

Universidade de São Paulo Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto Departamento de Química Programa de Pós-Graduação em Química

Efeito bactericida de Fosfolipases A₂-Lys49: o papel da região C-terminal na atividade de Bothropstoxina-I em membranas biológicas e artificiais.

Elisângela Aparecida Aragão

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2005



Universidade de São Paulo Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto Departamento de Química Programa de Pós-Graduação em Química

Efeito bactericida de Fosfolipases A₂-Lys49: o papel da região C-terminal na atividade de Bothropstoxina-I em membranas biológicas e artificiais.

Elisângela Aparecida Aragão

Orientador: Prof. Dr. Richard John Ward

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO-SP

2005

A Deus pela vida e por me iluminar sempre!!!!

"Tudo posso naquele que me fortalece". (FP 4.13)

Aos meus pais, Walter e Amélia, pela confiança, dedicação, carinho e amor que sempre me deram. Pela paciência nos momentos difíceis, pelos

seus esforços, incentivo e apoio durante esses anos.

MUITO OBRIGADA POR TUDO!!!!AMO VOCÊS!!!

Aos meus irmãos, Sandra, Waltinho e Henrique pelo carinho e amor que sempre cultivaram, pelo apoio e por me proporcionarem a oportunidade de estudar! Muito obrigada por tudo!!!! Sem vocês, nada disso seria possível!!!Amo vocês!!!

Aos meus cunhados, ou melhor, meus irmãos, Zé, Sílvia e Dri pelo incentivo, carinho e amor!!!Amo vocês!!!

Aos meus queridos sobrinhos, Matheus, Guilherme, Bianca, Vitor, Leonardo, Henrique, Jóse Arthur e Tathiana pelos momentos de descontração, alegria e carinho!!!!Amo muito vocês, meus "baixinhos"!!! **Ao Richard** pela amizade, por confiar na minha capacidade, pelo incentivo, compreensão com as minhas dificuldades e pela ótima orientação durante o desenvolvimento deste projeto. MUI TO OBRI GADA POR TUDO!!!!

À minha grande amiga Lucimara Chioato, pela qual tenho total admiração e carinho. Pela amizade, pelos momentos descontraídos, por sempre me incentivar e principalmente pelos ensinamentos durante todos esses anos. Pessoa fundamental durante todo o desenvolvimento do projeto. MUI TO OBRI GADA POR TUDO!!!!!Adoro você!!!

AGRADECIMENTOS

À FAPESP pelo apoio financeiro;

À CAPES pelo apoio financeiro ao laboratório;

À Pró-reitoria de pesquisa da Universidade de São Paulo pelo apoio financeiro ao laboratório;

Ao Prof. Dr. Roy Eduard Larson do Depto. de Biologia Celular e Bioagentes Patogênicos da FMRP - USP pelo uso de seu laboratório durante parte do desenvolvimento do projeto e aos seus alunos Helen, Renata, Vanessa, Diego e Cris;

Ao Prof. Dr. Marcelo Brocchi pelas sugestões e discussões sobre os ensaios bactericidas;

À Prof. Dr. Maria Elisabeth Darbello Zaniquelli pelas sugestões e correções da qualificação;

Ao Prof. Dr. Pietro Ciancaglini, pelo qual tenho grande admiração e carinho. Pela amizade, confiança, carinho e incentivo durante todo esse período, disponibilizando seu laboratório integralmente e por me aceitar como mais uma de seus pupilos. Muito obrigada por tudo!!!!!!!!!!

Ao Prof. Dr. Marcelo Baruffi da FCLRP-USP pela colaboração e incentivo nos experimentos de citometria de fluxo;

Ao Prof. Dr. João Santana da Silva e sua aluna de doutorado, Karen, pela colaboração e ajuda fundamental nos experimentos de citometria de fluxo;

Ao Prof. Dr. João Atílho Jorge pela colaboração, fornecendo-nos a cepa de *Micrococcus luteus* (ATCC 9341);

À Prof. Dr. Constance Oliver do Depto de Biologia Celular e Bioagentes Patogênicos pela colaboração e por disponibilizar o laboratório de microscopia eletrônica de transmissão para realização dos experimentos.

