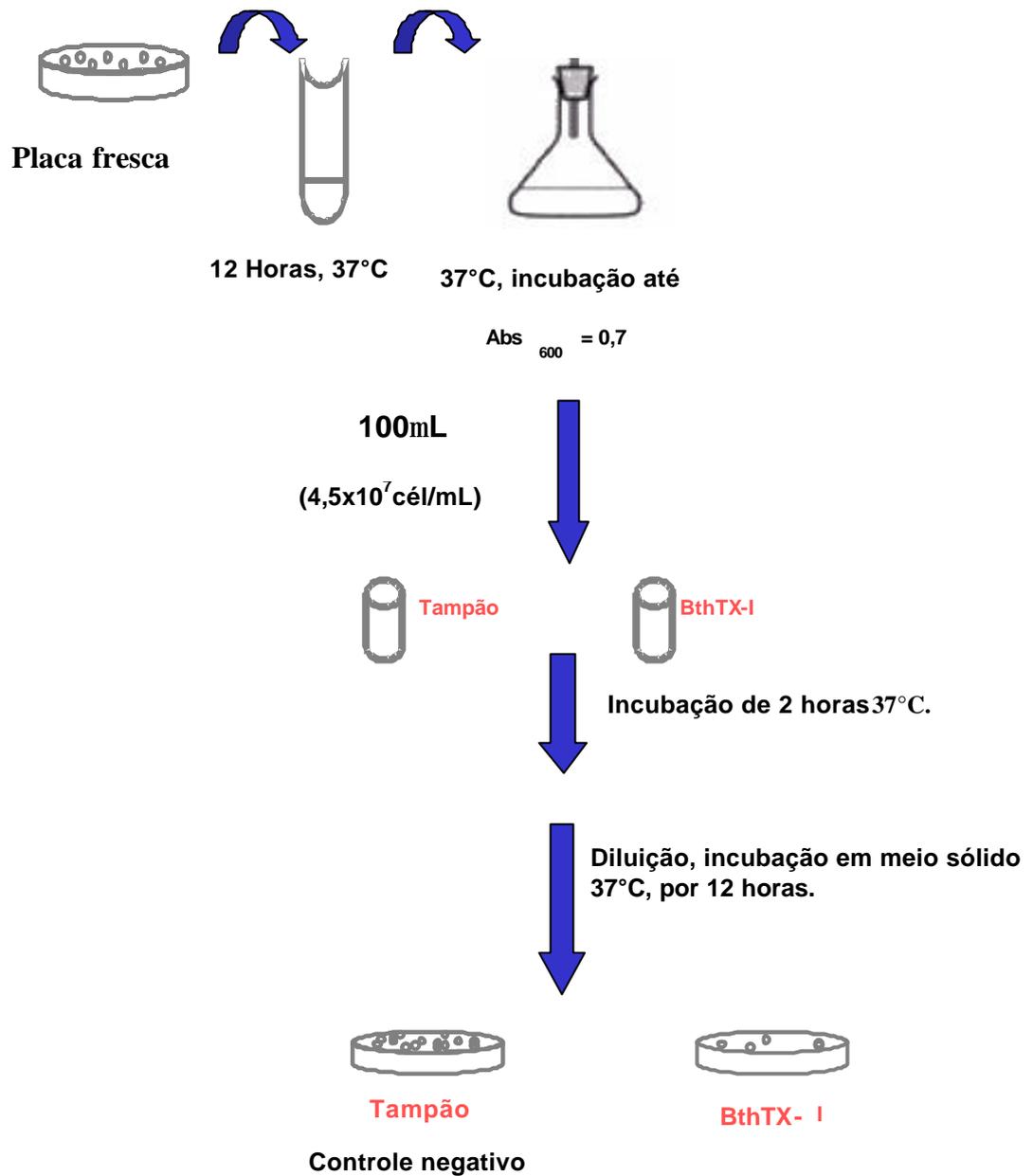


Figura 23: Esquema ilustrativo do ensaio bactericida. Considere tampão como controle negativo experimental (CFU = 100%).

11 – Teste de Atividade Sobre Lipossomos Encapsulados.

11.1 - Preparação dos lipossomos.

Para a preparação de lipossomos foi adotada a técnica desenvolvida por Skoza e Papahadjopoulos em 1978, denominada de evaporação de fase reversa. Essa técnica permite a manipulação da composição fosfolipídica da bicamada do lipossomo, possibilitando variar o tipo e a proporção das cargas existentes na mesma. Utilizaram-se frações molares de lipídios DPPC – 1,2 dipalmitoil fosfatidilcolina /DMPA -1,2 - Dimiristoil-sn-3-fosfato (90% de DPPC/10% DMPA e 50% DPPC/50% DMPA) dissolvidas em éter (5mg/ml) e, em seguida, submetida à secagem por evaporação. Nesta etapa os lipídios ficam aderidos na forma de um filme desidratado à parede do balão de secagem.

Posteriormente, foram adicionados mais 1,0 ml de éter para dissolver os lipídios, e em seguida foram adicionados 1,0 ml de solução tampão TP. Foram sonicados (60 Sonic Desmenbrator Fisher Scientific) no gelo por 2 min (com potência mínima) resultando na formação de uma emulsão, e então a solução foi encapsulada dentro de "micelas reversas" numa suspensão em éter. A fusão dessas micelas reversas foi induzida por uma evaporação lenta do éter (evaporador rotativo Tecnal), resultando na reversão da fase, como ilustrado na **Figura 24**. A mistura foi então incubada em banho a 45° C por 2h produzindo lipossomos unilamelares. A filtragem dos lipossomos em membrana de policarbonato (400nm), produziu populações homogêneas de lipossomos com diâmetro definidos.

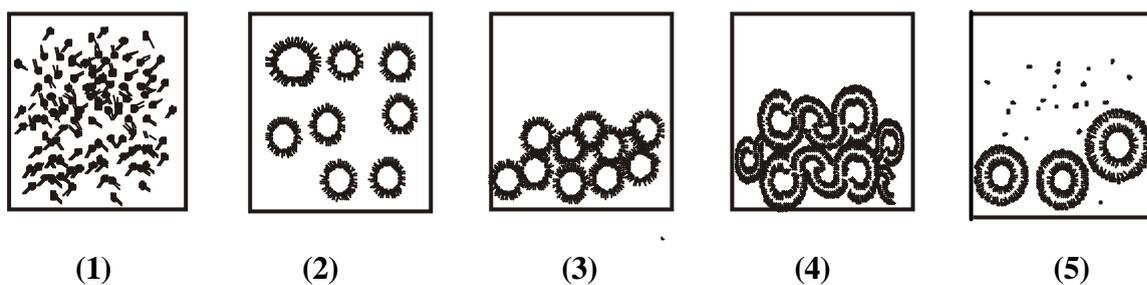


Figura 24: Ilustra a formação de lipossomos pelo método de evaporação de reverso de fase de Szoka e Papahadjopoulos. Os lipídios são dissolvidos em solventes (1), após a localização na superfície e a adição do tampão calceína eles formam micelas em fase reversa (2). Com a sonicação do homogeneizado inicia-se a formação dos lipossomos pela fusão entre as micelas (3 e 4). Após filtragem são obtidos os lipossomos de 400nm de diâmetro (5).

11.2 - Preparação dos lipossomos encapsulados com calceína.

A calceína (PM: 622,5) é um composto auto-supressor com comprimento de onda de excitação (495nm) próximo ao seu comprimento de onda de emissão ($\lambda_{ex} = 520\text{nm}$). Assim, em altas concentrações, a emissão de uma molécula fluorófora pode excitar uma outra próxima (auto-supressão), diminuindo a emissão de fluorescência (**Figura 25**).

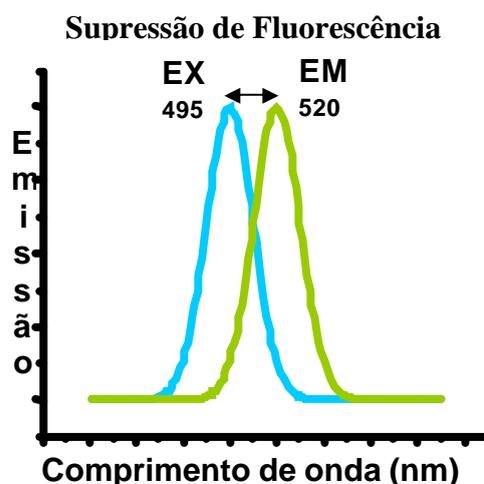


Figura 25: Esquema dos espectros de excitação e emissão de calceína.

Para produção dos lipossomos encapsulados com calceína adotou-se o mesmo protocolo descrito na seção 11.1, porém adicionando no tampão TP 50 mM de calceína. A solução contendo os lipossomos com 400 nm de diâmetro foi então filtrada em coluna formada por uma matriz de sefarose 6B, para separar as estruturas intactas contendo solução encapsulada com fluoróforo calceína, e a solução restante de calceína que não conseguiu encapsular.

11.3 – Medida do tamanho da partícula.

Após testes de atividade com lipossomos de tamanho variando de 200 a 600 nm, constatou-se uma atividade máxima sobre lipossomos de 400 nm. Assim, para medir o tamanho e distribuição das partículas foi utilizado um equipamento de espalhamento dinâmico de luz Zetasizer 3000HS_A da Malvern Instruments. A amostra foi diluída em tampão TP a uma concentração apropriada para análise à 25°C com um ângulo de detecção de 90°, sendo o diâmetro médio obtido diretamente do instrumento.

11.4 - Dosagem de fosfato dos fosfolipídios.

A dosagem de fosfato (Barlett, 1959) é muito sensível e permite a avaliação na faixa de 0,1 a 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de PO_4 . Amostras de lipossomo (10, 20 e 30 μl) foram fervidas a 100°C em ácido perclórico 70% por 5 minutos. Após o resfriamento, foram adicionados 4,2 ml de água, 200 μl de molibdato de amônio (Merck) 5% (Sigma) e 200 μl de diaminofenol (Sigma) 1% em bissulfito de sódio 20% (Sigma). A solução foi agitada e deixada em banho de água fervente por 7 minutos. Leu-se a absorbância em 830nm em cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico em espectrofotômetro Hitach U-2000. A curva padrão de fosfato foi feita com amostras contendo 0, 2, 4, 6, 8 e 10 μg de Na_2HPO_4 .

11.5 - Teste de liberação de calceína.

As amostras das proteínas mutantes de BthTx-I foram diluídas para o teste de liberação de calceína na proporção molar de 1:400 de fosfolipídios. A emissão do fluoróforo foi detectada em espectrofluorímetro (SLM 8100C – Spectronic Instruments) com comprimento de onda em 520nm. O ensaio iniciou-se com a diluição dos lipossomos no tampão TP, e após 20 s foi adicionada a proteína. A atividade de danificação dos lipossomos foi acompanhada pela liberação de calceína com aumento na emissão e ocorreu em 170 s, quando foi adicionado 0,5% de Triton-X100 para lise completa de 100% de liberação (**Figura 26**).

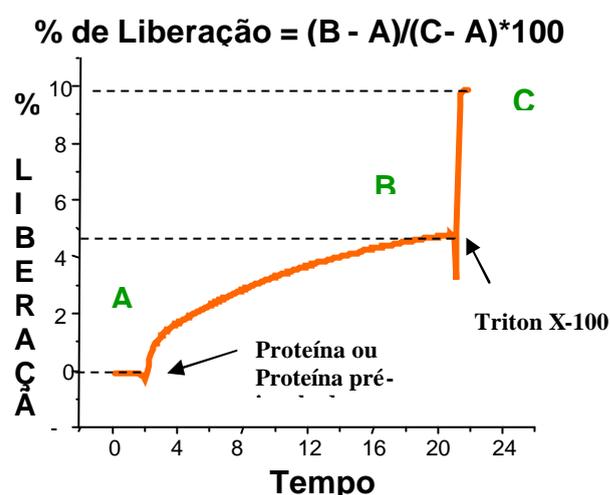


Figura 26: Esquema do ensaio de atividade de danificação de lipossomos.

Perfil da liberação de calceína provocada pela adição da proteína em 20 s e da liberação máxima de calceína provocada pela adição de TRITON X-100 em 170 segundos em um total de 200 segundos de ensaio.

Antes da adição da toxina o sinal de emissão da calceína é baixo dado à alta concentração interna nos lipossomos, ocorrendo o fenômeno da auto-supressão. Com a adição da toxina começa ocorrer a desestabilização da bicamada com liberação e diluição do

fluoróforo. Portanto, observa-se um aumento gradual do sinal de emissão, sendo o mesmo finalizado em 200 segundos quando ocorre a adição do detergente Triton - X100 liberando toda a calceína encapsulada.

11.6 – Avaliação da afinidade das proteínas para lipossomos.

Com intuito de avaliar a afinidade de cada proteína, quando associada com os lipossomos (10% ou 50% DMPA), incubou-se cada toxina por 5 min com lipossomos sem calceína na proporção molecular de 1:200. Posteriormente seguiu-se o teste de atividade como descrito anteriormente, sendo que em 20 s adicionou-se a toxina pré-incubada com lipossomos. A proporção molecular de proteína para fosfolipídio encapsulado com calceína na cubeta também foi de 1:200, atingindo assim uma proporção final de 1:400, para uma liberação ao longo de 200s.

12 - Avaliação da associação das proteínas com lipossomos após ultracentrifugação e análise em gel SDS-PAGE.

As proteínas foram incubadas por 10 min com lipossomos com 10% e 50% de carga negativa em tampão TP na razão molar de toxina para lipídio de 1:400, e então ultracentrifugadas em Beckman XL-100K por 1h à 100.000 g . O sobrenadante foi separado, e o sedimento ressuspenso no mesmo tampão. Ambas as amostras foram fervidas por 10 min em β -mercaptoetanol e aplicadas em gel SDS-PAGE 17%. A eletroforese durou 2 horas sob voltagem de 300 V e o gel foi revelado com prata.

13 – Estudos sobre a cinética de atividade danificadora Ca^{2+} -independente de BthTx-I em associação com lipossomos através de Stop-Flow.

Com intuito de avaliar as alterações nos microambientes de cada triptofano durante a atividade de danificação Ca^{2+} -independente, foram medidas as cinéticas de modificação do triptofano de cada proteína mutante durante sua interação com lipossomos com N-bromo-succinamida (NBS) (**Figura 27**).

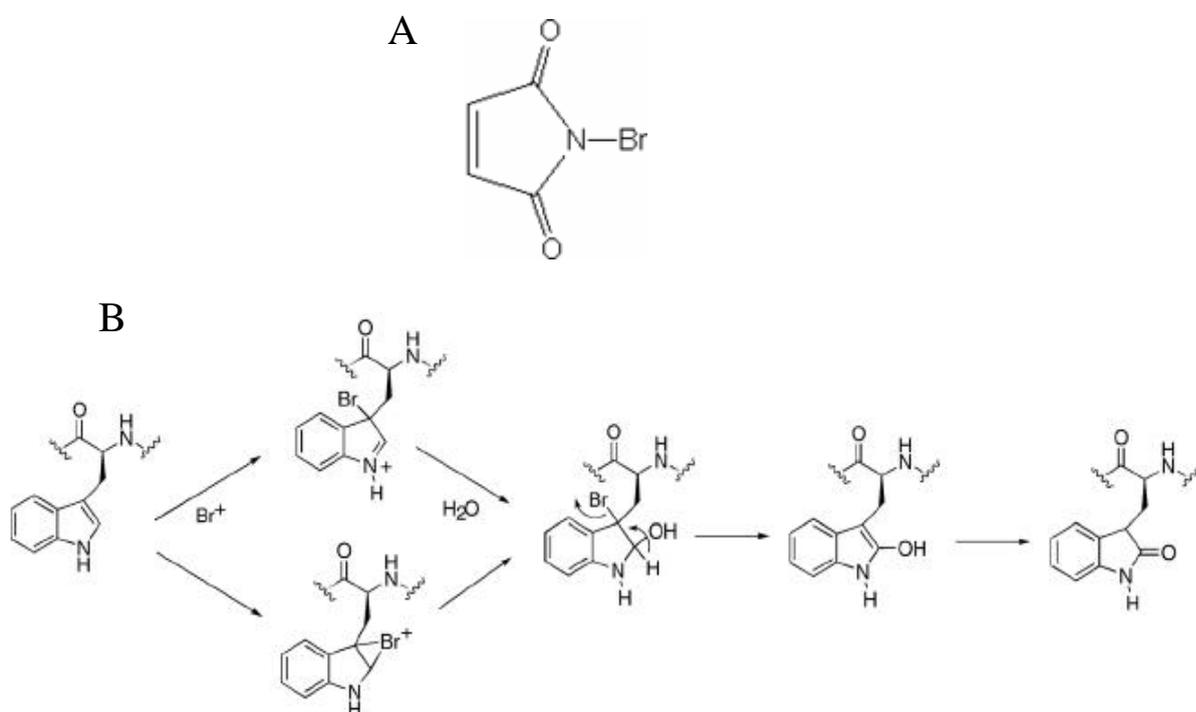


Figura 27: Mecanismo de oxidação do triptofano por NBS sugerido por Tsai *et al*, 2006. (A) Molécula de Nitrobromo succinamida (NBS). (B) O ataque inicial do íon Br^+ , derivado do NBS, é seguido pelo ataque da água para produzir o 2-oxitriptofano não fluorescente.

O ensaio foi realizado no equipamento de “stopped-flow” (Applied Photophysics SX.18MV Leatherhead, Surrey, R.U.), utilizando 100 $\mu\text{g/ml}$ de proteína livre, ou incubada por 5 min com lipossomos 90% DPPC 10% DMPA ou 50% DPPC 50% DMPA na proporção

de 1:400 em 25 mM Tris-HCl e 150 mM NaCl pH 7,0. Depois de uma rápida mistura com 1 mM de NBS repurificado, a cinética de supressão do triptofano foi monitorada pelo decréscimo da emissão em 350 nm resultante da modificação química por um período de 50 à 100s na temperatura de 25° C.

Impurezas no NBS (cor amarela) pode iterferir nos resultados de modificação química, portanto se faz necessária a recristalização do composto. Em um erlemeimyer mantido constantemente em gelo foram adicionados cerca de 10 g de NBS e 125 ml de água até total solubilização da substância. Após precipitação, os cristais de NBS (branco) foram filtrados a vácuo e mantidos em estufa para eliminar o restante de água presente no composto.

14 – Medidas de associação de Bothropstoxina-I em monocamadas.

As medidas de cinética a tempos curtos foram determinadas usando um tensiômetro dinâmico pelo método da gota pendente, usando o método da análise do perfil eixo-simétrico da gota (ADSA) (Rotenberg Y, 1983), usando um tensiômetro automático (modelo OCA-20, da Dataphysics-Alemanha). A imagem de uma gota do líquido suspensa dentro de uma cubeta de vidro óptico contendo água para evitar a evaporação é gravada usando uma câmera CCD. O tempo do experimento é iniciado imediatamente após a formação completa da gota por meio da análise das imagens. A tensão superficial é determinada pela análise do perfil da imagem da gota por meio de software que acompanha o equipamento. Os dados obtidos a partir do formato da gota são adequados à equação de Young-Laplace:

$$\Delta P = (\rho_d - \rho_l) \cdot g \cdot h = (\gamma / R_1) + (\gamma / R_2) \quad (33)$$

Onde ΔP corresponde à diferença de pressão entre o interior e a parte externa da gota; $\rho_d - \rho_l$ são as densidades da fase líquida e do ar, respectivamente; g a aceleração da gravidade,

h a altura da coluna que contém a gota suspensa, e R_1 e R_2 os dois raios de curvatura da gota (ver **Figura 28**). O programa também calcula dois parâmetros básicos da gota como área e volume.

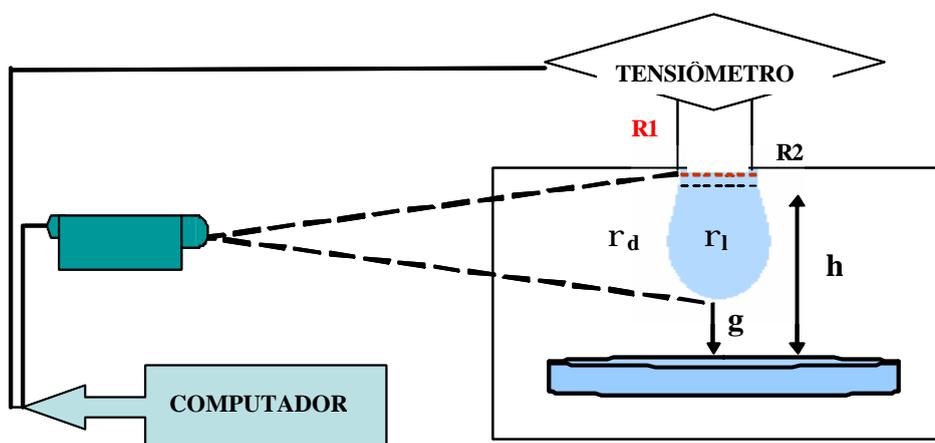


Figura 28: Esquema para análise da atividade de BthTx-I em monocamadas utilizando tensiômetro dinâmico pelo método da gota. Após a estabilização da pressão dos fosfolipídios na superfície da gota foi adicionado 6 ng/ml de proteína, e assim mediu-se as variações na pressão superficial.

Para as medidas de tensão superficial dinâmica, as imagens são registradas com a vídeo-camera a um mínimo de 200 imagens por minuto. Ao final do experimento, o programa retorna as imagens gravadas dos perfis da gota e calcula as mudanças de tensão superficial para cada ciclo (**Figura 28**). Para determinação das cinéticas de adsorção, estabeleceu-se um intervalo de tempo total de 1100 s, a fração de fosfolipídio utilizada foi de 90% de DPPC/10% DMPA com 6 ng/ml de proteína.

15 - Medida na Mudança dos Espectros de Emissão de fluorescência intrínseca do Triptofano de BthTx-I em associação com Lipossomos.

Os espectros de emissão foram realizados em espectrofluorímetro Spectronic SLM 8100C a 25°C e em cubeta de quartzo de caminho ótico de 1 cm. A excitação foi de 295 nm e emissão em 350 nm, utilizando polarizadores Glan-Thompson cruzados, abertura das fendas de excitação e emissão de 4 nm e voltagem da fotomultiplicadora de 600V. As amostras foram preparadas em tampão TP.

Os espectros das proteínas recombinantes foram medidos em uma concentração de 15 µg/ml na presença e ausência de lipossomos, sendo as proteínas incubadas por 5 min na proporção de 1:400 com lipossomos 90% DPPC/ 10% DMPA e 50% DPPC/ 50%DMPA e então medidos os espectros de emissão.

16 – Anisotropia de fluorescência intrínseca do triptofano.

Com o intuito de caracterizar a proteína mutante em solução utilizou-se o fenômeno de anisotropia que fornece dados sobre a diferença média angular que ocorre no fluoróforo entre a excitação e emissão dos fótons (Lakowicz, 1983). A isotropia é resultante da emissão de fluorescência polarizada pela fotoseleção dos fluoróforos em solução, devido a sua orientação ao plano do campo elétrico dos fótons de excitação. Quando ocorre uma emissão despolarizada tem-se o fenômeno de anisotropia.

16.1 - Medidas de anisotropia de BthTx-I mutada em associação com lipossomos.

A proteína na concentração final de 30 µg/ml foi incubada em tampão TP por 5 min juntamente com lipossomos de composição 90% de DPPC/10% DMPA ou 50% DPPC/50% DMPA. Posteriormente foi medida a emissão de 350nm usando polarizadores Glan-

Thompson cruzados, em espectrofluorímetro Spectronic SLM 8100C a 25°C, cubeta de quartzo de caminho óptico de 0,5 cm com excitação em 295nm. A abertura das fendas de excitação e emissão foram de 4 nm, a voltagem da fotomultiplicadora de 600V e filtro Schott tipo WG-320.

16.2 - Curvas de desnaturação de BthTx-I recombinante mutada.

O experimento de anisotropia baseou-se na monitoração da desnaturação protéica utilizando Hidroclorato de Guanidina (GdnHCl). Preparou-se amostras das proteínas mutantes na concentração de 30µg/ml, variando-se a concentração de GdnHCl de 0M à 8M em tampão TP com incubação de 24 horas a 25°C. Utilizou-se espectrofluorímetro Spectronic SLM 8100C a 25°C e em cubeta de quartzo de caminho óptico de 0,5 cm com excitação em 295nm e a emissão de 350nm usando polarizadores Glan-Thompson, a abertura das fendas de excitação e emissão de 4 nm e a voltagem fotomultiplicadora de 600V.

17 - Medidas de decaimento do tempo de vida por TCSCP.

Um laser de diodos, com dois feixes de 24 W emitindo em 809 nm, bombeia um laser de estado sólido (Nd: YVO4 - Millennia Xs - Spectra Physics) que emite em 1064 nm. O feixe passa por um cristal dobrador de frequências e o feixe final, com potência podendo chegar a 10 W e comprimento de onda igual a 532 nm, bombeia um laser de titânio-safira (Tsunami - Spectra Physics). O cristal de titânio-safira gera pulsos de laser (com largura de 5 ps) em uma banda que vai de 840 até 1080 nm, com frequência máxima de repetição dos pulsos igual a 82 MHz. Um filtro bi-refringente seleciona o comprimento de onda desejado para o feixe de saída. Passando por um sistema selecionador de frequências, esses pulsos de laser podem ter sua frequência dividida em até 8000 vezes, permitindo a operação na faixa de frequências entre 0,01 e 8MHz. Após o selecionador de pulsos, o feixe passa por um gerador de segundo e

terceiro harmônico, cujos comprimentos de onda do feixe na saída estão na faixa utilizada para excitação das amostras proteicas, que vai de 280 até 330 nm.

As proteínas recombinante e mutantes de BthTx-I contendo 1,73 mg/ml em tampão TP foram colocadas em cubetas de quartzo com caminho óptico de 0,5 cm. A temperatura foi mantida por um banho térmico (Julabo) em torno de 25 °C, e a concentração da proteína de 1.73 mg/ml, excitação em 298 nm e emissão em 350 nm.

18- Medidas de decaimento do tempo de vida pelo método harmônico.

Os dados de decaimento de tempo de vida de fluorescência e anisotropia foram obtidos no Laboratório Nacional de Luz Sincotron (LNLS) empregando a linha DO5B-VUVF. Foi utilizado o fluorímetro ISS K2 com excitação em 296 nm, com uma faixa de frequência modulada de 8 à 200 MHz, com caminho ótico de 1cm e β -terfenil usado como referência. A concentração de proteína utilizada foi de 1,73 mg/ml em tampão TP. A análise dos dados foi feita no programa VINCI – ISS e os valores adotados para $d\phi$ e dm foram de 0,2 e 0,004 respectivamente.

19 – Simulações de Dinâmica Molecular.

O cálculo do fator de orientação para os triptofanos de BthTx-I e mutantes da interface dimérica foram obtidos a partir de dados de simulações de dinâmica molecular utilizando os programas GROMACS 3.3.1 e GROMOS-96 (Lindahl *et al*, 2001). Os sistemas da simulação são constituídos por uma caixa cúbica de simulação ajustada para produzir corretas densidades experimentais de 0.997 kg. L⁻³ para moléculas de água modelo SPC (Berendsen *et al*, 1981). A caixa possui lados inicialmente em 8 nm, contendo aproximadamente 16500 águas. Todas as simulações de MD foram executadas em volume constante, usando o algoritmo "leapfrog" (Hockney e Goel, 1974) para integrar as equações do movimento com um tempo de 2.0 fs sobre um tempo total de 4.0 ns. As condições periódicas de limite e a

convenção mínima da imagem foram aplicadas e a temperatura controlada através do método de Berendsen (Berendsen *et al*, 1984) com constantes do tempo de acoplamento de 0.1 picosegundo. O algoritmo de LINCS (Hess *et al*, 1997) foi usado manter as restrições de distâncias das ligações covalentes da proteína que envolve os átomos de hidrogênio, e o algoritmo do SETTLE (Miaymoto *et al*, 1992) foi usado para manter a geometria das moléculas de água, sendo que as velocidades atômicas iniciais foram obtidas de uma distribuição do Maxwell em 298 K.

20 – Cálculo eficiência de transferência de energia entre os triptofanos.

As coordenadas dos dois triptofanos foram extraídas dos dados resultantes da simulação molecular para definir o fator de orientação e a distância entre ambos. Para tanto foi calculado o centro de massa do grupo indol, e assim avaliada a distância (R) entre os dois centros de massa.

Após definir o vetor do dipolo elétrico de transição entre o centro de massa e o N_ε da molécula pirol do Trp, foi calculado o fator de orientação utilizando a **equação 26**. Através destes dados e utilizando a **equação 24** foi obtido o valor da distância de Förster (R₀), e posteriormente com a **equação 30** foi estipulada a eficiência na transferência de energia entre os Trp de cada monômero.

21 - Medidas de espectros de absorção das proteínas mutantes de BthTx-I.

Os espectros de absorção das proteínas recombinantes foram medidos com 15 µg/ml de proteína em tampão TP, utilizando espectrofotômetro HP8453 Diode Array acoplado ao microcomputador HP Vectra ES/12 “Diode Array” na região de 200 nm a 800 nm, cubeta de quartzo de caminho ótico de 1 cm.

V – RESULTADOS

1- Reações de PCR

A **Figura 29A** mostra um gel de agarose 2% referente a reação 1 de PCR usando o oligonucleotídeo EXT1 além dos oligonucleotídeos mutagênicos descritos na tabela 3. O número de pares de bases dos fragmentos amplificados foram de acordo com o tamanho esperado, conforme a posição de anelamento do oligonucleotídeo mutante. A **Figura 29B** apresenta um gel de 2% de agarose mostrando o fragmento de 520 pb, resultado após as reações de extensão e amplificação da região codificadora completa utilizando os oligonucleotídeos EXT2 e EXT3.

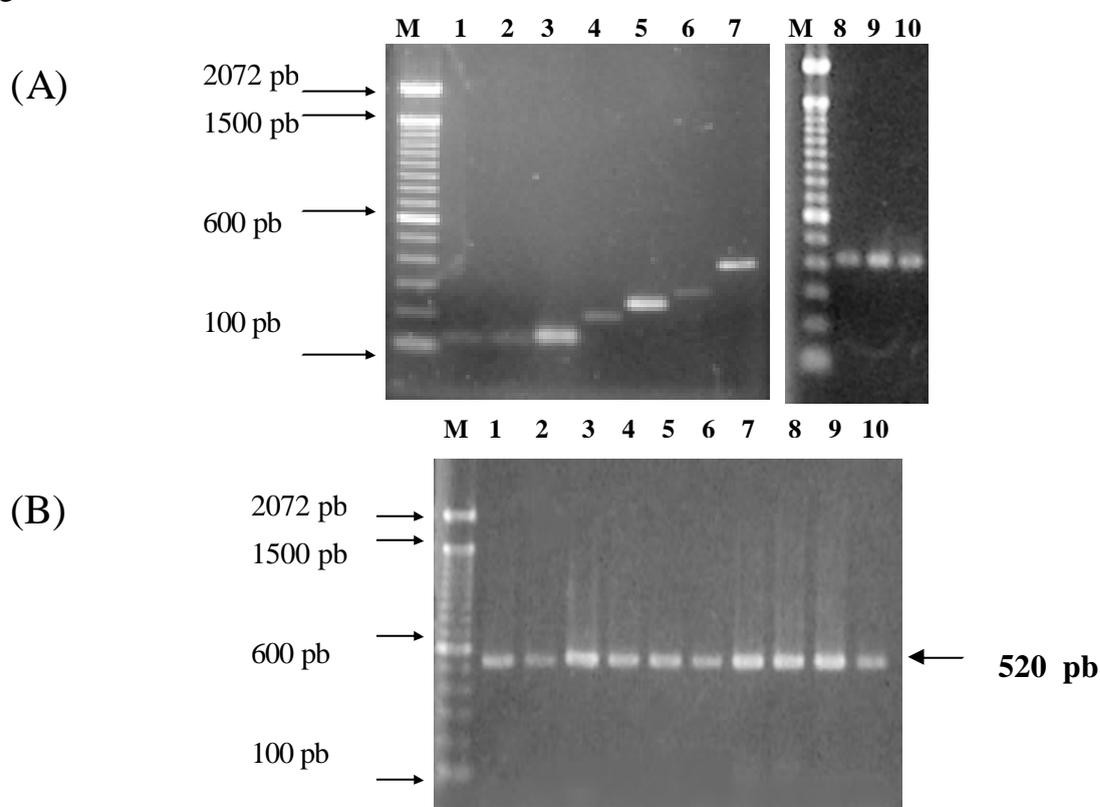


Figura 29: Resultados das etapas das reações de mutagênese sítio-dirigida. (A) Gel de agarose 2% referente a reação 1 de mutagênese sítio-dirigida. Em M tem-se o marcador de peso molecular *ladder*100pb (Invitrogen). De 1 a 10 têm-se respectivamente os mutantes duplos F3W/H, K7W/H, L10W/H, V31W/H, Y46W/H, D67W/H, I104W/H, F125W/H, Y119W/H, Y117W/H. **(B)** Gel de agarose 2% mostrando os fragmentos de 520 pb de 1 à 10 mutantes após extensão e amplificação do gene mutado.

2 - Digestão dos fragmentos com enzimas *Xba*-I e *Bam*HI.

Após a purificação dos fragmentos das reações de PCR mutagênico, os mutantes foram submetidos à digestão com enzimas de restrição *Xba*-I e *Bam*HI, para posterior ligação com o vetor de clonagem pT7T3. Após clonagem, os plasmídeos foram digeridos com as mesmas enzimas liberando fragmentos de 420 pb para todos os mutantes de *Btx*-I como mostrado na **Figura 30**.

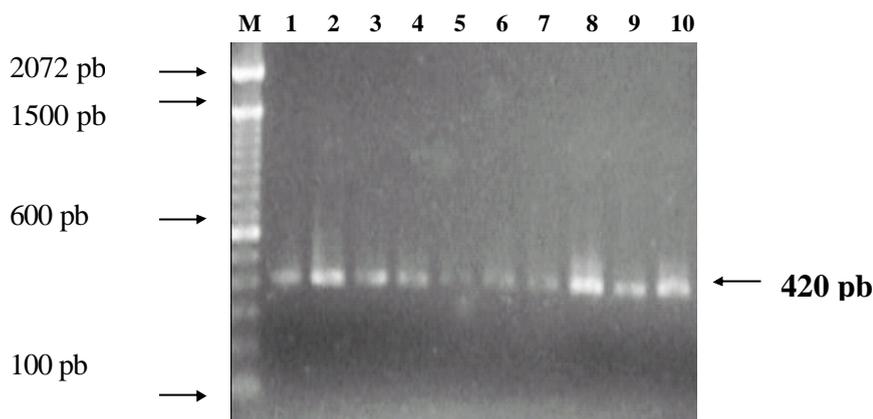


Figura 30: Gel de agarose 2% referente à digestão com enzimas de restrição *Xba*-I e *Bam*HI liberando o fragmento de 420 pb. Em M temos o marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen), e de 1 à 10 os mutantes de BthTx-I.

Os géis de agarose nas figuras 29 e 30 mostram as reações de extensão, amplificação e digestão do fragmento mutagênico de BthTx-I F3W/H, porém houve problemas nos testes de expressão desta proteína mutante, e portanto, esta mutação foi eliminada dos testes de caracterização estrutural da toxina.

3 - Sequenciamento dos mutantes de BthTx-I.

As mutações foram comprovadas através de sequenciamento automático de nucleotídeos. Os eletroferogramas obtidos mostram as seqüências de DNA das regiões codificadoras dos mutantes, comparados com as seqüências das regiões correspondentes a forma nativa. A **Figura 31** mostra os eletroferogramas obtidos no sequenciamento do DNA

da primeira mutação nas formas nativa **(A)** (Trp - códon TGG) e mutante **(B)** (His - códon CAC) da proteína na posição 77. A **Figura 32** ilustra as segundas mutações nos códons das posições específicas para códon TGG (Trp) para produção dos 9 mutantes duplos.

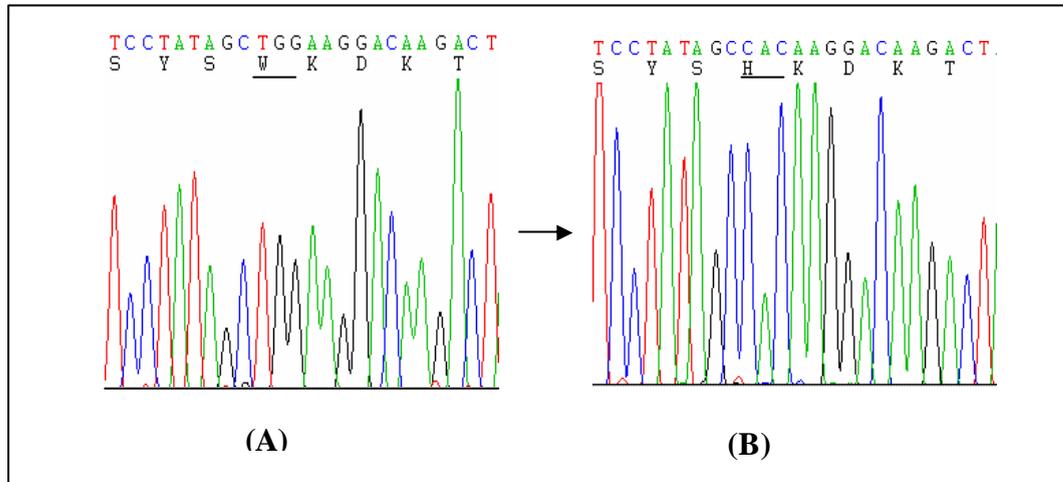
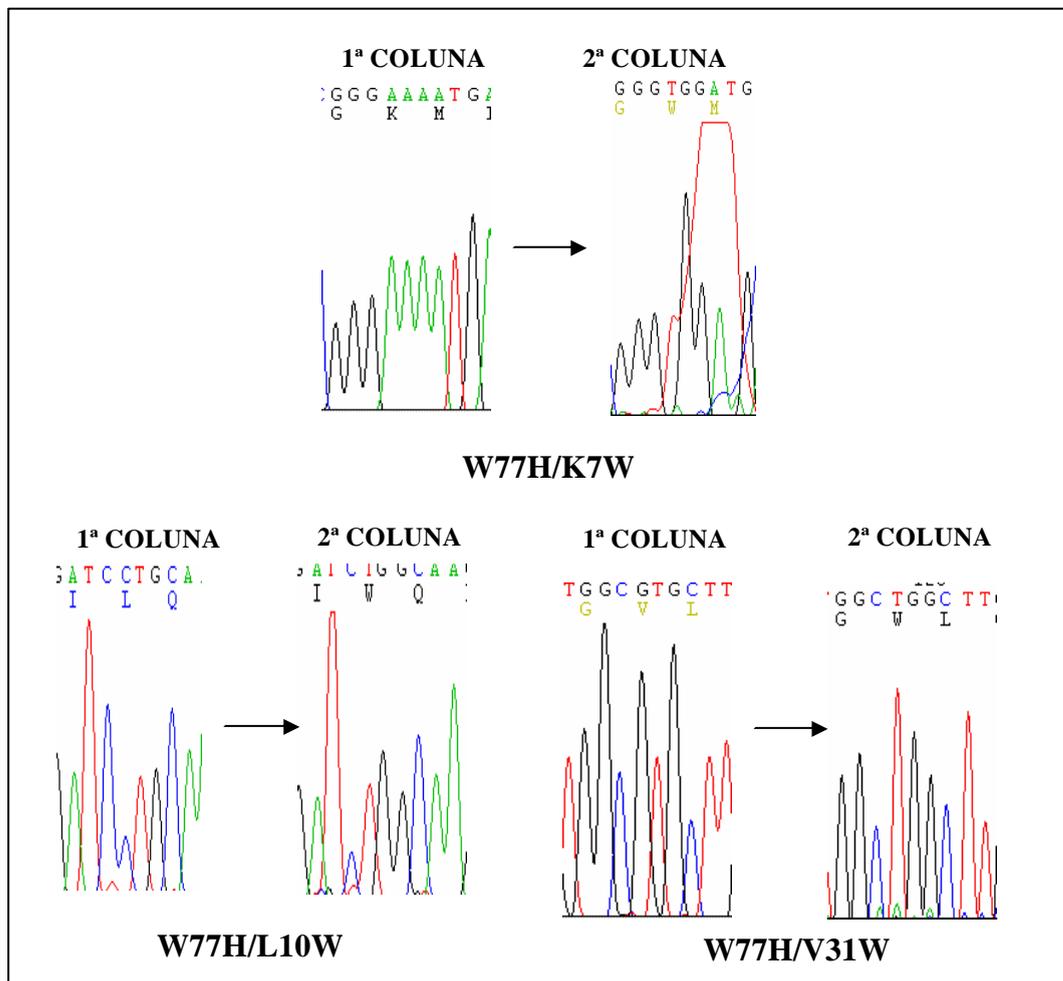


Figura 31: Eleroferograma da mutação W77H. Em **(A)** tem-se o códon TGG que codifica o aminoácido Trp, e em **(B)** observa-se a mutação para o códon CAC que codifica o aminoácido His.



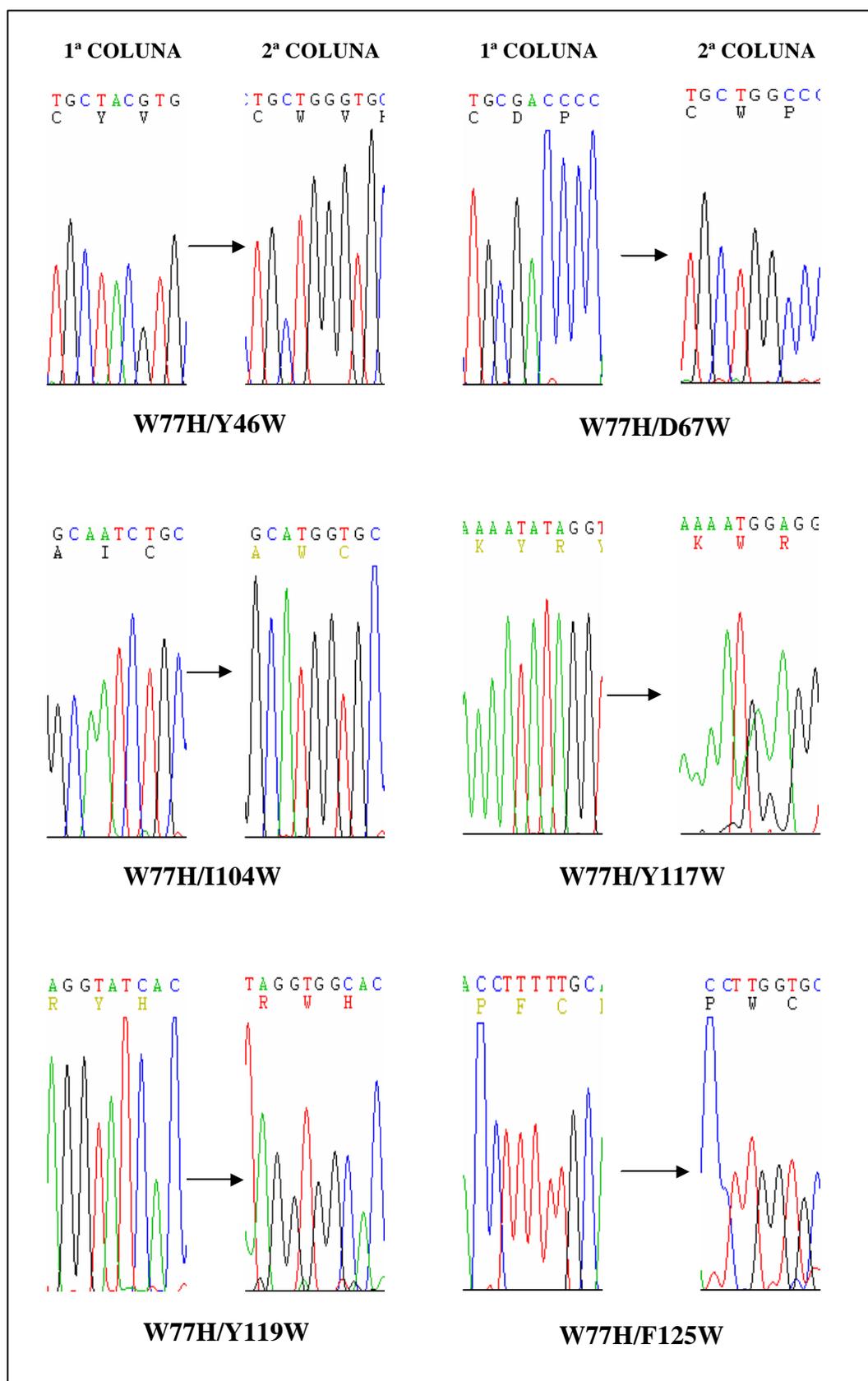


Figura 32: Eleroferograma dos 9 mutantes propostos. A primeira coluna corresponde a forma nativa da toxina e, na segunda coluna, observa-se a alteração no códon correspondente a mutação na posição desejada.