Em especial, aos técnicos Ivana Aparecida Borin, Milton Rosa Alves e Pita pela amizade e ajuda fundamental nos experimentos realizados e necessidades durante todo o projeto.

À técnica Silvia Andrade do Nascimento (Silvinha) pela ajuda nos experimentos, pelo incentivo, e principalmente pela amizade e carinho. Que saudade das nossas paradas pro cafezinho.....Muito obrigada minha amiga!!!!

Ao pessoal do laboratório de Microscopia da FMRP-USP, em especial, à Tuca, Teresa e o Zé pela atenção, amizade e pela eficiência e dedicação nos experimentos realizados!!!Muito obrigada pela ajuda!!!

Aos funcionários da secretaria da Química e da CPG da FFCLRP-USP, em especial, à Lâmia, Bel e André pela amizade e eficiência em todos os momentos. Muito obrigada!!!

Aos amigos de laboratório Tatiana Lopes Ferreira, Arthur Henrique Cavalcanti de Oliveira, Roberto Ruller, Laila Deliberto, Cíntia Araújo, Willian e Ana (que acabaram de chegar) pela ajuda no laboratório e na impressão da tese, pelas discussões, e pelos momentos de descontração. Valeu galera!!!Muito obrigada!!!

À aluna de doutorado Cristina da Silva Pranchevicius (Cris), pela qual tenho total admiração e carinho. Muito obrigada pela sua amizade!!! Que saudade dos nossos "happy hours"...muito bom!!!.

Aos amigos do meu segundo laboratório, Carolina, Tony, Mari, Hérica, Kátia, Ana Maria, Dudu, Roberto, Maitê, Diguinho e Pris, pelos quais tenho total admiração e carinho!!! Pela ajuda durante boa parte do projeto e pelos momentos felizes e descontraídos!!!Pelo cafezinho, baguetadas, baladas, enfim, se eu fosse enumerar não acabaria mais!!!!Muito obrigada por tudo!!!

Aos meus amigos de São Joca, Aline, Nina, Eliane, Carola, Vitinho, Vânia, Zezi, Édio e Arthur pela força e carinho durante todo esse período. Quero agradecer também pela paciência e muitas vezes ausência durante os momentos difícieis e pelas maravilhosas baladas, que proporcionaram momentos agradáveis e inesquecíveis. Valeu galera!!!

À minha amiga Ana Cyntia e família (Tia Mirian, Bio, Aline, Ju, Tia Su) pela amizade, carinho, atenção e paciência nos momentos difícieis. Muito obrigada por sempre me apoiarem nessa caminhada!!!!

Aos amigos do Departamento, Taís, Fernandona, Wagninho e Renes pela força e amizade tão bem humorada!!!!

Por fim, a todos os docentes, funcionários, técnicos e amigos da FFCLRP-USP que pela correria, esqueci de mencionar. O meu muito obrigado!!!

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	I
LISTA DE FIGURAS	II
LISTA DE TABELAS	IV
ABSTRACT	VI
RESUMO	VII
1. INTRODUÇÃO	1
Estrutura da PLA ₂ s dos grupos I e II	3
Fosfolipases A ₂ -Lys49 (PLA ₂ -Lys49)	7
Base estrutural das funções farmacológicas das PLA ₂ s-Lys49	9
Investigação dos determinantes estruturais do mecanismo bactericida de Bothropstoxina-I (PLA2-Lys49)	12
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1. Metodologia para obtenção das proteínas recombinantes tipo selvagem e mutadas de BthTx-I	16
3.1.1. Transformação em Escherichia coli DH5 α Ca ²⁺ competente	16
3.1.2. Extração do DNA plasmidial para transformação bacteriana	17
3.1.3. Expressão de BthTx-I recombinante em Escherichia coli BL21 (DE3){pLysS}	18
3.1.3.1. Preparação de células competentes de BL21 (DE3){pLysS}	19
3.1.3.2. Transformação de BL21 (DE3){pLysS} e indução de expressão	19
3.1.4. Isolamento dos corpos de inclusão	20
3.1.5. Modificação química de BthTx-I e solubilização dos corpos de inclusão	21
3.1.6. Renovelamento da BthTx-I	22
3.1.7. Purificação de BthTx-I recombinante tipo selvagem e mutadas	23