4 - Purificação das Proteínas Mutantes

Após testes de expressão das proteínas recombinantes mutadas de BthTx-I foram realizadas a purificação das mesmas por cromatografia de troca catiônica. Na **Figura 33** observamos que proteína nativa do extrato bruto do veneno de *Bothrops jararacussu* corresponde a segunda fração eluída próximo a 13 min com aproximadamente 700 mM de NaCl. A proteína nativa recombinante de BthTx-I e as toxinas mutantes W77H/V31W, W77H/Y46W e WW77H/F125W apresentam tempos de eluição adiantados em cerca de 1 min em relação a proteína nativa. Esta diferença nos tempos de eluição nos picos ocorre devido a presença, no extrato bruto da toxina, de uma primeira fração correspondente a impurezas e a toxina BthTx-II, fazendo com que ocorra um atraso na eluição de BthTx-I. Além disso, na eluição das proteínas recombinante foi observado uma eluição em torno de 10 min de frações não enoveladas corretamente, as quais foram eliminadas durante o processo de purificação. O rendimento da proteína pura foi satisfatório em cerca de 7 mg.L⁻¹ de cultura, e verificada em gel SDS-PAGE 16% com coloração Comassie Azul brilhante R mostrado na **Figura 34**.

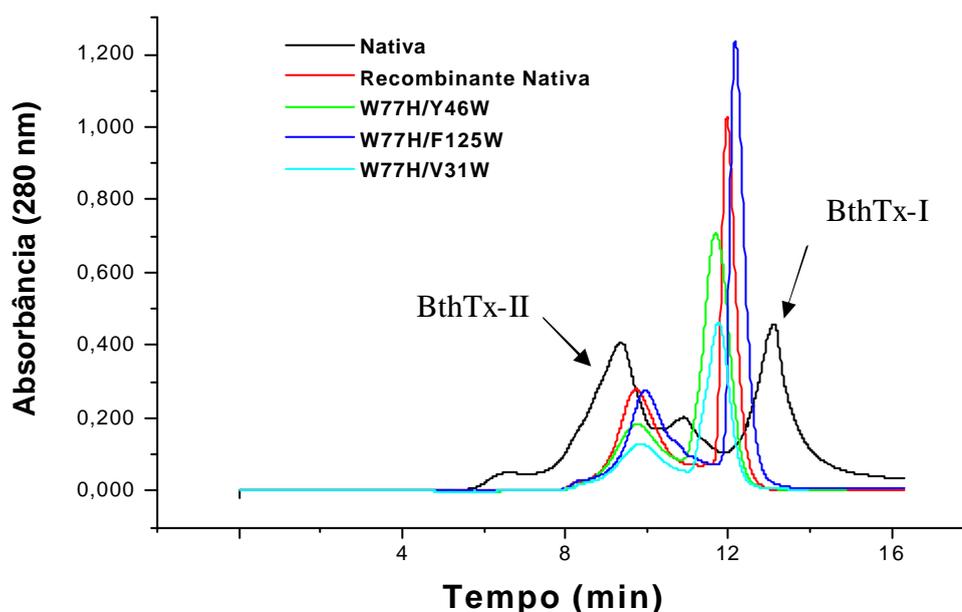


Figura 33: Cromatograma de Purificação. A absorção das proteínas foi feita em 280 nm, obtendo-se tempos de eluição próximos a 12 min. Os picos anteriores ao tempo de eluição correspondem à proteína não enovelada.

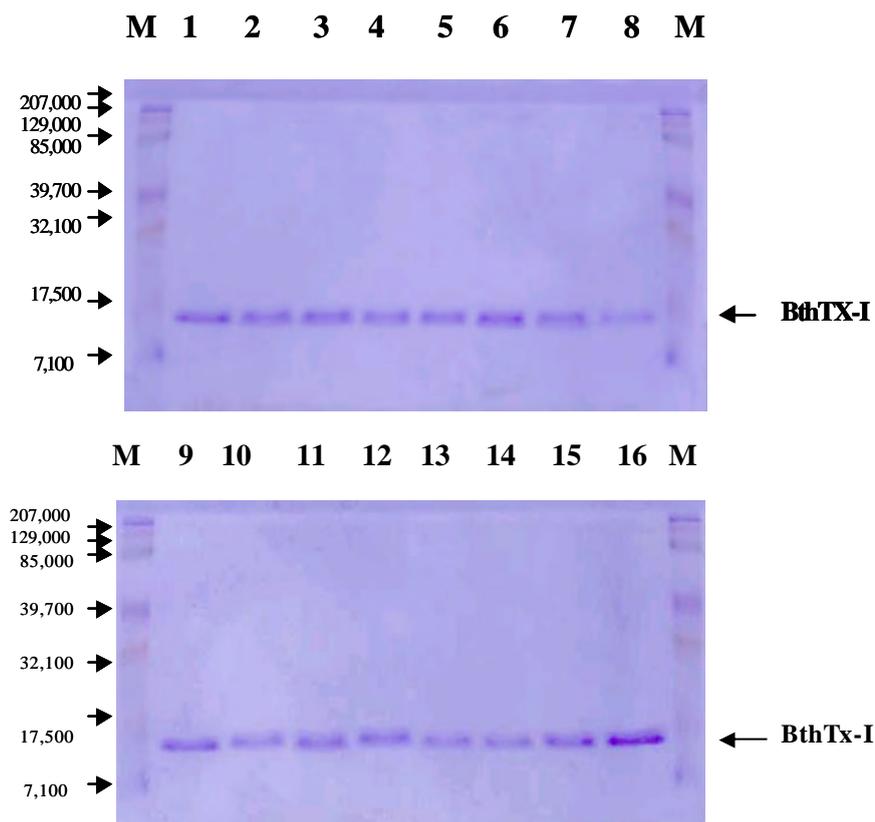


Figura 34: Gel de Purificação SDS-PAGE 16%. Em (M) marcador de peso molecular (BioRed 94501). Em (1) e (9) observa-se a toxina nativa com peso molecular de 13.700 pb e em (2) e (10) a toxina recombinante do tipo selvagem. Em (3) a proteína com a primeira mutação W77H, (4) W77H/K7W, (5) proteína com mutação simples L10W, (6) W77H/L10W (7) W77H/V31W, (8) W77H/Y46W, (11) a proteína com a primeira mutação W77H, (12) W77H/D67W, (13)W77H/I104W, (14) W77H/Y117W, (15) W77H/Y119W, (16) W77H/F125W.

5 - Análise do Espectro de Dicroísmo Circular.

A partir dos resultados de espectro de dicroísmo circular, pode-se avaliar a estrutura secundária das proteínas, ou seja, verificar que ocorreram pequenas mudanças na estrutura secundária devido às mutações realizadas. Na BthTx-I nativa dois mínimos são observados, em 208 e 222 nm e um máximo entre 192 e 194 nm, característico de proteínas ricas em α -

hélices. Na **Figura 35 A e B** observa-se que os espectros das proteínas recombinantes mutadas apresentaram comportamento parecidos ao da proteína BthTx-I nativa (em preto), portanto, conclui-se que as mutações não alteraram significadamente a conformação secundária da cadeia polipeptídica.

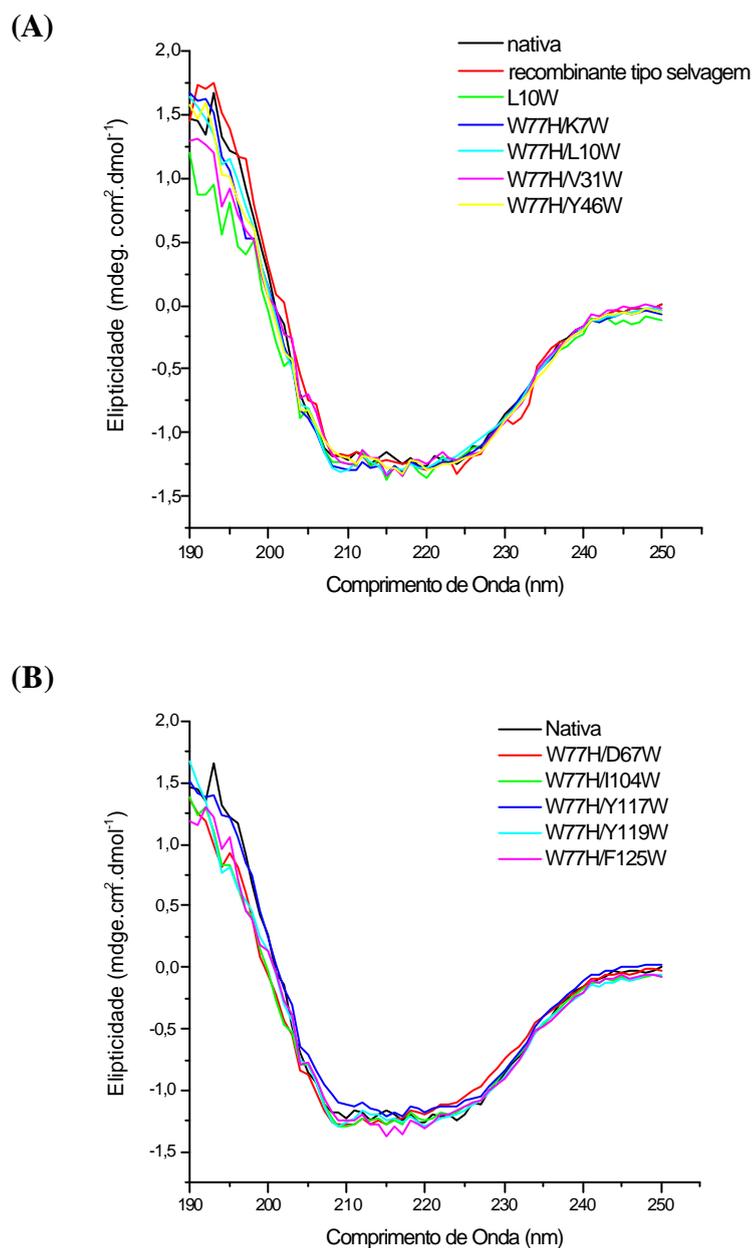


Figura 35: Espectros de Dicroísmo Circular no UV distante. Os gráficos **A e B** ilustram os espectros de CD de BthTx-I nativa e recombinante tipo selvagem juntamente com duplos mutantes após envelhecimento e purificação.

6 - Atividade bactericida dos mutantes de BthTx-I.

Para avaliar a atividade bactericida em função do tempo uma curva dose-resposta de BthTx-I, após 2 horas de incubação, foi medida, mostrando 100% de inibição de CFU (unidades formadoras de colônia) em uma concentração de $17 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Através desses resultados, testes bactericidas foram realizados para as proteínas recombinantes mutantes com duas horas de incubação. A **Figura 36** mostra a ação bactericida de cada proteína mutante em comparação com a proteína recombinante, na concentração fixa de $3 \mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína e uma densidade celular de 4×10^6 CFU/mL, sendo o branco o controle negativo de inibição de CFU realizado com tampão.

No gráfico observa-se próximo de 45% de inibição de CFU/ml a toxina recombinante. Com exceção do mutante W77H/L10W todos os outros variantes de BthTx-I mostraram uma diminuição no efeito bactericida .

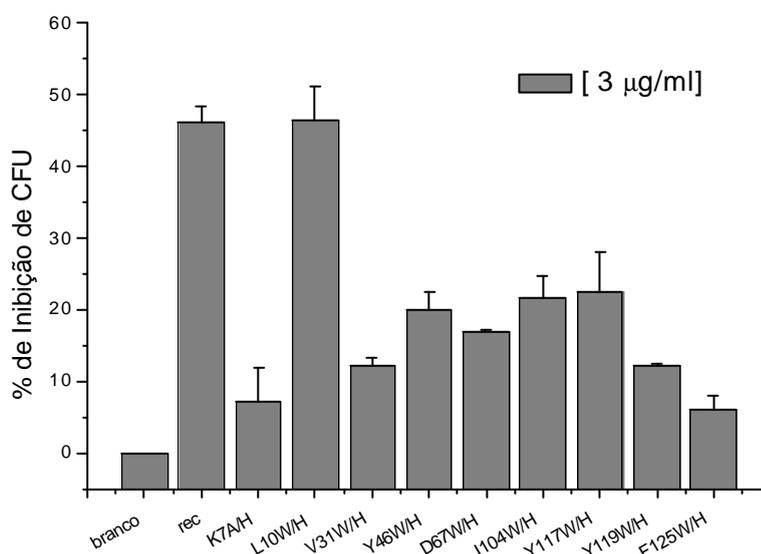


Figura 36: Efeito bactericida na concentração fixa de $3 \text{ mg}/\text{ml}$ de BthTx-I recombinante e mutantes contra linhagem *E. coli* (K12). Os dados são relativos à média com desvio padrão de dois ensaios.

Estudos recentes de atividade bactericida contra *E. coli* K12 com BthTx-I nativa e o mutante H48Q da região catalítica da proteína demonstraram que o efeito bactericida é independente da atividade hidrolítica (Aparecida Aragão *et al*, 2007). Além disso, os resultados com mutações nas posições 117, 119 e 125 da proteína indicaram que a região C-terminal tem um efeito importante na atividade bactericida (Chioato *et al*, 2007). As mesmas mutações foram utilizadas na investigação da integridade da membrana externa e interna de *E. coli* K12 empregando sondas fluorescentes. (Aparecida Aragão *et al*, 2007). Todas as proteínas mutantes de BthTx-I além da proteína nativa mostraram o mesmo efeito de permeabilização na membrana externa, porém as mutações nas posições 117, 119 e 125 reduziram este efeito sobre a membrana citoplasmática.

Os resultados apresentados neste trabalho demonstraram que com exceção do mutante da posição 10, as outras mutações presentes em toda superfície de BthTx-I apresentaram atividade bactericida reduzida contra a mesma linhagem gram-negativa de *E. coli*. Este resultado enfoca que não há nenhuma correlação exata entre a posição ou região específica da proteína que esteja ligada diretamente à esta atividade, e uma vez que o percurso utilizado pela molécula de BthTx-I entre o ambiente externo até a membrana citoplasmática é desconhecido, acredita-se que a proteína utiliza outros mecanismos para atuar na atividade bactericida.

7 – Teste de atividade sobre lipossomos encapsulados.

A atividade de danificação de membrana de BthTx-I recombinante tipo selvagem e mutantes foram avaliadas através de experimentos de danificação de lipossomos com composição variada de carga negativa de fosfolipídios. Estudos têm demonstrado a solicitação de moléculas anfifílicas (fosfolipídios carregados negativamente ou detergentes aniônicos) para a ativação da atividade de danificação Ca^{2+} -independente de BthTx-I (Díaz C. *et al*, 1991 e Bortoleto-Bugs R. K. *et al*, 2004). Para os nossos ensaios escolhemos avaliar a interação de BthTx-I com lipossomos compostos de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) contendo 10% ou 50% de fosfolipídio aniônico dimiristoil ácido fosfatídico (DMPA).

7.1 – Medida do diâmetro do lipossomo.

Após a preparação dos lipossomos sucessivas filtrações em membrana de policarbonato foram utilizadas para produzir uma população homogênea de 400 nm, o tamanho ideal para atividade máxima da toxina. Após a filtração analisou-se o diâmetro através de espalhamento dinâmico de luz (**Figura 37**) verificando que houve produção de lipossomos com diâmetros homogêneos, e que a população tem um diâmetro de aproximadamente 400nm.

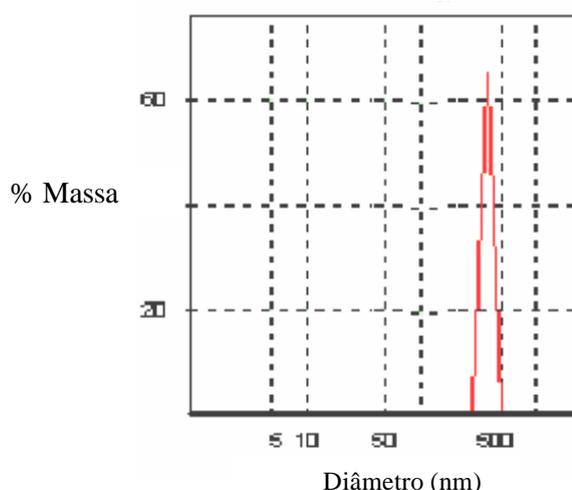


Figura 37: Medida do diâmetro dos lipossomos por espalhamento dinâmico

de luz. Observa-se uma população homogênea na região de 400 nm.

7.2 - Teste de liberação de calceína

Os testes de atividades das proteínas mutantes sobre os lipossomos de fração 10% DMPA/ 90% DPPC na proporção de 1:400 encapsulados com calceína mostraram que todas as toxinas apresentaram uma liberação de aproximadamente 50% do conteúdo dos lipossomos. Quando estas toxinas foram pré-incubadas com lipossomos fração 10% DMPA/ 90% DPPC sem calceína, e posteriormente misturadas na cubeta contendo lipossomos na mesma fração com calceína, observou-se que não houve modificação significativa na atividade danificadora de todas as proteínas (**Figura 38**). O mesmo ensaio foi feito com lipossomos de fração 50% DMPA/50% DPPC e foi observado que para esta fração obteve-se uma atividade de aproximadamente 100% para todas as proteínas recombinantes. Quando estas toxinas foram submetidas ao ensaio de pré-incubação em lipossomos constituídos por 50% de carga negativa resultou em uma diminuição da atividade danificadora de membranas entre 10% e 20% (**Figura 39**).

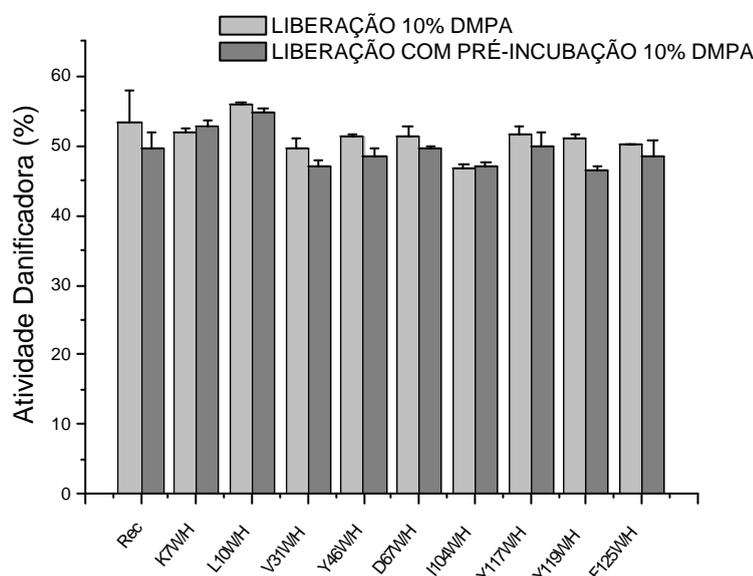


Figura 38: Liberação de calceína induzida por BthTX-I recombinante e proteínas mutadas sobre lipossomos 90% DPPC/10% DMPA. Liberação de calceína encapsulada em lipossomos 150 s depois da adição dos variantes de BthTx-I na proporção de 1:400 (cinza claro). Os valores estão apresentados como total de calceína liberada após a adição de 0,1% de TRITON X-100. Liberação de calceína encapsulada em lipossomos na fração de 1:200 150 s depois das toxinas pré-incubadas com lipossomos sem calceína na fração de 1:200 (cinza escuro).

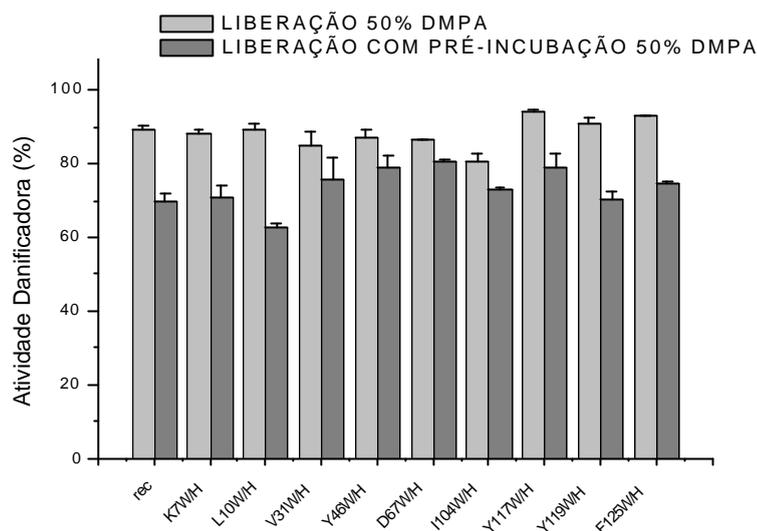


Figura 39: Liberação de calceína induzida por BthTx-I recombinante e proteínas mutadas sobre lipossomos 50% DPPC/50% DMPA. Liberação de calceína encapsulada em lipossomos 150 s depois da adição dos variantes de BthTX-I na proporção de 1:400. (cinza claro). Os valores estão apresentados como total de calceína liberada após a adição de 0,1% de TRITON X-100. Liberação de calceína encapsulada em lipossomos na fração de 1:200 150 s depois da adição toxinas mutadas pré-incubadas com lipossomos sem calceína na fração de 1:200 (cinza escuro).

8 - Avaliação da associação das proteínas com lipossomos após ultracentrifugação e análise em gel SDS-PAGE.

O resultado do ensaio de associação das proteínas com lipossomos estão demonstrados na **Figura 40**, após 10 min de incubação da proteína com as membranas. A ligação foi avaliada por ultracentrifugação, separação do sedimento e sobrenadante, e análise por SDS/PAGE como descrito em materiais e métodos seção 12.

O experimento com lipossomos contendo 10% de carga negativa mostrou que todas as proteínas encontram-se na fração do sobrenadante. Porém, em experimentos com 50% de carga negativa as toxinas foram localizadas na fração correspondente ao precipitado. Portanto, a ligação das proteínas nas vesículas é fortemente influenciada por efeitos eletrostáticos,

resultantes da interação dos resíduos catiônicos da molécula com os fosfolipídios negativos da bicamada.

Este resultado, contudo, não revela se a ligação é estática ou dinâmica, ou seja, se a molécula de toxina permanece com os fosfolipídios ligados, ou se ocorre liberação destes fosfolipídios para ligar-se então a outras vesículas.

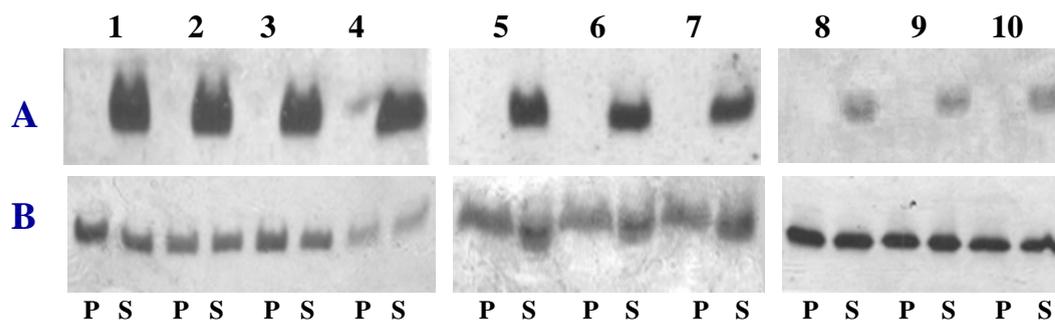


Figura 40. Avaliação da ligação de BthTx-I em lipossomos. A figura mostra as proteínas recombinantes mutantes (1-recBthTx-I, 2-K7W/H, 3-L10W/H, 4-V31W/H, 5-Y46W/H, 6-D67W/H, 7-I104W/H, 8-Y117W/H, 9-Y119W/H, 10-F125W/H) depois da incubação com lipossomos com 10% (A) e 50% (B) de carga negativa, e centrifugação à 100.000 g. O precipitado (P) foi separado do sobrenadante (S) e resuspendido no mesmo tampão, e então aplicado em SDS-PAGE 17% e revelado com prata.

9 – Medidas de associação de BthTx-I em monocamadas.

Com intuito de avaliar a atividade de BthTx-I sobre monocamadas foram realizados ensaios com proteína nativa, recombinante tipo selvagem e proteínas mutantes da alça C-terminal. Para tanto foi utilizado o método da análise do perfil eixo-simétrico da gota (ADSA) (Rotenberg, Y.1983) para determinar as cinéticas de adsorção em um intervalo de tempo total de 1100 s, sendo a fração de fosfolipídio empregada de 90% de DPPC/10% DMPA com 6 ng/ml de proteína.

A **Figura 41** apresentara as oscilações cíclicas da pressão superficial durante os 1100 s de medida.

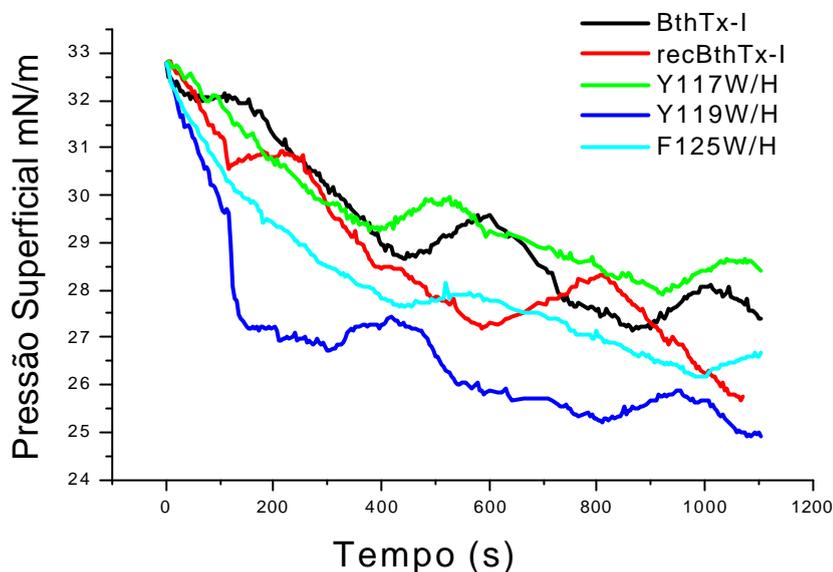


Figura 41: Medidas de atividade de BthTX-I e proteínas mutantes da alça C-terminal sobre monocamadas. O gráfico demonstra as oscilações cíclicas da pressão superficial de uma concentração final de 6 ng/ml de cada proteína.

Pode-se constatar que a mutação Y117W/H apresentou uma cinética e atividade danificadora similar a BthTx-I nativa e recombinante. A mutação Y119W/H apresenta uma alta atividade nos primeiros 100 s de medida com uma diminuição da pressão superficial de 6 mN/m. Observa-se que o mutante F125W/H também apresenta alta atividade nos primeiros 100s, porém a redução na pressão superficial é mais lenta quando comparada com a proteína recombinante tipo nativa e os outros mutantes.

10 – Modificação química dos triptofanos de variantes de BthTx-I em associação com lipossomos em experimentos de “Stop-Flow”.

Os experimentos de cinética de modificação química do Trp por NBS foram realizados em triplicatas. Após tratamento dos dados das cinéticas de modificação química (**Figura 41**)

foram obtidos os parâmetros cinéticos com os valores das constantes reação dos triptofanos **(k)** respectivos a cada proteína mutante (**Figura 42B**).

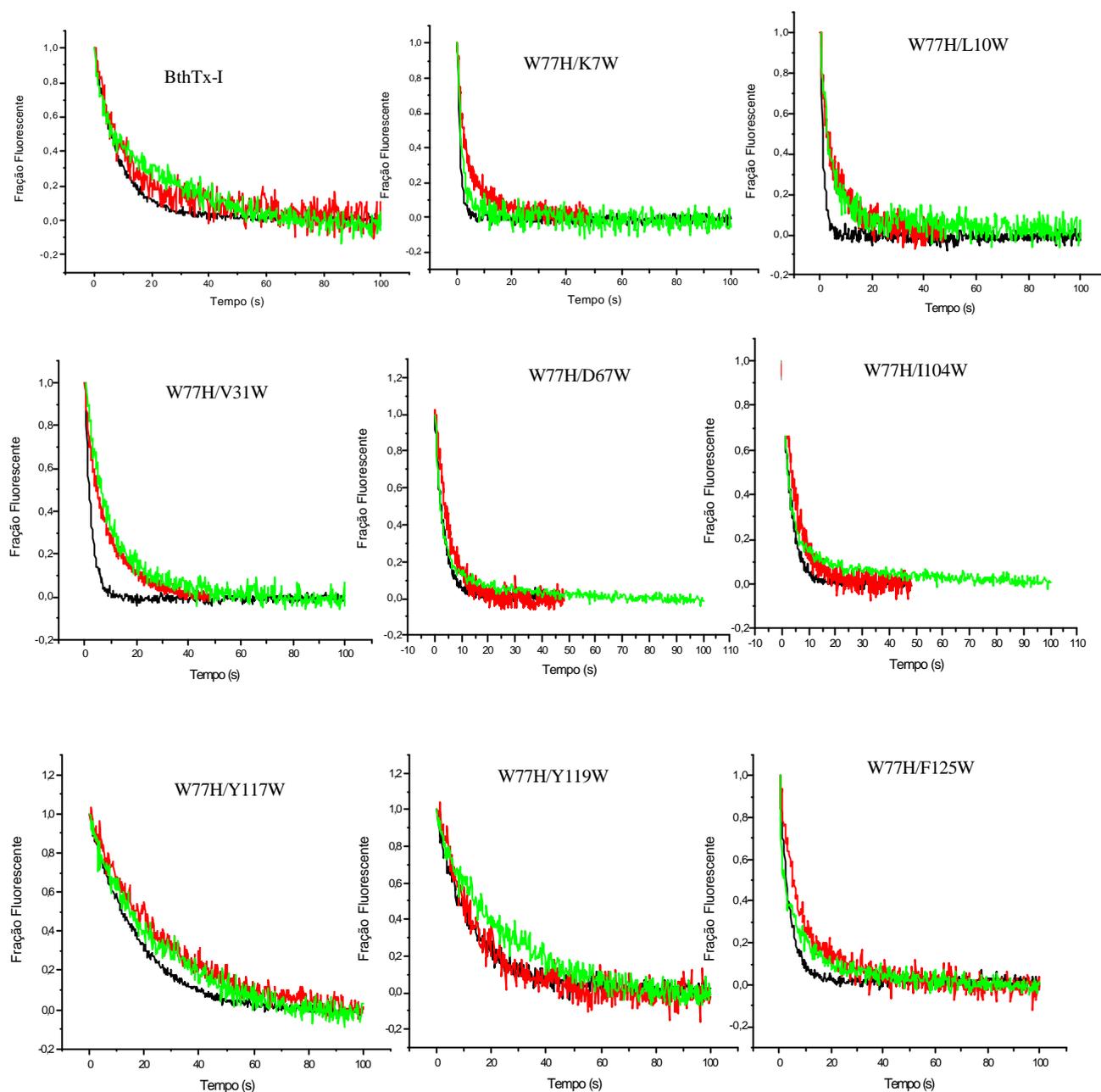


Figura 41: Cinéticas de Modificação química dos triptofanos com NBS de variantes de BthTx-I em associação com lipossomos: Proteína em solução (preto), Proteína + lipossomos 10% DMPA (vermelho), Proteína + lipossomos 50% DMPA (verde). As cinéticas correspondem à fração fluorescente do triptofano não modificada com NBS.

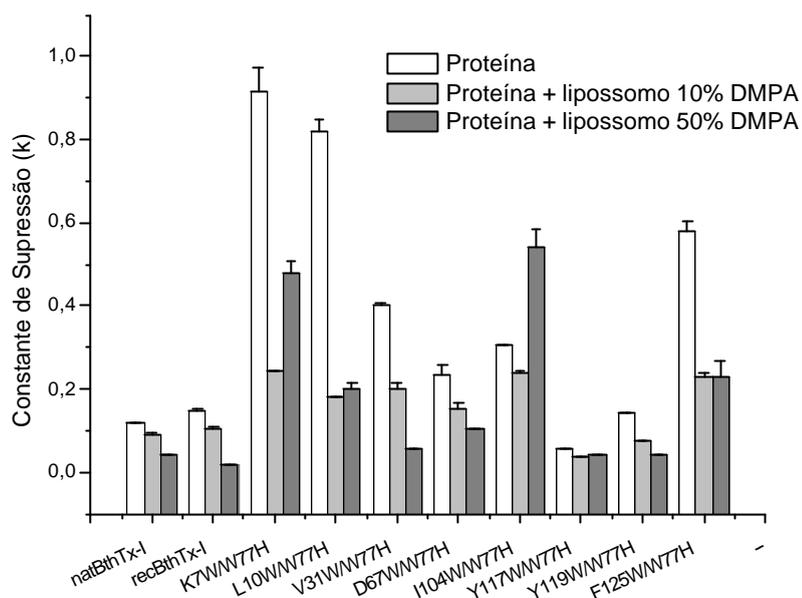


Figura 42B: Gráfico da Constante de modificação química com NBS. Os parâmetros cinéticos foram obtidos com uma média de 3 experimentos.

A proteína nativa e nativa recombinante de BthTx-I possui o triptofano 77 localizado na interface do homodímero onde o acesso ao NBS é restrito, tendo como consequência um valor de k próximo a 0,15. Na presença de lipossomos com 50% DMPA o valor de k foi reduzido significadamente, indicando que na presença de membranas esta região da proteína fica menos acessível ao ambiente externo. Os triptofanos das proteínas mutantes W77H/K7W e W77H/L10W também estão localizados na interface dimérica, mas em uma superfície mais acessível ao NBS. Esta observação está baseada no cálculo da k entre 0,9 e 0,8 para os mutantes W77H/K7W e W77H/L10W respectivamente. Nos ensaios com lipossomos 10% DMPA as k_s foram reduzidas para aproximadamente 0,2 comprovando que na presença de lipossomos estes triptofanos estão localizados em uma região menos acessível ao solvente. No entanto, os resultados com as vesículas com 50% DMPA, o mutante W77H/K7W mostrou um aumento em sua k para 0,5 indicando que este resíduo de triptofano nesta composição lipídica apresenta uma maior exposição ao ambiente externo, do que o triptofano da posição 10.

Os triptofanos dos mutantes W77H/V31W e W77H/D67W estão situados na face do SRI de BthTx-I onde ocorre contato superficial da proteína com a bicamada. Esta afirmação é comprovada experimentalmente pela redução nos valores das k_s de 0,4 e 0,25 para os mutantes W77H/V31W e W77H/D67W respectivamente, na ausência das membranas, e próximos de 0,2 (10% DMPA) e 0,15 (50% DMPA) na presença das mesmas. Portanto, constata-se que a diminuição de mais de 50% no valor da k para o mutante W77H/V31W indicando que a aproximação do triptofano na membrana impede a modificação química pelo NBS.

Na proteína mutante W77H/I104W o fluoróforo encontra-se na superfície oposta ao SRI de BthTx-I e, portanto, não faz contato com os fosfolipídios das membranas. No experimento de modificação química foi observado que na presença de lipossomos, com destaque para as vesículas 50% DMPA, ocorre um aumento da k em cerca de 60%. Este resultado é muito significativo, porque comprova o acesso do triptofano ao ambiente polar do solvente tanto na ausência quanto na presença de lipossomos e, portanto, esta região da proteína durante a atividade de danificação de membranas encontra-se oposta a bicamada.

O mutantes de triptofanos presentes na alça C-terminal W77H/Y117W e W77H/Y119W foram construídos para examinar a possível inserção desta região na bicamada lipídica. A partir dos baixos valores de suas k , concluiu-se que estes triptofanos estão localizados em ambientes parcialmente ocultados ao solvente, e mesmo na ausência de vesículas, a acessibilidade ao NBS é restrita. Nos experimentos com lipossomos foi observado que não houve variações significantes na k para o mutante W77H/Y117W, porém o triptofano da posição 119 apresentou um redução na constante de modificação química, indicando que esta região está localizada próxima a bicamada durante a atividade de danificação de membrana. O triptofano da posição 125, ao contrário das proteínas W77H/Y117W e W77H/Y119W está localizado em um ambiente exposto ao solvente, pois apresenta um valor de k , na ausência de vesículas, muito maior em relação aos outros mutantes da alça C-

terminal. Nos ensaios com lipossomos o valor de k diminuiu cerca de 50% indicando que possíveis alterações ambientais nesta região aproximam o fluoróforo e a membrana.

11 – Espectros de Emissão de Fluorescência Intrínseca do Triptofano (EFIT).

Com intuito de mapear a superfície de BthTx-I que interage com a membrana, foram avaliados as alterações no microambiente do resíduo de triptofano através das medidas nas mudanças de fluorescência da proteína recombinante e mutantes em tampão, e depois da incubação por 10 min com lipossomos de frações 90% DPPC/ 10% DMPA e 50% DPPC/50% DMPA, todos na proporção de 1:400. Os experimentos forneceram os valores dos comprimentos de onda máximo (λ_{\max}) (Figura 43) e as intensidades integradas de fluorescência intrínseca de cada mutante.

Na ausência de lipossomos, o λ_{\max} das proteínas individuais variaram entre 345 e 355 nm indicando que o ambiente ao redor de cada triptofano é determinado pela interação do anel indol da cadeia lateral com a matriz da proteína e o solvente aquoso. Para as toxinas pré-incubadas com lipossomos com 10% de carga negativa não foi observado significantes modificações no λ_{\max} quando comparado com os resultados da proteína em tampão. Contudo, ao avaliar os espectros de emissão com lipossomos de 50% de carga negativa, com exceção dos mutantes W77H/I104W e W77H/F125W, verificou-se uma mudança nos espectros de emissão para comprimentos de onda menores, que variaram entre 4 nm (W77H/L10W) e 17 nm (W77H/Y119W). Significantes mudanças foram observadas nos casos da proteína nativa (8 nm), W77H/K7W (13 nm), W77H/V31W (13 nm) W77H/Y46W (8 nm), W77H/D67W (16 nm) e W77H/Y117W (15 nm). A mudança dos espectros de emissão de fluorescência para comprimentos de onda menores demonstrou que o resíduo de triptofano nestas posições está localizado em ambientes mais hidrofóbicos quando comparados com a proteína em solução tampão.

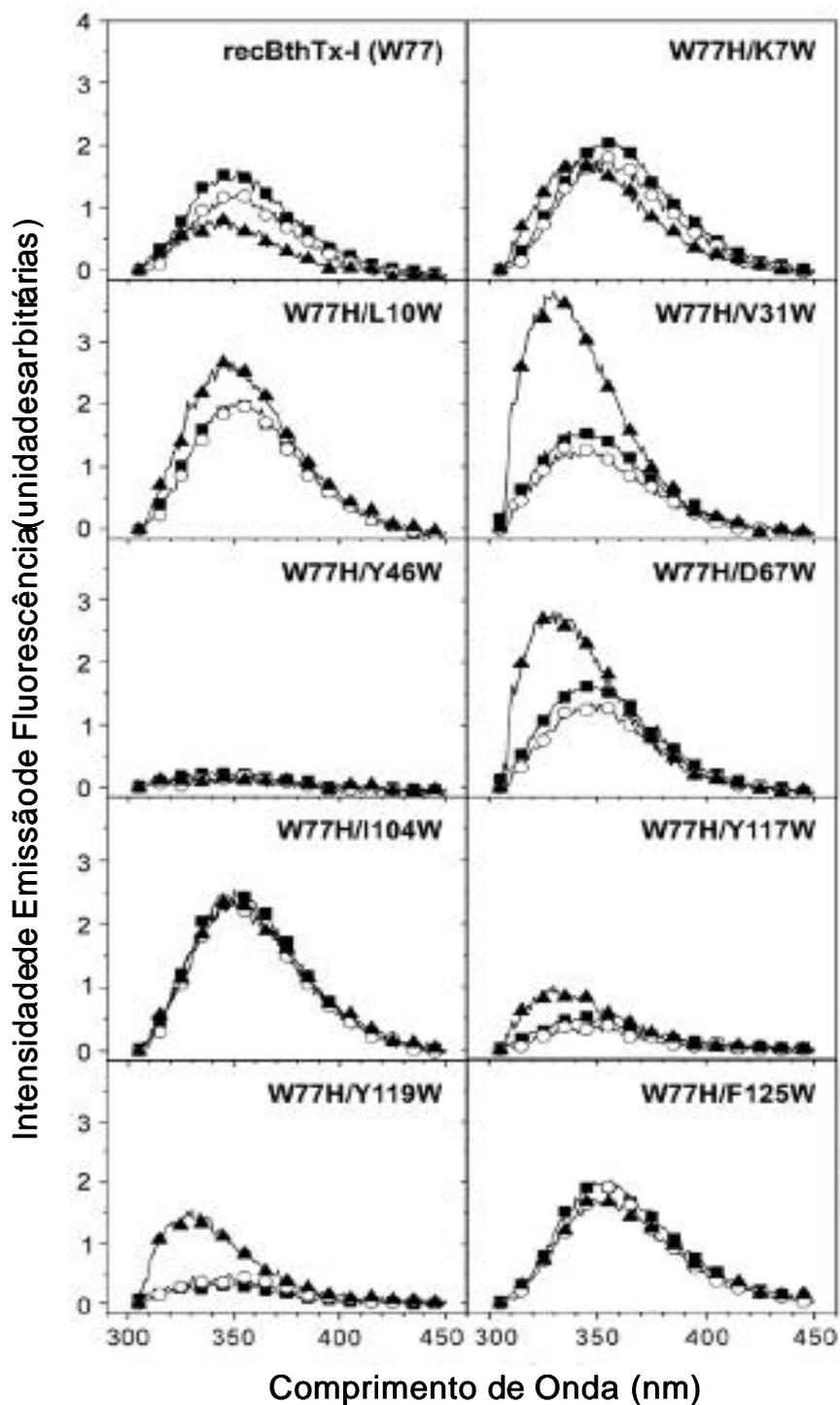


Figura 43: Espectros de emissão de BthTX-I recombinante e proteínas mutantes. Os ensaios foram realizados em tampão padrão pH 7,0 (círculos), com lipossomos com 10% (quadrados) e 50% (triângulos) de carga negativa.

Os valores da intensidade de emissão de fluorescência integrada para proteína recombinante de BthTx-I e mutantes na presença e ausência de lipossomos e frações 90% DPPC/ 10% DMPA e 50% DPPC/50% DMPA também foram calculados e apresentados na **tabela 4**.

Tabela 4. Valores dos espectros de EFIT da proteína recombinante de BthTx-I e mutantes em tampão e na presença de lipossomos 90% DPPC/ 10% DMPA e 50% DPPC/50% DMPA

Proteínas	I_{\max} (nm)			Intensidade Integrada ($\times 10^{-4}$)		
	Tampão	Lipossomos 10% DMPA	Lipossomos 50% DMPA	Tampão	Lipossomos 10% DMPA	Lipossomos 50% DMPA
recBthTx-I	349	351	341	13.9	12.7	12.8
W77H/K7W	355	354	342	14.1	12.7	12.0
W77H/L10W	351	351	347	14.2	13.4	17.1
W77H/V31W	343	343	330	11.1	9.3	20.6
W77H/Y46W	347	349	339	2.7	2.6	2.1
W77H/D67W	346	348	330	11.6	9.8	15.8
W77H/I104W	351	350	350	15.1	14.1	15.0
W77H/Y117W	345	346	330	4.9	4.3	6.7
W77H/Y119W	345	346	328	3.3	4.3	8.6
W77H/F125W	353	354	353	13.9	12.7	11.9

Na presença de lipossomos 90% DPPC/10% DMPA, 8 das 10 variantes de BthTx-I mostraram que a intensidade de emissão variou em menos de 10% daquelas observadas para as proteínas em solução tampão, com exceção dos mutantes W77H/V31W e W77H/D67W que mostraram uma diminuição de 16%.

Na presença de lipossomos contendo 50% DPPC/50% DMPA, os mutantes W77H/L10W, W77H/V31W, W77H/D67W, W77H/Y117W e W77H/Y119W mostraram um aumento na intensidade de fluorescência, indicando uma mudança no microambiente local destes triptofanos. A proteína nativa e os mutantes W77H/K7W, W77H/I104W e

W77H/F125W mostraram somente uma leve redução na intensidade de fluorescência sobre a mesma composição de lipossomos.

O mutante W77H/I104W está localizado na superfície da proteína oposta ao SRI, e, portanto, não apresentou significantes alterações nos comprimentos de onda máximo e nas intensidades de fluorescência na presença de 50% de carga negativa dos fosfolipídios.

Com intuito de verificar a baixa intensidade de fluorescência para o mutante W77H/Y46W foi examinado a estrutura do cristal de BthTx-I, sendo constatado que a cadeia lateral da tirosina 46 está posicionada aproximadamente 4 Å de uma ponte de sulfeto Cys50-Cys133, e portanto, o triptofano que foi inserido nesta posição é apto a sofrer fenômeno de supressão de sua fluorescência. Assim, este mutante foi excluído dos demais experimentos deste trabalho devido às dificuldades técnicas para sua caracterização.

12 – Anisotropia de fluorescência intrínseca de triptofanos.

12.1 - Medidas de anisotropia de BthTx-I e proteínas mutantes em associação com lipossomos.

Com intuito de avaliar a mobilidade das cadeias laterais dos triptofanos sobre diferentes condições experimentais foram avaliadas as anisotropias de fluorescência intrínseca do triptofano dos variantes de BthTx-I na ausência e presença de lipossomos. Os ensaios foram realizados com as proteínas em solução e depois da incubação por 10 min com lipossomos de composições 90% DPPC/ 10% DMPA e 50% DPPC/50% DMPA, sendo os resultados apresentados na **Figura 44**.

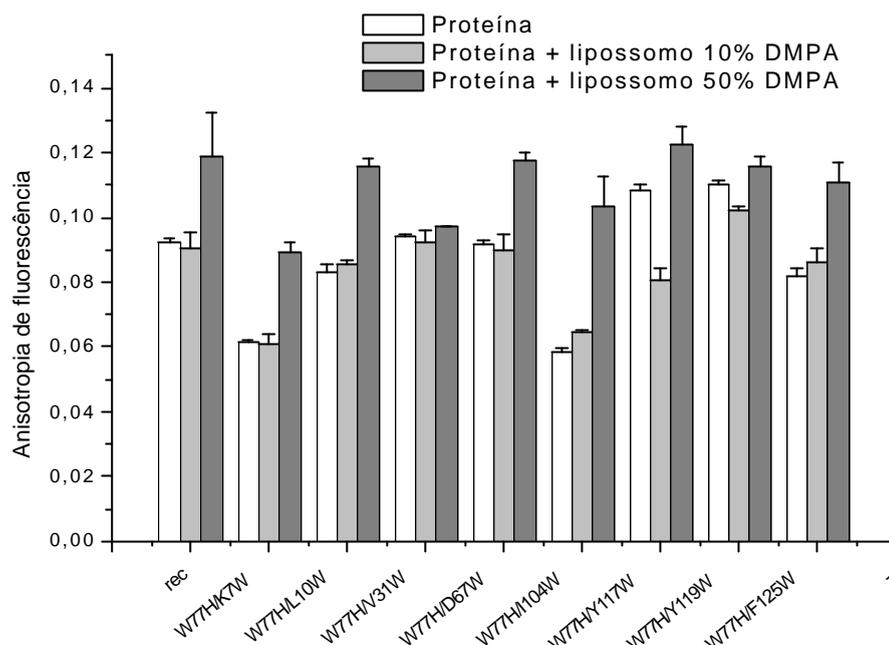


Figura 44: Medida de anisotropia das proteínas associadas com lipossomos. (branco) Proteína em tampão padrão pH 7,0. (cinza claro) proteína pré-incubada com lipossomos 10% carga negativa. (cinza escuro), proteína pré-incubada com lipossomos com 50% de carga negativa.

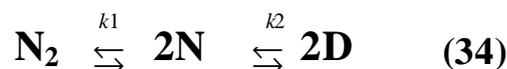
Comparando os resultados das anisotropias de todas as proteínas vemos que em solução tampão a anisotropia variou entre 0.06 e 0.11, refletindo a variação da mobilidade da cadeia lateral do Trp na superfície de cada proteína. Na presença de lipossomos com 10% de carga negativa, nove dos dez variantes de BthTx-I não mostraram alterações significantes no sinal de anisotropia, com exceção do mutantes W77H/Y117W que mostrou uma redução anisotrópica de 0.11 para 0.08.

Um aumento da anisotropia foi observado para a maioria dos mutantes na presença de lipossomos com 50% carga negativa, exceto o mutante W77H/V31W. Um aumento no sinal anisotrópico foi observado no caso do mutante W77H/I104W que está localizado na superfície oposta ao SRI, demonstrando que o aumento da ligação de BthTx-I com lipossomos 50% DPPC/50% DMPA indica uma redução no movimento rotacional da

homodímero, pois o sinal de anisotropia não depende apenas da rotação da cadeia lateral do triptofano, mas também inclui outro componente que é a rotação molecular.

12.2 - Curvas de desnaturação de BthTx-I recombinante e mutantes.

A reação de desnaturação da molécula BthTx-I apresenta as seguintes transições, com suas respectivas constantes de equilíbrio (Ruller *et al*, 2003).



$$K_1 = 2N / N_2 \quad e \quad K_2 = 2D / 2N \quad \text{assim,} \quad K_T = 2D/N_2$$

Sendo:

N_2 = dímero

N = monômero

D = monômero desnaturado

Na forma aberta do dímero de BthTx-I há aproximadamente 8 Å de distância entre os triptofanos 77 da interface (da Silva-Giotto *et al*, 1998) permitindo interações dipolares, que resulta na homotransferência de energia por ressonância, entre os grupos indólicos. Em experimentos de anisotropia de emissão do triptofano com BthTx-I foi observado que a homotransferência de energia entre os Trp77 da interface dimérica diminui a anisotropia de emissão intrínseca do triptofano (de Oliveira *et al*, 2001). Após a dissociação dos monômeros e portanto, a diminuição de homotransferência, ocorre um aumento nos valores de anisotropia. Deste modo, propôs-se um modelo para as transições de anisotropia de emissão de Trp de BthTx-I, apresentado na **Figura 45** e confirmando experimentalmente através dos ensaios de desnaturação com agente desnaturante hidrocloreto de guanidina (Ruller *et al*, 2005).

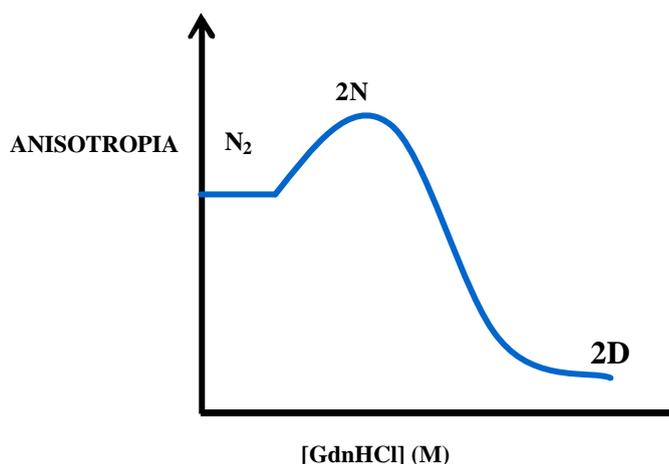


Figura 45: O esquema relaciona o modelo de equilíbrio adotado e as propriedades de anisotropia de fluorescência de BthTX-I. Inicialmente sem a presença de desnaturante a proteína está na forma dimérica (N₂) com o aumento da concentração de desnaturante, ocorre a dissociação dos monômeros (N₂? 2N) e um aumento na anisotropia. Em concentrações mais altas do desnaturante ocorre a desnaturação dos monômeros (2N? 2D), com uma diminuição da anisotropia.

Neste trabalho foram realizados ensaios de anisotropia de fluorescência com gradiente de hidrocloreto de guanidina com as proteínas mutantes W77H/K7W e W77H/L10W no intuito de avaliar uma possível homotransferência de energia entre os triptofanos da interface do dímero e, assim, caracterizar as transições conformacionais aberta e fechada da molécula de BthTx-I. Também foi avaliada a homotransferência de energia entre os triptofanos da posição 31, pois de acordo com homodímero proposto por Murakami *et al*, 2005, os resíduos nesta posição estão relativamente próximos.

A **Figura 46** mostra as curvas de desnaturação química de todas as proteínas mutantes. A curva da proteína nativa recombinante mostrou um perfil que corroborou com os resultados obtidos anteriormente (Ruller *et al*, 2003) com uma diminuição na anisotropia de fluorescência nos primeiros 3M de GdnHCl. O mutante W77H/L10W também apresentou em

uma concentração de até 2M de GdnHCl, uma diminuição do sinal anisotrópico, porém em menor amplitude quando comparado com a proteína recombinante de BthTx-I. No entanto, o mesmo efeito não foi verificado para as proteínas mutantes W77H/K7W e W77H/V31W/H.

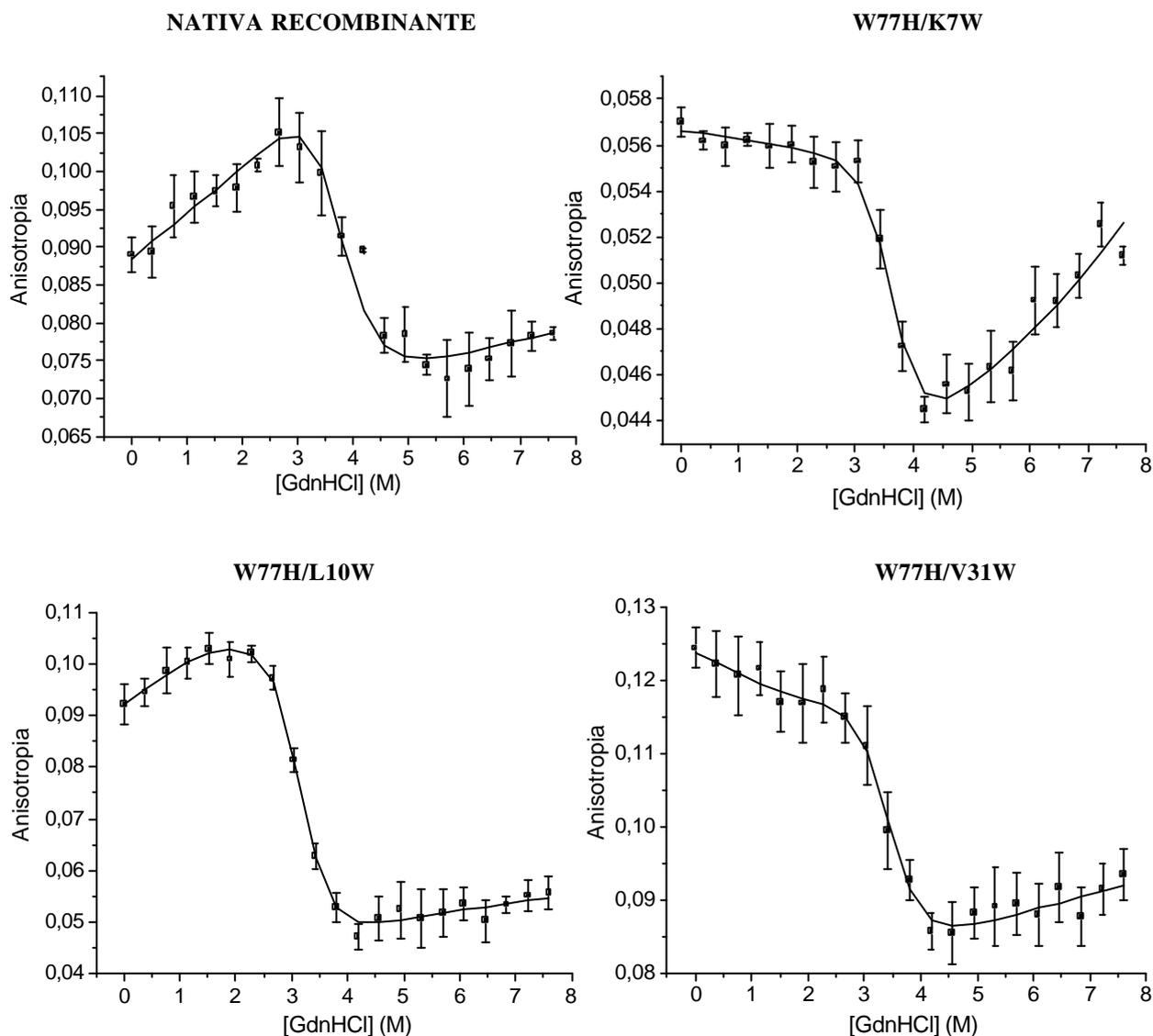


Figura 46: Anisotropia de ETIF em concentrações crescentes de hidrócloro de guanidina. Os gráficos demonstram o perfil da anisotropia de fluorescência dos mutantes da interface dimérica e o mutante W77H/V31W de BthTx-I sob um gradiente de desnaturação química.

Também foram calculados a partir das curvas de desnaturação química os parâmetros de estabilidade do dímero para cada variante de BthTx-I e os valores estão demonstrados na **Tabela 5**. Os valores na energia livre de Gibbs para a primeira transição (dímero \rightarrow monômero) indicam que ocorre uma diminuição da estabilidade dimérica somente para o mutante W77H/L10W (*), e os dados da energia livre de Gibbs para a segunda transição (monômero \rightarrow monômero desnaturado) ilustram o mesmo comportamento para todas as proteínas

Tabela 5: Parâmetros da estabilidade das formas diméricas e monomérica obtida pela análise dos dados de anisotropia da fluorescência intrínseca.

	Nativa recombinante	K7W/H	L10W/H	V31W/H
DG_1 (kcal.mol ⁻¹)	10.0	n.d.	8.8*	10.5
m_1 (kcal.mol ⁻¹ .M ⁻¹)	1.4	n.d.	0.8	1.2
DG_2 (kcal.mol ⁻¹)	7.2	7.4	7.2	7.3
m_2 (kcal.mol ⁻¹ .M ⁻¹)	1.9	2.1	2.3	2.0

n.d. valores não determinados

13 – Espectroscopia de fluorescência com resolução temporal por TCSPC.

A caracterização estrutural de BthTx-I em solução por fluorescência intrínseca do triptofano foi avaliada utilizando o cálculo dos tempos de vida de decaimento da fluorescência por TCSPC. Devido à alta concentração de proteína necessária para obter um sinal adequado para coleta e posterior tratamento dos dados, não foi possível avaliar os tempos de vida das proteínas recombinante e mutantes na presença de lipossomos. A necessidade de uma elevada quantidade de lipossomos produz um aumento no espalhamento de luz, induzindo a uma

análise não confiável. Portanto, medidas com a proteína em solução foram realizadas e os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 6**.

Tabela 6. Dados de tempos de vida de BthTx-I e mutantes após análise por TCSPC

<i>Proteínas</i>	t_1	t_2	t_3	f_1	f_2	f_3	χ^2
recBthTx-I	0,14	1,62	4,65	3,78	43,67	52,55	2,07
W77H/K7W	0,109	2,12	6,62	1,84	19,09	79,07	1,34
W77H/L10W	0,13	1,55	3,85	1,82	33,72	64,46	1,38
W77H/V31W	0,13	1,43	4,61	2,82	65,56	31,62	1,6
W77H/D67W	0,15	1,65	4,89	3,26	52,88	43,87	1,5
W77H/I104W	0,11	2,15	7,51	1,32	18,59	80,09	1,33
W77H/Y117W	0,05	1,22	4,73	0,71	29,71	69,58	1,4
W77H/Y119W	0,2	1,11	5,31	1,02	48,22	50,76	1,96
W77H/F125W	0,15	1,88	6,66	2,03	23,74	74,23	1,36

As curvas de decaimentos de vida de fluorescência apresentaram uma função tri-exponencial característica de cada proteína, com um componente de tempo de vida muito curto (t_1 e f_1) com valores entre 0,1 a 0,2 ns. Este componente curto contribui com uma fração muito pequena para o sinal total, sendo possivelmente um artefato consequente da aparelhagem e, portanto, não foi incluído nas análises subsequentes. Os valores de χ^2 são aceitáveis para uma proteína com baixa eficiência quântica no comprimento de onda utilizado para análise (298 nm - seleção do sinal do resíduo de triptofano). Os valores de tempo de vida de fluorescência para proteína recombinante está próximo do valor previamente obtido para BthTx-I nativa (de Oliveira *et al*, 2001).

A técnica de TCSPC não se mostrou eficaz para medidas de anisotropia resolvida no tempo, pois apresentou problemas na contagem de fótons em tempos muito curtos

complicando a análise de eventos rápidos como transferência de energia entre os resíduos de triptofano das posições 7, 10 e 77 na região da interface dimérica da molécula de BthTx-I.

14 – Análise dos resultados de espectroscopia de fluorescência com resolução temporal pelo método harmônico.

A técnica de fluorescência pelo método harmônico mostrou-se adequada para análise dos tempos de vida de BthTx-I e mutantes, com excitação em 295 nm e os dados obtidos estão apresentados na **Tabela 7**.

Tabela 7. Dados de tempos de vida de decaimento de fluorescência intrínseca do triptofano de BthTx-I e mutantes após análise das curvas obtidas pela técnica de modulação de fase

<i>Proteínas</i>	$t_1(ns)$	$t_2(ns)$	$f_1(ns)$	$f_2(ns)$	χ^2	<i>Média Tempo vida (ns)</i>
recBthTx-I	1,38	4,26	38,0	61,0	13,1	3,13
W77H/K7W	2,04	6,27	18,7	80,8	12,9	5,45
W77H/L10W	1,26	3,22	19,0	82,0	13,4	2,87
W77H/V31W	1,37	3,91	44,0	53,0	91,1	2,37
W77H/D67W	1,88	5,51	71,0	24,0	20,8	2,6
W77H/I104W	2,40	7,20	20,0	77,0	91,7	6,1
W77H/Y117W	1,06	4,91	36,0	80,0	27,4	2,78
W77H/Y119W	0,69	4,60	36,0	64,0	93,2	2,48
W77H/F125W	1,98	5,85	14,0	85,0	7,15	5,18

Utilizando valores mínimos de χ^2 como critério, as curvas de decaimento do tempo de vida de fluorescência foram modeladas por uma função bi-exponencial seguindo uma distribuição discreta. A aplicação de uma função mono-exponencial gerou valores de χ^2 pelo menos dez vezes maiores, mesmo quando se utilizou uma distribuição estatística diferente da discreta, como a distribuição Lorentziana, por exemplo. A análise dos dados com uma função

tri-exponencial não reduziu significativamente os valores de χ^2 e gerou um terceiro componente de tempo de vida (t_3 e f_3) com valores de t_3 inferiores a 0,2 ns. Os valores de χ^2 foram considerados apropriados uma vez que os valores de tempo de vida de fluorescência observados nesta técnica estavam em acordo com os dados pela técnica de TCSPC. Neste caso, os altos valores de χ^2 que foram encontrados nos nossos experimentos podem ser conseqüências da restrita faixa de frequências (12-15 frequências diferentes dentro do intervalo de 8-230 MHz) que foram incluídas nas análises.

15 – Simulação de Dinâmica Molecular dos variantes de BthTx-I.

15.1 – Cálculo do fator de orientação e distância entre os triptofanos.

No intuito de avaliar a transferência de energia entre os triptofanos da interface dimérica das posições 7, 10 e 77 além do mutante W77H/V31W observadas nos resultados das curvas de desnaturação química com hidrocloreto de guanidina foram realizados ensaios de simulação de dinâmica molecular. Os gráficos mostrando as trajetórias dos fatores de orientação e as distâncias entre os triptofanos calculados como descrito na seção 5 de materiais e métodos ao longo da simulação são apresentados na **Figura 47**. As trajetórias da distância das proteínas nativa e o mutante W77H/K7W demonstram uma rápida diminuição nos primeiros 2ns da simulação que corresponde ao fechamento do dímero, após este tempo os valores apresentaram-se relativamente estáveis. Portanto, os dados das simulações foram calculados a partir dos movimentos associados com esta conformação estável do dímero.

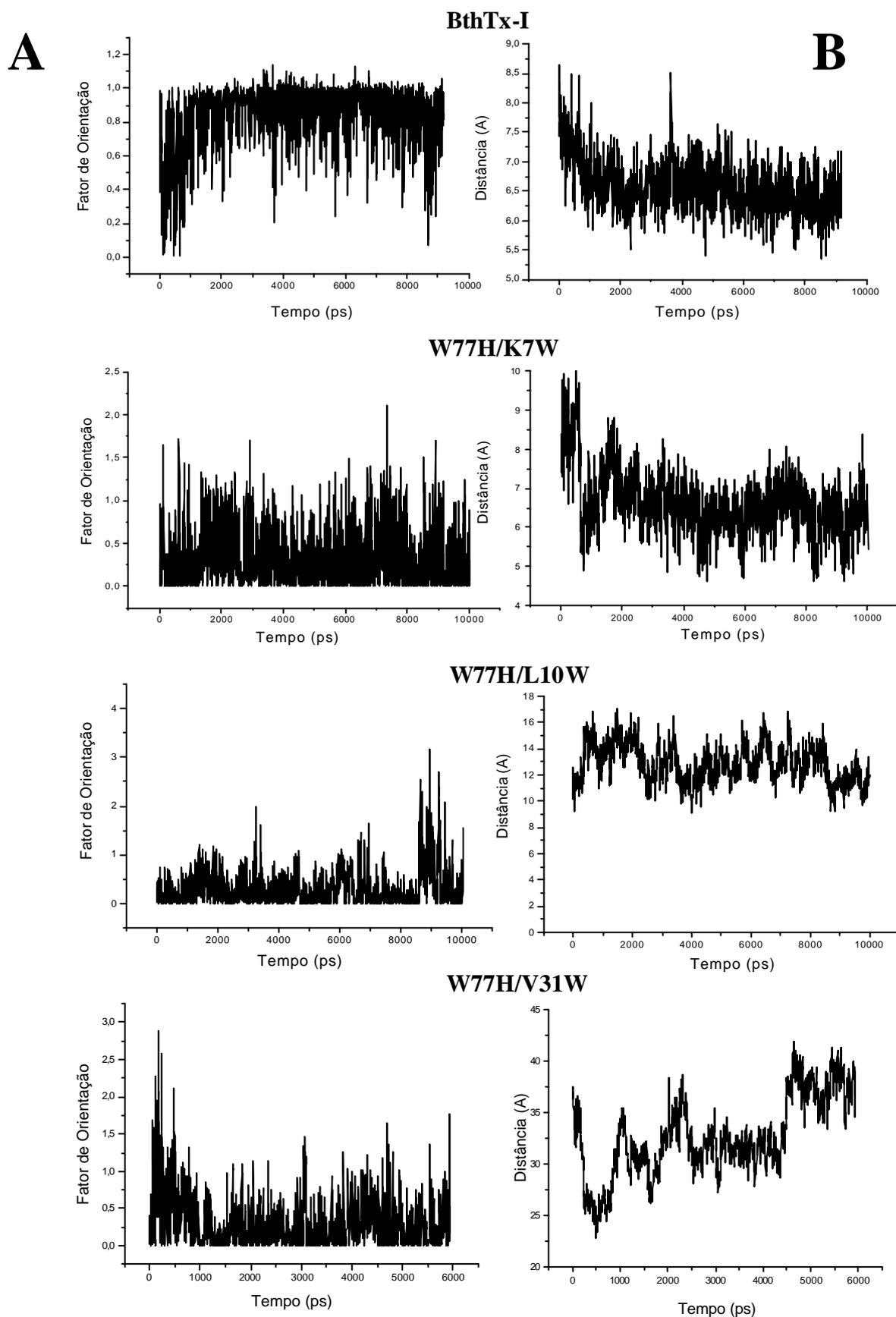


Figura 47: Simulações de Dinâmica Molecular. Os gráficos da **coluna A** demonstram o fator de orientação do triptofano e a **coluna B** a distância em Å entre os triptofanos da interface dimérica das respectivas proteínas.

O cálculo dos valores médios da distância e dos fatores de orientação está apresentado na **Tabela 8**.

Tabela 8: Medidas da distância e do fator de orientação entre os triptofanos da interface dimérica derivadas das trajetórias calculadas por simulação molecular

<i>Proteínas</i>	<i>Distância (R) (Å)</i>	<i>Fator de orientação (k^2)</i>
BthTx-I (W77)	6,49 +/- 0,36	0,88 +/- 0,14
W77H/K7W	6,44 +/- 0,60	0,30 +/- 0,30
W77H/L10W	12,58 +/- 1,35	0,55 +/- 0,74
W77H/V31W	34,17 +/- 3,31	0,27 +/- 0,29

Também foram avaliados os fatores de orientação em função das distâncias entre os triptofanos das proteínas entre 2 e 10 ns da trajetória (**Figura 48**). Observa-se nos gráficos que os triptofanos das posições 7 e 77 mostram uma distribuição uniforme nos valores dos fatores de orientação em função da distância, indicando que os triptofanos nestas posições possuem um grau de liberdade menor que os triptofanos da posição 10 que apresentaram uma distribuição heterogênea. O cálculo destes resultados será utilizado posteriormente para uma análise teórica da eficiência de transferência de energia entre os fluoróforos.

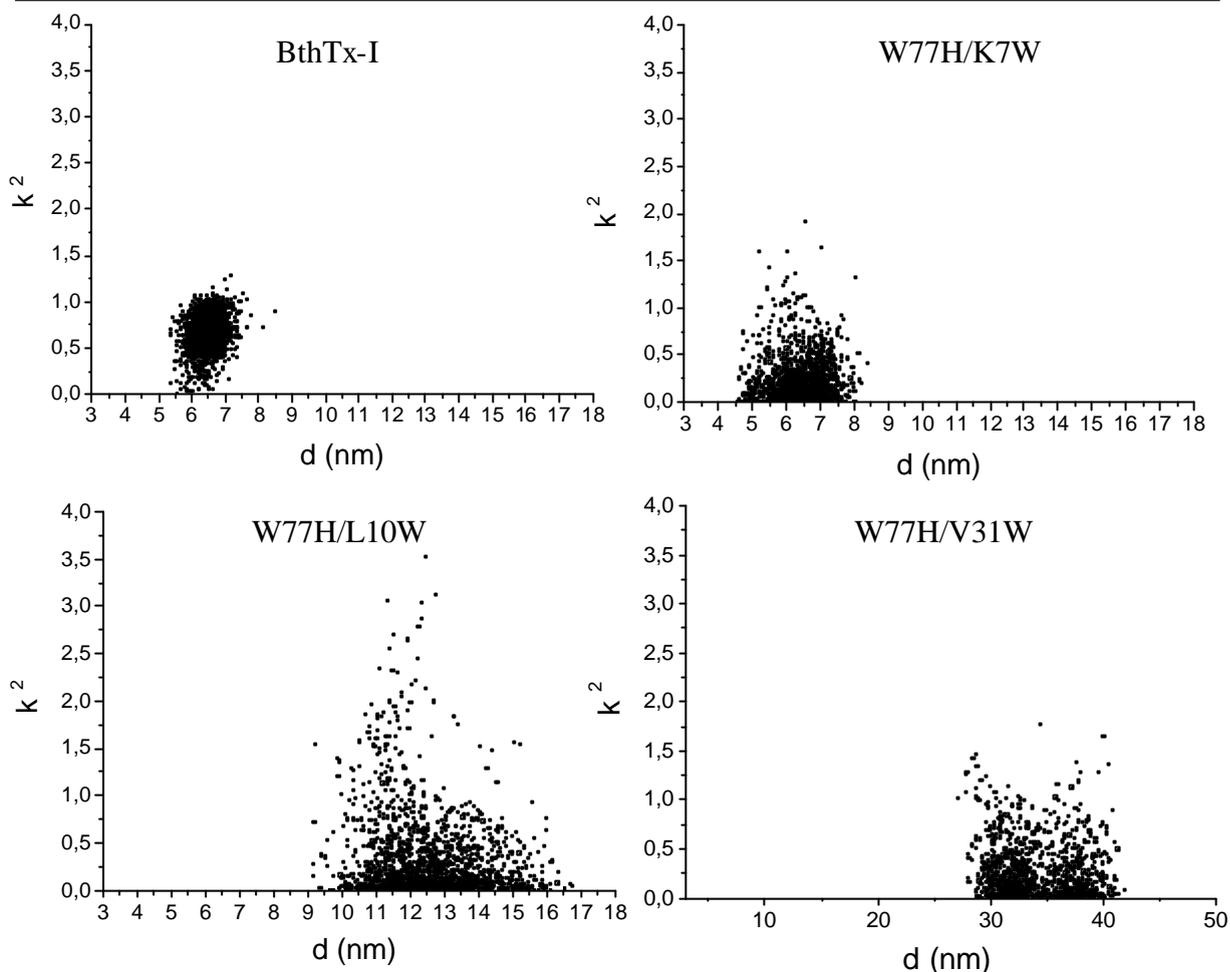


Figura 48: Gráficos do fator de orientação em função distância entre os triptofanos. Os dados foram gerados usando as coordenadas atômicas dos grupos indol dos triptofanos entre 2 e 10 ns da simulação molecular.

15.2 – Cálculo da integral da sobreposição (J) dos espectros do doador e do receptor.

O cálculo da integral da sobreposição dos espectros do doador e receptor foi realizado após obtenção dos espectros de absorção e de emissão de fluorescência para cada proteína de BthTx-I, e os resultados são demonstrados na **Tabela 9**. Os valores de eficiência quântica para cada proteína foram calculados a partir da eficiência quântica dos espectros de emissão de sulfato de quinino, e assumindo o valor do índice de refração $n = 1.33$, obteve-se o valor da distância de Förster (R_0) para cada par de triptofano doador-aceptor das proteínas (**Tabela 9**).

Tabela 9. Valores da integral da sobreposição, eficiência quântica e distância de Förster para BthTx-I e proteínas mutantes

<i>Proteínas</i>	<i>Eficiência quântica (F_D)</i>	<i>Integral da sobreposição (J) $mol.cm^3L/mol$</i>	<i>Distância de Förster (R_0) Å</i>
BthTx-I (W77)	0,14	$1,81 \times 10^{-17}$	8,8 +/- 0,6
W77H/K7W	0,27	$2,41 \times 10^{-18}$	4,8 +/- 1,4
W77H/L10W	0,16	$5,19 \times 10^{-18}$	5,6 +/- 1,7
W77H/V31W	0,17	$2,31 \times 10^{-17}$	7,5 +/- 2,1

Com os dados da distância (R) e dos raios de Forster (R_0) foi utilizado a **equação 30** para calcular a eficiência de transferência de energia entre cada par de fluoróforo descrita na **Tabela 10**. Os dados indicam que os triptofanos da posição 77 possuem até 85% de ocorrência de transferência de energia em comparação com os fluoróforos da posição 7 (entre 0% e 40%) e 10. Devido à grande distância entre os triptofanos da posição 31, este mutante de BthTx-I apresentou uma eficiência de transferência de energia infinitivamente pequena.

Tabela 10. Valores da eficiência e transferência de energia entre os triptofanos de BthTx-I e proteínas mutantes

<i>Proteínas</i>	<i>Eficiência Transferência de Energia</i>
BthTx-I (W77)	0,85 +/- 0,07
W77H/K7W	0,23 +/- 0,21
W77H/L10W	0,03 +/- 0,04
W77H/V31W	2.1E-4 +/- 3.4E-4

VI - DISCUSSÃO

A técnica de Mutagênese de Varredura do Triptofano (MVT) tem sido aplicada no estudo da interação de vários grupos I e II de PLA₂ com membranas modelos (Beers *et al*, 2003; Tsai *et al*, 2006), e forneceram vários resultados sobre a catálise interfacial, tais como os determinantes estruturais da ligação do substrato fosfolipídio e o mecanismo que elucida o fenômeno de ativação interfacial. No presente trabalho foi usado MVT para estudar a interação entre a Lys-PLA₂ e lipossomos, com o objetivo de compreender o mecanismo de atividade de danificação de membranas Ca²⁺-independente desta família de proteínas.

Estudos demonstraram que a substituição do triptofano da posição 77 por histidina em BthTx-I não reduziu a estabilidade da forma homodimérica ou a atividade de danificação de membranas Ca²⁺-independente (Ruller *et al*, 2005). Neste sentido, foi utilizado o mutante W77H como molde para um adicional ciclo de mutagênese visando à inserção de um único resíduo de triptofano em várias regiões da superfície da proteína.

Neste trabalho foi observado que embora a toxina BthTx-I e os mutantes de triptofano provoquem uma eficiente danificação de lipossomos com 10% DMPA, experimentos de ultracentrifugação mostraram que a ligação da proteína com a membrana é de baixa afinidade, pois uma significativa fração de proteína está presente na fração sobrenadante depois da centrifugação à 100,000 g. Em adição, foi observado que na presença de lipossomos com 10% DMPA, não ocorreu mudanças significativas no comprimento de onda de emissão máximo ou na intensidade de fluorescência da toxina nativa ou mutantes da proteína. Finalmente, a ausência de mudanças no sinal de anisotropia (com exceção do mutante W77H/Y117W) na presença de 10% DMPA corroborou com os resultados de ultracentrifugação. Portanto, foi concluído que uma eficiente e rápida atividade de danificação de membrana observada contra lipossomos com 10% DMPA é resultado de uma associação transitória entre BthTx-I e a bicamada de lipossomos.

Os resultados de MVT com outras classes de PLA₂s I e II indicam que os resíduos de triptofano podem contribuir para interação proteína-lipídio (Yau *et al*, 1998 e de Planque *et al*, 2003). No atual estudo, a introdução de resíduos de triptofano no SIR não alterou significativamente a atividade de danificação da membrana de Ca²⁺-independente de BthTx-I, ou a afinidade da proteína com as membranas de lipossomos. Em contraste, o aumento do índice de carga negativa na membrana de lipossomo de 10% DMPA para 50% DMPA aumentou ambos a eficiência de permeabilização da membrana por BthTx-I e a associação de uma fração significativa da proteína para lipossomos. Isto sugere que as interações eletrostáticas podem ter um papel chave na interação entre BthTx-I e a membrana, de acordo com estudos precedentes que demonstraram efeitos funcionais significativos após a eliminação de resíduos catiônicos no SRI de BthTx-I (Chioato *et al*, 2007).

A ausência de uma associação com alta afinidade de BthTx-I com lipossomos contendo 10% DMPA, e uma associação parcial com os lipossomos com 50% DMPA é um resultado intrigante, uma vez que os dados demonstram uma eficiente atividade de danificação de membrana Ca²⁺-independente em ambas composições de fosfolipídios. Recentemente foi relatado que sob condições favoráveis em solução as moléculas anfifílicas podem acumular na superfície da proteína formada pelo SRI de ambos os monômeros no dímero de BthTx-I, resultando em um complexo pré-micelar (Bortoleto-Bugs *et al*, 2007). Estas moléculas anfifílicas podem subsequente dissociar da superfície da proteína como uma micela livre, levando a exposição do SRI e assim, podendo acumular mais moléculas anfifílicas da solução. Este mecanismo de acúmulo de moléculas anfifílicas no SRI formando uma pré-micela foi nomeado de Modelo de Nucleação Micelar, e os ciclos de acumulação e liberação subsequente de moléculas de fosfolipídios pode causar a atividade de danificação da membrana de Ca²⁺-independente de BthTx-I (Bortoleto-Bugs *et al*, 2007). O modelo de nucleação micelar esclarece diversas observações associadas com a danificação de membrana cálcio-independente, tais como a conversão dos lipossomos em estruturas micelares por

BthTx-I (Bortoleto-Bugs *et al*, 2004) junto com a rápida e eficiente liberação de marcadores encapsulados na ausência da atividade hidrolítica (Díaz *et al*, 1991; Rufini *et al*, 1992 e de Oliveira *et al*, 2001). O modelo de nucleação micelar ainda prediz que a BthTx-I requer somente uma associação transiente com a parte exterior da bicamada de fosfolipídios para permeabilizar a membrana. Neste sentido, este modelo pode explicar o resultado de uma atividade de 20% de danificação de membrana Ca^{2+} -independente do monômero da proteína obtido por mutagênese sítio-dirigida na interface dimérica de BthTx-I (Ruller *et al*, 2005). A interface de contato entre a membrana e superfície do SRI de BthTx-I na forma dimérica é maior do que a interface do monômero, e portanto a probabilidade para a formação do complexo micelar induzindo a atividade de danificação de membranas da forma dimérica é muito maior em relação ao monômero da proteína.

Também especulamos que o modelo de nucleação micelar corrobora com os resultados da associação de BthTx-I e mutantes da alça C-terminal com monocamadas apresentados neste trabalho. Quando a toxina BthTx-I liga-se à monocamada, os fosfolipídios podem acumular na superfície do SRI da proteína, iniciando o processo de formação de micelas. Este processo é acompanhado pela diminuição da pressão superficial na gota. Uma vez que estas micelas são liberadas da superfície da proteína para solução elas poderão então ser reincorporadas na superfície da monocamada, aumentando assim a pressão superficial na gota formada pelos fosfolipídios.

As alterações nas propriedades de emissão do triptofano dos mutantes na presença de lipossomos compostos de 50% DMPA fornecem informações a respeito das regiões da proteína que fazem o contato com a membrana lipídica. Na presença de 50% DMPA, os mutantes nas posições 31, 67, 117 e 119 mostraram um significativo deslocamento do λ_{max} para comprimentos de onda menor (blue-shift) e um aumento nas intensidades de emissão, indicando que cadeias laterais do grupo indol estão situadas em um ambiente apolar. Supondo que as mudanças nos microambientes são devido à interação com a membrana, estes

resultados sugerem que as regiões em torno destas posições entram em contato com regiões hidrofóbicas da bicamada de fosfolipídios. Em contraste, as outras posições apresentaram um reduzido deslocamento para o azul no λ_{\max} sugerindo que estas posições ocupam um ambiente mais polar. A variação dos espectros de emissão dos diferentes mutantes de triptofano sugere que a BthTx-I está introduzida parcialmente na bicamada lipídica, uma conclusão que está de acordo com os resultados de vários estudos utilizando diversas classes de PLA₂s I e II.

As mudanças nas propriedades de emissão fluorescente com mutantes de triptofanos únicos de PLA₂ GIIA humano mostraram uma correlação forte com afinidade à membrana (Beers *et al*, 2003). Assim sendo, a ligação de todos os mutantes de GIIA PLA₂ à lipossomos compostos de dioleoilfosfatidilglicerol apresentaram mudanças nos espectros de emissão do triptofano, porém alterações significativas nos espectros de emissão foram observadas apenas nos mutantes do triptofano das posições 3, 19, 20, 24, 31, 70, e 119 (Beers *et al*, 2003). Estes resultados estão de acordo com dados obtidos por estudos de ressonância magnética, pois sugerem que estas posições estão introduzidas parcialmente na bicamada de fosfolipídios a uma profundidade não excedente a 45 Å (Canaan *et al*, 2002). Este resultado coloca as cadeias laterais destas regiões da proteína próximos aos grupos glicerol dos fosfolipídios, que é uma região de polaridade intermediária e é consistente com as mudanças espectrais que são observadas para triptofanos nas posições homólogas em BthTx-I. Embora estas conclusões estejam de acordo com os resultados do trabalho presente, deve-se ter cuidado ao comparar os resultados obtidos das diferentes proteínas em diversos sistemas lipídicos, desde que os resultados recentes sugeriram que o grau de penetração da membrana de sPLA₂s pode depender ambos da composição lipídica (Vaclin *et al*, 2005), do estado de fase (Pande *et al*, 2006) da membrana, e da ativação catalítica da proteína (Tsai *et al*, 2006).

Dados recentes demonstraram que a região C-terminal de Lys49-PLA₂s contém resíduos que são determinantes críticos no mecanismo de danificação de membrana de Ca²⁺-independente e de várias atividades biológicas (Chioato *et al*, 2003; Lomonte *et al*, 2003 e

Chioato *et al*, 2007). Os resultados de mutagênese sítio-dirigida de resíduos catiônicos e aromáticos na região da alça C-terminal de BthTx-I sugeriram que os resíduos 115-119 contribuem para ligação da proteína na membrana, e que os resíduos em torno da posição 125 inserem na bicamada (Chioato *et al*, 2002). Este ponto foi mais desenvolvido com base em estudos comparativos de cristalografia de raio-X de Lys49-PLA₂s, em que ligação de uma molécula anfifílica à região do sítio ativo da molécula foi correlacionado com a mudança na conformação da alça C-terminal tendo por resultado a exposição de resíduos hidrofóbicos entre os resíduos 121 e 125 (Ambrosio *et al*, 2005). O aumento da superfície apolar resulta na formação de uma “Knuckle” hidrofóbica que foi proposta para facilitar o contato desta região com a região apolar da bicamada e/ou ao receptor da membrana (Ambrosio *et al*, 2005). Na sustentação desta idéia, estudos recentes demonstraram que a mutação dos resíduos L121, K122 e F125 influenciam certamente a atividade de danificação da membrana de Ca²⁺-independente, porém o efeito da mutação F125W foi altamente dependente da composição da membrana (Chioato *et al*, 2007).

Os resultados apresentados no trabalho suportam a idéia de “motifs” na alça C-terminal com funções discretas, mas sugerem papéis alternativos para as duas regiões. As propriedades intrínsecas de emissão fluorescente do triptofano do mutante W77H/F125W na região da alça C-terminal não foram afetadas pela associação da proteína com o lipossomo. Este resultado foi inesperado, uma vez que esta região da proteína contribui para o SRI e participa da formação da “Knuckle” hidrofóbica. Embora a região entre 121-125 inclua os resíduos que são importantes para a atividade de danificação da membrana (Chioato *et al* 2002; Chioato *et al* 2003; Chioato *et al* 2007), a ausência de mudanças significativas nas propriedades fluorescentes do mutante W77H/F125W sugere que na interação com a membrana, esta região da proteína não penetra significativamente na região hidrofóbica da bicamada. Em contraste, os mutantes de triptofanos das posições 117 e 119 apresentaram um deslocamento do λ_{\max} para o azul e os aumentos significativos na intensidade de emissão, que

indicam que estes resíduos fazem contato com uma região da bicamada de fosfolipídios com polaridade reduzida. Estes resultados indicam conseqüentemente que resíduos em torno da posição 125 ligam na superfície da membrana, e a região incluindo os resíduos 117 e 119 inserem parcialmente na bicamada da membrana.

Os valores das constantes de modificação química do resíduo de triptofano com NBS monitoradas pelo decréscimo da fluorescência intrínseca dos triptofanos de cada posição na molécula de BthTx-I permitiram avaliar a acessibilidade deste resíduo ao solvente na ausência e presença de lipossomos com 10% e 50% DMPA. Com exceção da proteína W77H/I104W todos os outros mutantes mostraram uma diminuição na constante de modificação química na presença de lipossomos. No entanto, o triptofano da posição 104 está presente na superfície oposta ao SRI, fato comprovado pelo aumento da constante de modificação química nos ensaios com lipossomos com 50% DMPA.

Com intuito de avaliar as alterações ambientais na região em que cada triptofano está inserido na presença de lipossomos com 10% e 50% DMPA foram correlacionados os resultados das variações das constantes de modificação química (k_{mod}) com os valores das mudanças nos comprimentos de onda máximos de emissão de fluorescência (λ_{max}) de cada proteína, apresentados na **Figura 49**.

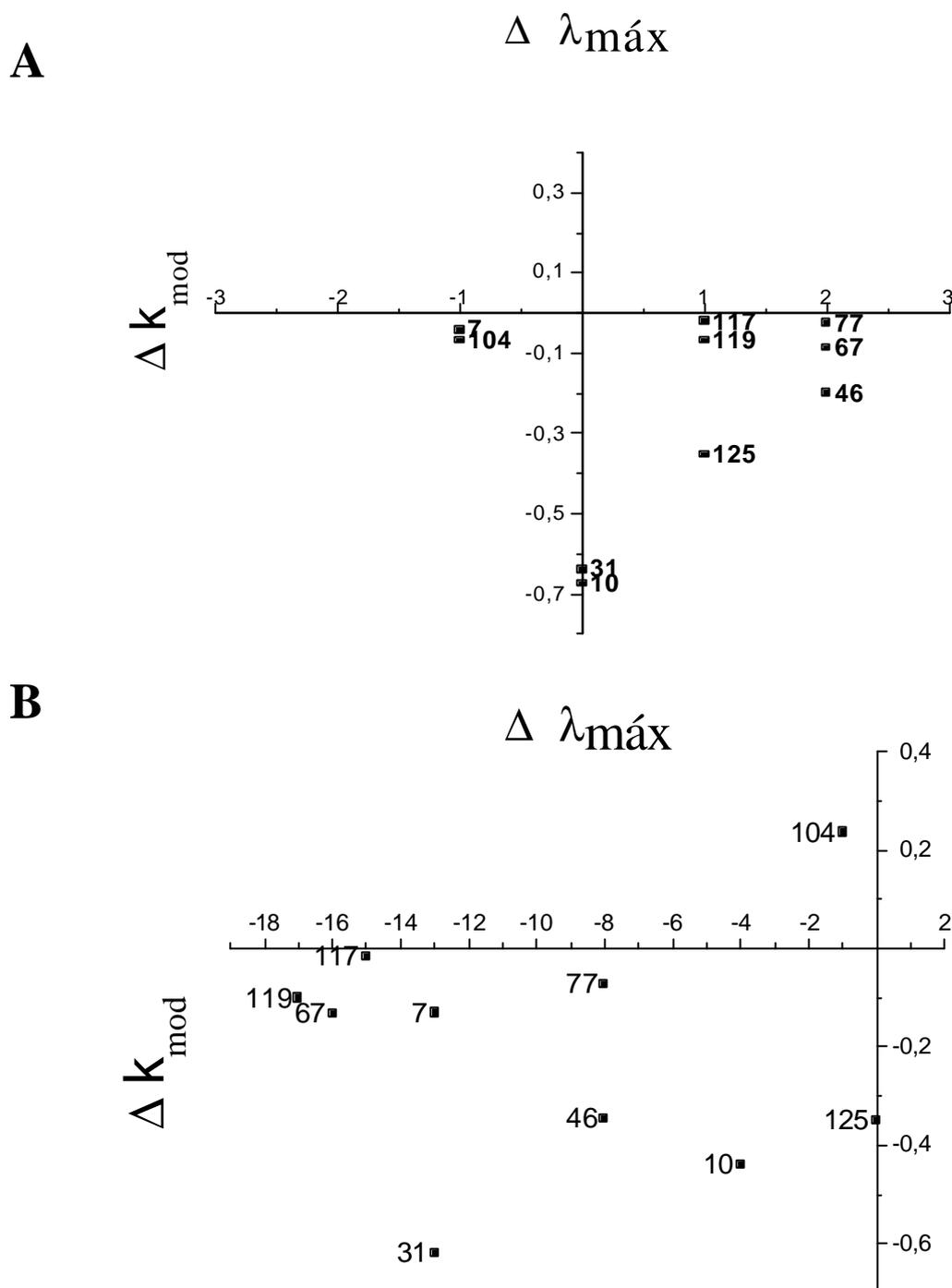


Figura 49: Comparação das variações nas Constantes de Modificação Química dos triptofanos com as mudanças dos comprimentos de onda máximos de emissão de fluorescência. Os gráficos demonstram as variações observadas em cada triptofano das proteínas mutantes de BthTx-I na presença de lipossomos com 10% DMPA (A) e 50% DMPA (B) acompanhadas com a mesma concentração de proteína.

O momento dipolar do grupo indol do triptofano é altamente influenciado pelas soma das cargas residuais do ambiente que o circunda. Neste sentido, a mudança para comprimentos de onda maiores é influenciada pela presença de cargas positivas de outros resíduos de aminoácidos da proteína e a alteração para comprimentos de onda menores é influenciada pela presença de cargas negativas presentes em outros resíduos de aminoácidos da proteína ou em grupos cabeça dos fosfolipídios da membrana (Vivian e Callis, 2001). Deste modo podemos indicar que a ocorrência de uma diminuição da constante de modificação química acompanhada por uma mudança para comprimentos de emissão menores é devido à aproximação do resíduo de triptofano na superfície negativa da membrana ou à proximidade de cargas negativas da toxina. Na **Figura 49A** pode-se observar que com exceção dos triptofanos das posições 7, 10, 31 e 104 todos os outros mostram uma modificação para comprimentos de onda maiores sendo que os resíduos das posições 117, 119, 77, 67, 46 não apresentam modificações significativas nas constantes de modificação química. Este resultado indica que alguns resíduos presentes na superfície do SRI de BthTx-I, na presença de lipossomos com 10% DMPA podem sofrer uma pequena alteração em seu microambiente aproximando-os de resíduos com cargas positivas presentes no anel ao redor do SRI.

A **Figura 49B** demonstra que todos os triptofanos sofrem uma mudança para comprimentos de onda menores pela ordem crescente 46, 77, 7, 31, 117, 67 e 119, mas não ocorre alterações significativas das constantes de modificação química entre os resultados apresentados com lipossomos com 10% e 50% DMPA, mostrando que o dímero de BthTx-I faz contato tanto com a superfície de lipossomos contendo 10% DMPA quanto com lipossomos contendo 50% DMPA, no entanto a permeabilização da membrana pela proteína ocorre com maior eficiência quando aumentamos a concentração de cargas negativas na membrana. Cabe aqui destacar que esta correlação entre as constantes de modificação química dos triptofanos com as mudanças dos comprimentos de onda máximos de emissão de

fluorescência fornece uma interpretação qualitativa a respeito das modificações estruturais nos ambientes dos triptofanos uma vez que em estudos mais apurados se faz necessário o cálculo exato dos momentos de dipolo de cada resíduo de triptofano na ausência e presença dos lipossomos.

Análise estrutural de BthTx-I em solução.

As informações obtidas pelo cálculo do tempo de vida de fluorescência de uma proteína fornecem uma estimativa da frequência de encontros colisionais com agentes supressores, taxas de transferência de energia e de reações dos estados excitados, além de revelar detalhes acerca das interações do fluoróforo com seu meio, bem como indicar possíveis alterações estruturais da molécula. Neste sentido foi avaliado os decaimentos de tempos de vida dos mutantes de BthTx-I pelos métodos pulsado e harmônico. Inicialmente foram comparados os componente de tempos de vida rápido e lento entre as duas metodologias com intuito de averiguar a reprodutibilidade dos dados.

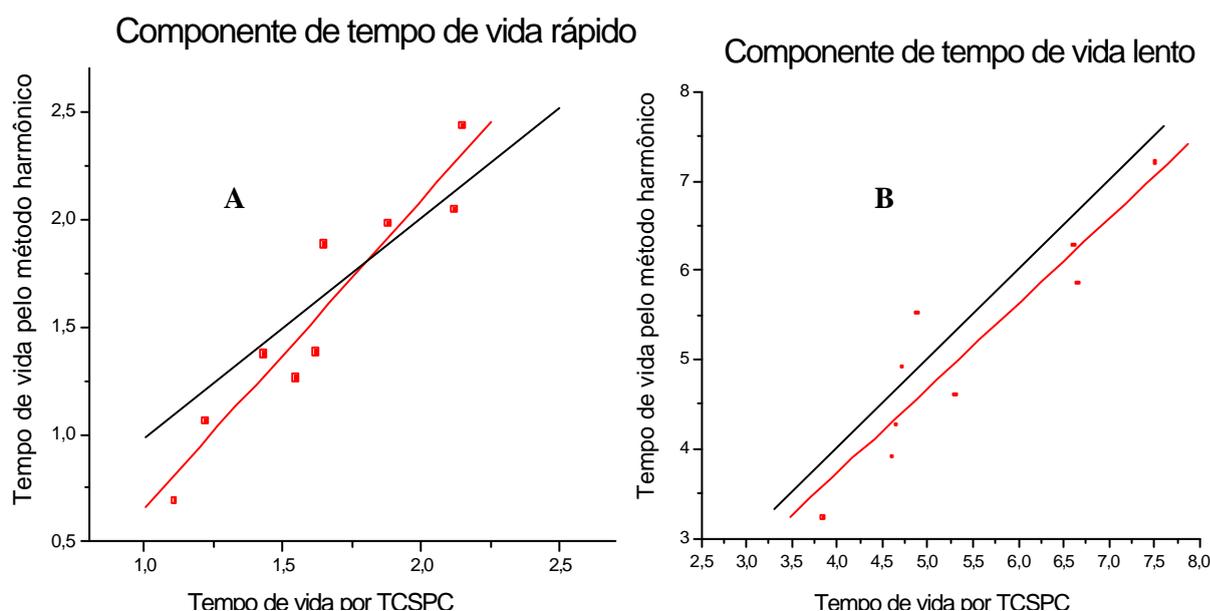


Figura 50: Comparação dos dados obtidos pelos métodos harmônico e

pulsado. A linha vermelha representa os resultados experimentais e a linha preta os valores teóricos.

Os gráficos da **Figura 50** mostram que as duas técnicas forneceram valores de tempos de vida confiáveis, pois a fração dos tempos de vida entre a metodologia harmônica e pulsada assemelha-se ao padrão linear ideal, mostrando uma regularidade dos dados obtidos experimentalmente para o componente rápido e lento.

Os tempos de vida dos componentes rápido e lento das proteínas mutantes de BthTx-I foram comparados com os valores dos comprimentos de onda máximos de emissão de fluorescência (**Figura 51**) e demonstraram que as toxinas com triptofanos nas posições 7, 104 e 125 mostram um aumento no tempo de vida dos dois componentes superior aos das outras posições e são acompanhados por um aumento no comprimento de onda de emissão. Este resultado pode ser consequência do efeito de relaxamento dielétrico do fluoróforo decorrente da orientação dos momentos de dipolo influenciados pela solução. Como os triptofanos das posições 7, 104 e 125, segundos dados das cinéticas de modificação química, se encontram mais expostos ao solvente do que os resíduos das outras posições, estimamos que estas mutações apresentaram um tempo de vida mais longo do que as outras variantes de BthTx-I.

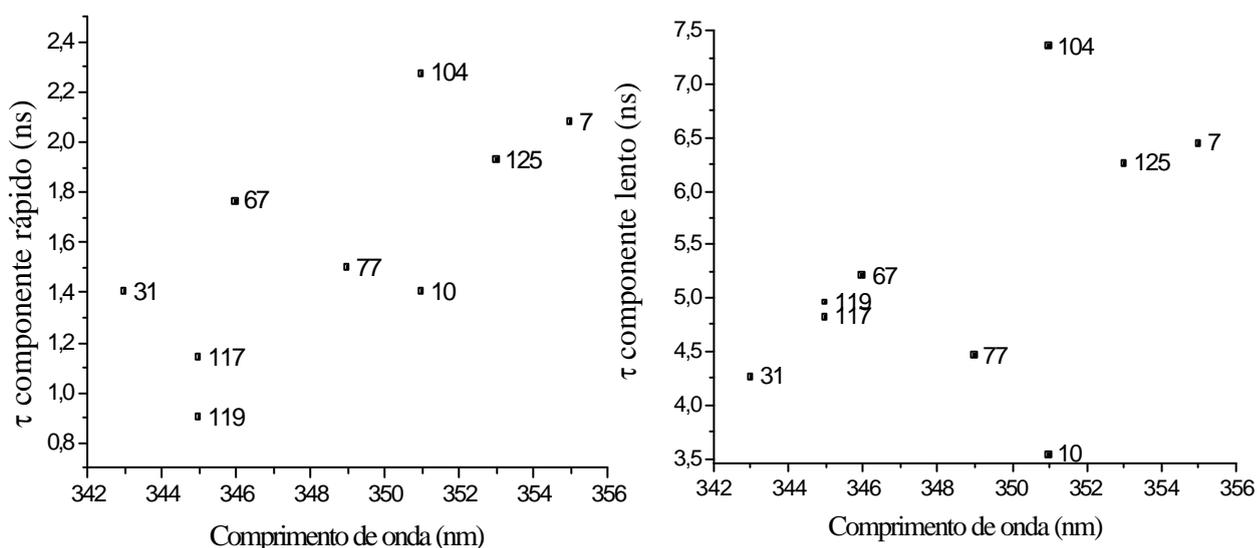


Figura 51: Correlação entre os comprimentos de onda de emissão de fluorescência dos variantes de BthTx-I e os tempos de vida dos componentes rápido (A) e lento (B).

Na toxina BthTx-I, o único Trp77 contribui para ligações intermoleculares que estabilizam a conformação homodimérica da proteína (da Silva Giotto M. T. *et al*, 1998 e Ruller R. *et al*, 2005). Neste estudo, os mutantes foram projetados para introduzir únicos resíduos de triptofanos nas posições 7 e 10, ambos situados na hélice N-terminal na região da interface dimérica. Na associação com o lipossomos compostos de 50% DMPA as alterações nas propriedades fluorescentes destes mutantes são consistentes com suas posições, porém os resultados sugerem que estes resíduos não fazem contato com a região hidrofóbica da membrana de fosfolipídios.

As mudanças da anisotropia de fluorescência dos mutantes podem a princípio ser usadas para fornecer informações a respeito das alterações nas orientações relativas entre os monômeros constituintes e fornecer informações com respeito a conformação do homodímero em solução. Neste sentido foram realizadas medidas de anisotropia de fluorescência utilizando desnaturação química com hidrocloreto de guanidina com alguns variantes de BthTx-I com triptofanos nas posições 7, 10, 31 e 77. As curvas de desnaturação obtidas destes ensaios demonstraram que em concentrações baixas do agente desnaturante observa-se um sinal de anisotropia menor do que o esperado para a proteína com triptofano na posição 77 e um valor reduzido de anisotropia até próximo de 2 M de hidrocloreto de guanidina para proteína com triptofano na posição 10, porém o mesmo efeito não foi observado com os mutantes W77H/K7W e W77H/V31W. Estudos demonstraram que o fenômeno de homotransferência de energia fluorescente entre os dois resíduos do triptofano do homodímero resulta em uma redução na anisotropia de fluorescência observada na proteína tipo selvagem, e este efeito têm sido explorados previamente para estudar o papel do homodímero nas atividades de danificação da membrana de Ca²⁺-independente (de Oliveira A.H. *et al*, 2001; Ruller R. *et al*, 2003 e Ruller R. *et al*, 2005). No entanto, para que ocorra homotransferência de energia entre os resíduos de triptofano na interface do dímero devem-se levar em conta alguns parâmetros importantes como distância e orientação relativa dos

momentos de dipolo entre os dois fluoróforos. Portanto, foi considerado que os triptofanos da posição 10 podem estar arranjados na estrutura do dímero de modo que favoreça a homotransferência de energia entre os fluoróforos desta posição reduzindo no sinal de anisotropia. Neste sentido, a ausência deste fenômeno nos ensaios com os mutantes W77H/K7W e W77H/V31W prediz que estes fluoróforos estão dispostos em regiões distantes entre os monômeros que não favorece a homotransferência entre ambos.

Com intuito de avaliar esta hipótese foi realizado simulações de dinâmica molecular para analisar a orientação e distância entre os resíduos de triptofano das proteínas mutantes e de BthTx-I. Após o cálculo do raio de Förster, ou seja, a distância na qual ocorre 50% de transferência de energia, foram estimados a eficiência de transferência de energia para cada variante de BthTx-I, sendo os resultados correlacionados na **Figura 52**. Os dados obtidos para a proteína nativa de BthTx-I, em que os triptofano está presente na posição 77, demonstram uma menor dispersão nos possíveis estados de transição do fluoróforo em comparação com os triptofanos das proteínas mutantes W77H/K7W , W77H/VL10W e W77H/V31W as quais foram obtidas por mutagênese sítio-dirigida.

A proteína nativa apresenta uma eficiência de transferência de energia média de 85% quando os triptofanos estão em uma distância de 6,5 Å, e os fluoróforos da posição 7 possuem nesta mesma distância uma taxa de eficiência de transferência de energia entre 20% e 50%. Inesperadamente os triptofanos da posição 10 mostraram uma distância muito longa entre ambos, fazendo com que a média de eficiência de transferência de energia não ultrapassasse mais que 20%. Finalmente os fluoróforos da posição 31 apresentam uma eficiência de transferência de energia muito baixa em cerca de 0,01%.

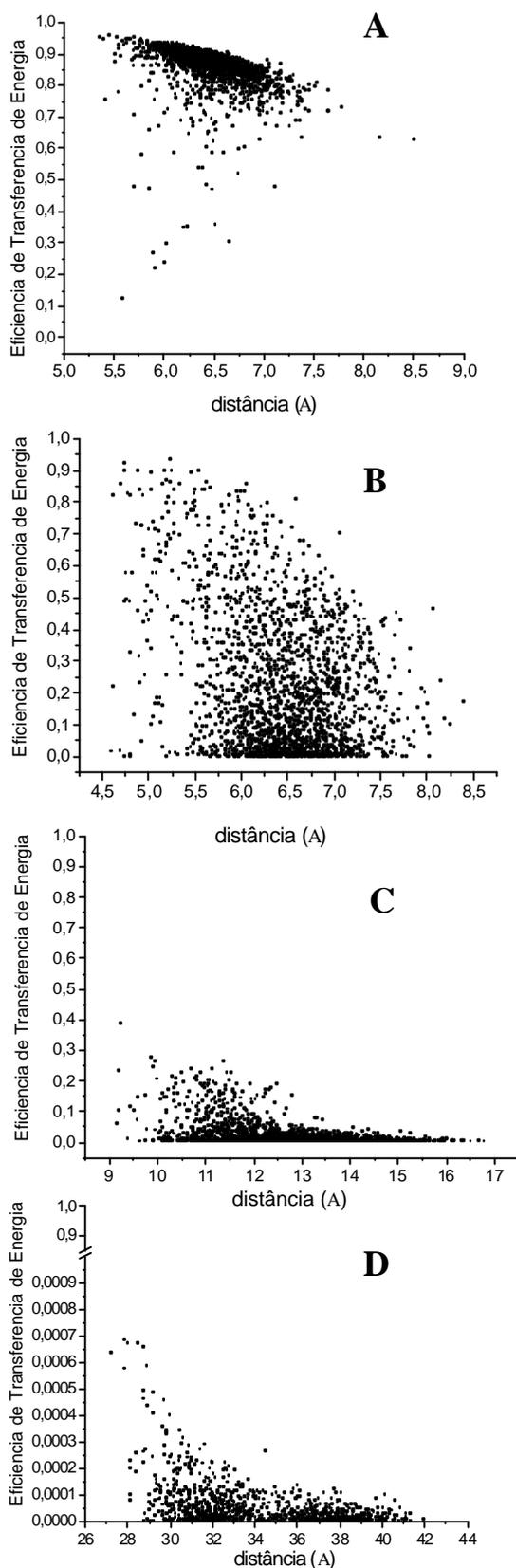


Figura 52: Correlação entre a distância e eficiência de transferência de energia entre os triptofanos dos variantes de BthTx-I. Os dados foram obtidos a partir de simulações de dinâmica molecular. (A) BthTx-I (B) W77H/K7W (C) W77H/L10W (D) W77H/V31W.

Os gráficos da **Figura 52** mostram que apenas o resultado do mutante W77H/L10W não está de acordo com os obtidos experimentalmente através de medidas de anisotropia de fluorescência com desnaturação química. As análises indicaram uma eficiência de homotransferência de energia menor entre triptofanos do mutante W77H/L10W do que para o mutante W77H/K7W. Porém, os resultados de simulação de dinâmica molecular serão avaliados com maiores detalhes, pois são estudos ainda em progresso e, portanto, serão realizadas novas análises com ênfase a mutação W77H/L10W.

Nos resultados apresentados de anisotropia de fluorescência da Figura 47 foi constatada a presença de homotransferência de energia entre o triptofano da posição 7, porém este fenômeno apenas seria possível caso a molécula dimérica estivesse na conformação fechada. Portanto, com base nestas análises foi sugerido que a homodímero de BthTx-I encontra-se fechado em solução e poderia adotar outras conformações quando ligado a membrana.

Os resultados dos ensaios espectroscópicos para o mutante W77H/F125W mostraram que o triptofano desta posição, ao contrário dos outros mutantes da alça C-terminal, está em um ambiente com maior exposição ao solvente, mesmo na presença de lipossomos. Podemos assim supor que na presença de lipossomos, o homodímero expõe a superfície do SRI fazendo com que os triptofanos da posição 31, 67, 117 e 119 aproximem-se da superfície da membrana, levando a uma grande diminuição do comprimento de onda de emissão de fluorescência destes fluoróforos, mas não do triptofano da posição 125.

No presente momento a utilização de ETIF com lipossomos para análise das possíveis modificações da estrutura quaternária de BthTx-I tornou-se um problema devido a baixa eficiência quântica da proteína e espalhamento de luz. Porém, os resultados apresentados neste trabalho, além da hipótese da conformação fechada para o homodímero de BthTx-I em solução abre caminho a novas análises da atividade de danificação Ca^{2+} -independente de BthTx-I.

VII - CONCLUSÕES

- 1- Estudos de interação de BthTx-I com lipossomos com 10% e 50% de carga negativa revelaram que uma rápida e eficiente atividade de danificação de membranas pode ocorrer na ausência de uma associação estável entre a proteína e a bicamada lipídica.
- 2- Estudos de mutagênese por varredura do triptofano (MVT) mostraram que a interação entre a proteína e a membrana parece não ser influenciada pela substituição dos resíduos presentes no SRI por triptofano, indicando que interações não polares podem ter um papel secundário na associação entre BthTx-I e lipossomos.
- 3- Os estudos de MVT sugerem que as regiões das proteínas ao redor das posições 31, 67 e a alça C-terminal 117 e 119 fazem contato com a superfície membrana.
- 4- A ausência de mudanças significativas nas propriedades fluorescentes na presença de lipossomos, os dados do tempo de vida e o alto valor na constante de modificação química do mutante W77H/F125W sugere que esta região da proteína não penetra significativamente na região hidrofóbica da bicamada.
- 5- O aumento da constante de modificação química do mutante W77H/I104W nos ensaios com lipossomos com 50% DMPA comprovam que a região próxima a esta posição não faz contato com a superfície da membrana durante a atividade de danificação Ca^{2+} -independente.
- 6- A presença de homotransferência de energia entre os triptofanos das posições 7 e 10 indicam que o homodímero está presente na solução em uma conformação fechada.

VIII – REFERÊNCIAS

- Abe A. e Shayman J.A., (1998). Purification and characterization of 1-O-acylceramide synthase, a novel phospholipase A₂ with transacylase activity. *J. Biol. Chem.* **273** : 8467–8474.
- Ambrosio A.L., Nonato M.C., Selistre-de-Araujo H.S., Arni R., Ward R.J., Ownby C.L., de Souza D.H., Garratt R.C., (2005). A molecular mechanism for Lys49-phospholipase A₂ activity based on ligand-induced conformational change. *J. Biol. Chem.* **280**: 7326-7335.
- Aparecida Aragão E., Chioato L., Ward R.J., (2007). Permeabilization of *E. coli* K12 inner and outer membranes by bothropstoxin-I, A LYS49 phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu*. *Toxicon* **51(4)**: 538-546.
- Arni R.K. and Ward R. J., (1996). Phospholipase A₂ - A structural review. *Toxicon* **34**: 827-841.
- Arni R.K., Ward R.J., Gutiérrez J.M., Tulinsky A., (1995). Structure of a calcium-independent phospholipase-like myotoxic protein from *Bothrops asper* venom. *Acta cristallogra.* **D51**: 311-317.
- Atsumi G., Tajima M., Hadano A., Nakatani Y., Murakami M. e Kudo I., (1998). Fas-induced arachidonic acid release is mediated by Ca²⁺-independent phospholipase A₂ but not cytosolic phospholipase A₂, which undergoes proteolytic inactivation. *J. Biol. Chem.* **273**: 13870–13877.
- Atsumi G., Murakami M., Kojima K., Hadano A., Tajima M. e Kudo I., (2000). Distinct roles of two intracellular phospholipase A₂s in fatty acid release in the cell death pathway. Proteolytic fragment of type IVA cytosolic phospholipase A₂ alpha inhibits stimulus-induced arachidonate release, whereas that of type VI Ca²⁺-independent phospholipase A₂ augments spontaneous fatty acid release. *J. Biol. Chem.* **275**: 18248–18258.
- Balboa M.A., Saez Y. e Balsinde J., (2003). Calcium-independent phospholipase A₂ is required for lysozyme secretion in U937 promonocytes. *J. Immunol.* **170**: 5276–5280.
- Balsinde J., Bianco I.D., Ackermann E.J., Conde-Frieboes K. e Dennis E.A., (1995). Inhibition of calcium-independent phospholipase A₂ prevents arachidonic acid incorporation and phospholipid remodeling in P388D₁ macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 8527–8531.
- Barlett G.R., (1959). Phosphorus Assay in Column Chromatography. *J. Biol. Chem.* **234**: 466-468.

- Beers S.A., Buckland A.G., Giles N., Gelb M.H., Wilton D.C., (2003). Effect of tryptophan insertions on the properties of the human group IIA phospholipase A2: mutagenesis produces an enzyme with characteristics similar to those of the human group V phospholipase A2. *Biochem.* **42**: 7326-7338.
- Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., DiNola A. e Haak J.R., (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* **81**: 3684-3690.
- Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., van Gunsteren W.F. e Hermans J., (1981). Interactions models for water in relation to protein hydration. In B. Pullman, Editor, Intermolecular Forces, *Reidel Publishing Company, Dordrecht*, 331-342.
- Berg O.G., Gelb M.H., Tsai M.D., Jain M.K., (2001). Interfacial enzymology: the secreted phospholipase A(2)-paradigm. *Chem Rev.* **101(9)**: 2613-54.
- Bortoleto-Bugs R.K., Bugs M.R., Neto A.A., Ward R.J., (2007). A micelle nucleation model for the interaction of dodecyl sulphate with Lys49-phospholipases A(2). *Biophys. Chem.* **125**: 213-220.
- Bortoleto-Bugs R.K., Neto A.A., Ward R.J., (2004). Activation of Ca²⁺-independent membrane-damaging activity in Lys49-phospholipase A2 promoted by amphiphilic molecules. *Biochem. Biophys.* **322**: 364-372.
- Brunie S., Bolin J., Gerwith D., Sigler P.B., (1985). The refined crystal structure of dimeric phospholipase A₂ at 2.5 Å. Access to a shielded catalytic site. *J. Biol. Chem.* **260**: 9742-9749.
- Canaan S., Nielsen R., Ghomashchi F., Robinson B.H., Gelb M.H., (2002). Unusual mode of binding of human group IIA secreted phospholipase A2 to anionic interfaces as studied by continuous wave and time domain electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **277**: 30984 - 30990.
- Chiba H., Michibata H., Wakimoto K., Seishima M., Kawasaki S., Okubo K., Mitsui H., Torii H. e Imai Y., (2004). Cloning of a gene for a novel epithelium-specific cytosolic phospholipase A₂, cPLA₂ delta, induced in psoriatic skin. *J. Biol. Chem.* **279**: 12890–12897.
- Chioato L., Aragão E.A., Ferreira T. L., Medeiros A. I., Faccioli L.H., Ward R.J., (2007). Mapping of the structural determinants of artificial and biological membrane damaging activities of a Lys49 phospholipase A2 by scanning alanine mutagenesis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1768(5)**: 1247-1257.

- Chioato L., de Oliveira A.H., Ruller R., Sa J.M., Ward R.J., (2002). Distinct sites for myotoxic and membrane-damaging activities in the C-terminal region of a Lys49-phospholipase A₂. *Biochem* **366**: 971-976.
- Chioato L. e Ward R.J., (2003). Mapping structural determinants of biological activities in snake venom phospholipases A₂ by sequence analysis and site directed mutagenesis. *Toxicon* **42(8)**: 869-883.
- da Silva Giotto M.T., Garratt R.C., Oliva G., Mascarenhas Y.P., Giglio J R., Cintra A.C.O., de Azevedo Jr. W.F., Arni R.K. e Ward R.J., (1998). Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: conformational changes I bothropstoxin - I, a dimeric Lys49-phospholipase A₂ homologue. *Prot. Struct. Funct. Genet*, **30**: 442-454.
- de Oliveira A.H.C., Giglio J.R, Andrião-Escarso S.H., Ito A.S., Ward R.J., (2001). A pH-induced dissociation of the dimeric form of a lysine 49-phospholipase A₂ abolishes Ca²⁺-independent membrane damaging activity. *Biochem* **40(23)**: 6912-20.
- de Planque M.R., Bonev B.B., Demmers J.A., Greathouse D.V., Koeppe R.E. 2nd, Separovic F., Watts A., Killian J.A., (2003). Interfacial anchor properties of tryptophan residues in transmembrane peptides can dominate over hydrophobic matching effects in peptide-lipid interactions. *Biochem* **42**: 5341-5348.
- Díaz C., Gutiérrez J.M., Lomonte, B. and Gene J.A., (1991). The effect of myotoxins isolated from Bothrops snake venoms on multilamellar liposomes: relationship to phospholipase A₂, anticoagulant and myotoxic activities. *Biochem. Biophys. Acta* **1070**: 455-460.
- Enomoto A., Murakami M., Valentin E., Lambeau G., Gelb M.H.e Kudo I., (2000). Redundant and segregated functions of granule-associated heparin-binding group II subfamily of secretory phospholipases A₂ in the regulation of degranulation and prostaglandin D₂ synthesis in mast cells. *J. Immunol*. **165**: 4007-4014.
- Francis B., Gutiérrez J.M., Lomonte B. e Kaiser I.I., (1991). Myotoxin II from Bothrops asper (Terciopelo) venom is a lysine-49 phospholipase A₂. *Arch Biochem Biophys* **284**: 352-359.
- Hess B., Becker H., Berendsen H.J. e Fraaije J.G.E.M., (1997). Lincs: a linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comp. Chem*. **18**: 1463-1472.

- Hiraoka M., Abe A., Shayman J.A., (2002). Cloning and characterization of a lysosomal phospholipase A₂, 1-*o*-acylceramide synthase. *J. Biol. Chem.* **277**: 1009 – 10099.
- Hockney R.W. e Goel S.P., (1974). Quiet high-resolution computer models of a plasma, *J. Comp. Phys.* **14**, pp. 148-158.
- Homsí-Brandenburg M.I., Queiroz L.S., Santo-Neto H., Rodrigues-Simoni L., Giglio J.R., (1988). Fractionation of Bothrops jararacussu Snake Venom: Partial Chemical Characterization and Biological Activity of Bothropstoxin. *Toxicon* **26(7)**: 615-627.
- Jain M.K., Gelb M.H., Rogers J., Berg O.G. (1995). Kinetic basis for interfacial catalysis by phospholipase A₂. *Methods Enzymol.* **249**: 567-614.
- Jenkins C.M., Han X., Mancuso D.J., Gross R.W., (2002). Identification of calcium-independent phospholipase A₂ (iPLA₂) beta, and not iPLA₂ gamma, as the mediator of arginine vasopressin-induced arachidonic acid release in A-10 smooth muscle cell. *J. Biol. Chem.* **277**: 32807-32814.
- Koduri R.S., Gronroos J.O., Laine V.J., Le Calvez C., Lambeau G., Nevalainen T.J., Gelb M.H. (2002) Bactericidal properties of human and murine groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A(2). *J Biol Chem.* **277(8)**: 5849-5857.
- Kudo, I., Murakami, M., Hara, S. and Inoue, K. (1993). Mammalian non-pancreatic phospholipases A₂. *Biochem. Biophys. Acta*, 117: 217-231.
- Lakowicz J.R., (1983). "Principles of fluorescence spectroscopy". Plenum Press. 495pp.
- Lakowicz J.R., (1991) "Topics in Fluorescence Spectroscopy", vol.2, Principles, Plenum Press.
- Lakowicz, J.R., Zelent, B., Gryczynski, I. and Johnson, M.L., (1994). Distance-dependent fluorescence quenching of tryptophan by acrylamide. *Photochem Photobiol.* 60: 205-14.
- Laye P. e Gill J.H, (2003). Phospholipase A₂ expression in tumours: a target for therapeutic intervention?, *Drug Discovery Today* **8**: 710–716.
- Lee W-H., da Silva Giotto M.T., Marangoni S., Toyama M.H., Policarpov I. e Garratt R.C., (2001). Structural basis for low catalytic activity in Lys49 phospholipases A₂-a hypothesis: the crystal structure of piratoxin II complexed to fatty acid. *Biochem.* **40(1)**:28-36.

- Lindahl E., Hess B. e D. van der Spoel, (2001). Gromacs 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis. *J. Mol. Mod.* **7**: 306-317.
- Lomonte B., Angulo Y., Santamaria C., (2003b). Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115-129 in Lys49 myotoxic phospholipases A₂ from snake venoms. *Toxicon*. **42(3)**: 307-12.
- Lomonte B. e Gutierrez J.M., (1989). A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon*. **27(7)**: 725-33.
- Manya H., Aoki J., Kato H., Ishii J., Hino S., Arai H., Inoue K., (1999). Biochemical characterization of various catalytic complexes of the brain platelet-activating factor acetylhydrolase. *J. Biol. Chem.* **27**: 31827-31832.
- Maraganore J.M., Merutka G., Cho W., Welches W., Kezdy F. J. e Heinrickson R. L., (1984). A new class of phospholipase A₂ with lysine in place of aspartate 49. *J. Biol. Chem.* **259**: 13839-13843.
- Maraganore J.M., Heinrikson R.L., (1986). The lysine-49 phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*. Relation of structure and function to other phospholipases A₂. *J. Biol. Chem.* **261**: 4797-4804.
- Matsuzawa A., Hattori K., Aoki J., Arai H., Inoue K., (1997). Protection against oxidative stress-induced cell death by intracellular platelet-activating factor-acetylhydrolase II. *J. Biol. Chem.* **272**: 32315-32320.
- Mitsuishi M., Masuda S., Kudo I., Murakami M., (2006). Droup V and X secretory phospholipase A₂ prevents adenovial infection in mammalian cells. *Biochem. J.* **393**: 97-106.
- Miyamoto S. e Kollman P.A, (1992). SETTLE: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *J. Comp. Chem.* **13**: 952-962.
- Murakami M.T., Arruda E.Z., Tomaz A.D., Melo P.A., Martinez A.B., Calil-Eliás S., Lomonte B., Gutiérrez J.M., Arni R.K., (2005). Inhibition of Myotoxic Activity of *Bothrops asper* Myotoxin II by the Anti-trypanosomal Drug Suramin. *J. Mol. Biol.* **350**: 416-426.
- Nelson R.M., Long G.L., (1989). A general method of site-specific mutagenesis using a modification of the *Thermus aquaticus* polymerase chain reaction, *Anal. Biochem.* **180**: 147-151.

- Nakaema K K M e Sanches R, (1999). Fluorimetria no domínio da Frequência. *Quím. Nova*, **22 (3)**: 412 – 416.
- Otho T., Uozumi N., Hirabayashi T., Shimizu T., (2005). Identification of novel cytosolic phospholipase A₂s, murine cPLA₂ delta, epsilon and zeta, which form a gene cluster with cPLA₂ beta. *J. Biol. Chem.* **280**: 24576-24583.
- Packard B.Z., Toptygin D.D., Komoriya A. e Brand L., (1997). Design of profluorescent protease substrates guided by exciton theory. *Meth. Enzymol.* **278**: 15-25.
- Pande A.H., Qin S., Nemecek K.N., He X., Tatulian S.A., (2006). Isoform-specific membrane insertion of secretory phospholipase A2 and functional implications. *Biochem.* **45**: 12436-12447.
- Páramo L., Lomonte B., Pizarro-Cerdá J., Bengoechea J.A., Gorvel J.P., Moreno P., (1998). Bactericidal activity of Lys-49 and Asp-49 myotoxic phospholipase A2 from Bothrops asper snake venom: synthetic Lys49 myotoxin II-(115-129)-peptide identifies its bactericidal region. *Eur. J. Biochem.* **253**: 452-461.
- Pedersen J. Z., Arcuri B.F., Moreno R.D. e Rufini S., (1995). Phospholipase-like myotoxins induce rapid membrane leakage of non-hydrolyzable ether-lipid liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* **1190**: 177-80.
- Pieterse W.A., Vidal J.C., Volwerk J.J., de Haas G.H., (1974). Zymogen-catalyzed hydrolysis of monomeric substrates and the presence of a recognition site for lipid-water interfaces in phospholipase A2. *Biochem.* **13**: 1455-1460.
- Ramirez F. e Jain M. K., (1991). Phospholipases A₂ at the bilayer interface. *Prot. Struct. Func. Gen.* **9**: 229-239.
- Renetseder R., Brunie S., Dijkstra B.W., Drenth J., Sigler P.B., (1985). A comparison of the crystal structures of phospholipase A2 from bovine pancreas and Crotalus atrox venom. *J Biol Chem.* **260(21)**: 11627-34.
- Rickard A., Portell C., Kell P.J., Vinson S.M. e McHowat J., (2005). Protease-activated receptor stimulation activates a Ca²⁺-independent phospholipase A₂ in bladder microvascular endothelial cells. *Am. J. Physiol.: Renal, Physiol.* **288**: F714–F721.

- Rosenberg A.H., Lade B.N., Chui D.S., Lin S.W., Dunn J.J., Studier F.W., (1987). Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* **56(1)**:125-135.
- Rotenberg Y., Boruvka L., Neumann A.W., (1983). *Colloid Interface Sci.*, 83-169.
- Rufini S., Cesaroni P., Desideri R.F., Gubensek F., Gutiérrez J.M., Luly P., Maassoud R., Morero R. e Pedersen, J. Z., (1992). Calcium Ion Independent Membrane Leakage Induced by Phospholipase-like Myotoxins. *Biochem.* **31**: 12424-12430.
- Ruller R., Aragao E.A., Chioato L., Ferreira T.L., de Oliveira A.H., Sa J.M., Ward R.J., (2005). A predominant role for hydrogen bonding in the stability of the homodimer of bothropstoxin-I, A lysine49-phospholipaseA2. *Biochimie* **87(11)**: 993-1003.
- Ruller R., Ferreira T.L., de Oliveira A.H., Ward R.J., (2003). Chemical denaturation of a homodimeric lysine-49 phospholipase A2: a stable dimer interface and a native monomeric intermediate. *Biochem. Biophys.***411(1)**:112-20.
- Sambrook J., Fritsch E.F. e Maniatis T., (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory. Segunda Edição.
- Schaloske R.H., Dennis E.A, (2006). The phospholipase A(2) superfamily and its group numbering system. *Biochim. Biophys. Acta* **1761**: 1246-1259.
- Scott, D.L., Otwinowski, Z., Gelb, M.H. e Sigler, P.B. (1990a). Crystal structure of bee venom phospholipase A₂ in a complex with a transition state analogue. *Science* **250**: 1563-1566.
- Seilhamer J.J., Pruzanski W., Vadas P., Plant S., Miller J.A., Kloss J., Johnson L.K. (1989). Cloning and recombinant expression of phospholipase A2 present in rheumatoid arthritic synovial fluid. *J Biol Chem.* **264(10)**: 5335-5338.
- Song C., Chang X.J., Bean K.M., Proia M.S., Knopf J.L., Kriz R.W., (1999) Molecular characterization of cytosolic phospholipase A₂-beta. *J. Biol. Chem.*, **274**: 17063-17067.
- Song K., Zhang X., Zhao C., Ang N.T., Ma Z.A.,(2005). Inhibition of Ca²⁺-independent phospholipase A₂ results in insufficient insulin secretion and impaired glucose tolerance. *Mol. Endocrinol.* **19**: 504-515.

- Stewart A., Ghosh M., Spencer D.M., Leslie C.C., (2002). Enzymatic properties of human cytosolic phospholipase A₂ gamma. *J. Biol. Chem.* **277**: 29526-29536.
- Studier F.W., Moffatt B.A., (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189 (1)**: 113-130.
- Studier F.W., Rosenberg A.H., Dunn J.J., Dubendorf J.W., (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**: 60-89.
- Szoka F. e Papahadjopoulos D., (1978). Formation of large unilamellar vesicles by reverse phase evaporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**: 4194-4198.
- Thunnissen M.M.G.M., Elso A.B., Kalk K.H., Drenth J., Dijkstra B. W., Kuipers O. P., Dijkman R., de Haas G. H. e Verheij H.M., (1990). X-ray structure of phospholipase A2 complexed with a substrate-derived inhibitor. *Nature* **347**: 689-691.
- Tsai Y.C., Yu B.Z., Wang Y.Z., Chen J., Jain M.K., (2006). Desolvation map of the surface of phospholipase A2. *Biochim. Biophys. Acta* **1758**: 653-665.
- Uozumi N.e Shimizu T.,(2002) Roles for cytosolic phospholipase A₂ alpha as revealed by gene-targeted mice, Prostaglandins Other Lipid Mediators 68 – 69, 59 – 69.
- Vacklin H.P., Tiberg F., Fragneto G., Thomas R.K., (2005). Phospholipase A2 hydrolysis of supported phospholipid bilayers: a neutron reflectivity and ellipsometry study. *Biochem.* **44**: 2811-2821.
- van Deenen L.L.M e de Haas G.H., (1963). The substrate specificity of phospholipase A₂. *Biochem. Biophys. Acta* **70**: 538-553.
- van den Bergh C.J., Slotboom A.J., Verheij H.M., de Haas G.H., (1989). The role of Asp-49 and other conserved amino acids in phospholipases A2 and their importance for enzymatic activity. *J Cell Biochem.* **39(4)**: 379-90.
- Verheij H.M., Slotboom A.J., de Haas G.H., (1981). Structure and function of phospholipase A2. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* **91**: 91-203.

- Vivian J.T. e Callis P.R. Mechanism of Tryptophan Fluorescence Shifts in Proteins. *Biophys. Journal* **80**: 2093-2109.
- Ward R.J., de Azevedo JR W.F. and Arni R.K., (1998a). At the interface: crystal structures of phospholipases A₂. *Toxicon* **36(11)**: 1623-1633.
- Ward R.J., Chioato L., de Oliveira A.H., Ruller R., Sa, J.M., (2002). Active-site mutagenesis of a Lys49-phospholipase A₂: biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis. *Biochem J.* **362**: 89-96.
- Ward R.J., Monesi N., Arni R.K., Larson R.E. e Paço-Larson M.L, (1995). Sequence of a cDNA encoding bothropstoxin I, a myotoxin from the venom of *Bothrops jararacussu*. *Gene* **156**: 305-306.
- Ward R.J., Rodrigues Alves A., Rugierro Neto J., Arni R.K. and Casari J., (1998). A Sequence Space analysis of Lys49 phospholipases A₂: clues towards identification of residues involved in a novel mechanism of membrane damage and in myotoxicity. *Protein Engineering* **11**: 285-294.
- Weber G. e Shinitzky M., (1970). Failure of energy transfer between identical aromatic molecules on the excitation at the long wavelength edge of absorption spectrum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **65**: 823-830.
- Wei S., Ong W.Y., Thwin M.M., Fong C.W., Farooqui A.A., Gopalakrishnakone P., Hong W., (2003). Group IIA secretory phospholipase A₂ stimulates exocytosis and neurotransmitter release in pheochromocytoma-12 cells and cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience* **121**: 891-898.
- Yau W.M., Wimley W.C., Gawrisch K., White S.H., (1998). The preference of tryptophan for membrane interfaces. *Biochem.* **37**: 14713-14718.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)