3.1.8. Dicroísmo circular	24
3.2. Metodologia das caracterizações bioquímica e biofísica das bases estruturais das atividades de BthTx-I	26
3.2.1. Atividade de liberação de calceína encapsulada em lipossomos	26
3.2.1.1. Preparação dos lipossomos	26
3.2.1.2. Estimativa da concentração de fosfato dos fosfolipídios	28
3.2.1.3. Liberação de calceína encapsulada em lipossomos	28
3.2.2. Atividade bactericida	30
3.2.2.1. Linhagem Gram-positiva: Micrococcus luteus (ATCC 9341)	30
3.2.2.2. Linhagem Gram-negativa: Escherichia coli (K12)	30
3.2.3. Fluorimetria	32
3.2.3.1. Avaliação da permeabilização da membrana externa de <i>Escherichia coli</i> com a sonda hidrofóbica <i>N</i> -fenil- <i>N</i> -naftilamina "NPN"	33
3.2.3.2. Avaliação da permeabilização da membrana citoplasmática de <i>Escherichia coli</i> com a sonda Sytox Green (SG)	33
3.2.4. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	34
3.2.5. Citometria de fluxo	35
4. RESULTADOS	38
4.1. Obtenção das proteínas recombinantes tipo selvagem e mutadas de BthTx-l	38
4.1.1. Purificação das proteínas recombinantes de BthTx-I	
4.1.2. Dicroísmo circular (CD)	39
4.2. Caracterizações das bases estruturais das atividades de BthTx-I	41
4.2.1. Avaliação do papel da região C-terminal de BthTx-I na atividade bactericida	a 41
4.2.1.1. Atividade bactericida contra linhagem Gram-positiva: Micrococcus luteus	41
4.2.1.2. Atividade bactericida contra linhagem Gram-negativa: Escherichia coli (K1	2)42

4.2.1.2.1. Efeito da concentração de células E.coli (K12) no efeito
bactericida de BthTx-I45

4.2.2. Investigação do mecanismo bactericida de BthTx-I contra linhagem E.coli (K12) através de um estudo de partição de sondas fluorescentes	48
4.2.2.1. Fluorimetria	48
4.2.2.1.1.Avaliação da integridade da membrana externa de <i>E.coli</i> com a sonda hidrofóbica <i>N</i> -fenil- <i>N</i> -naftilamina (NPN)	48
4.2.2.1.2. Avaliação da integridade da membrana citoplasmática de <i>E.coli</i> com a sonda Sytox Green (SG)	52
4.2.2.2. Citometria de fluxo	57
4.2.2.2.1. Avaliação da integridade da membrana citoplasmática de <i>Escherichia coli</i> com a sonda Sytox Green (SG)	57
4.2.3. Correlação entre as atividades Ca ²⁺ -independente de danificação de membranas artificiais e o efeito bactericida de BthTx-I	62
4.2.3.1. Atividade de liberação de calceína	62
4.2.3.1.1. Representação da localização dos determinantes estruturais de B	thTx-I64
4.2.3.2. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	67
5. DISCUSSÃO	70
5.1. Obtenção das proteínas recombinantes tipo selvagem e mutadas de Bth	Fx-I 70
5.2. Caracterizações das bases estruturais das atividades de BthTx-I	72
6. CONCLUSÕES	81
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

LISTA DE ABREVIATURAS

BaspMTII: miotoxina II de Bothrops asper BthTX-I: Bothropstoxina I C: núcleo polissacarídeo CD: dicroísmo circular cDNA: DNA complementar CFU: unidade formadora de colönias Cho: colina CPL: luz circulamente polarizada cPLA₂: fosfolipase A₂ citosólicas CS: superfície celular DAG: diacilglicerol DMPA: dimiristoil ácido fosfatídico DTNB: ácido 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzóico E. coli: Escherichia coli EDTA: ácido etilenodiamintetraácetico EP: espaço periplasmático EYPC: fosfatidilcolina de gema de ovo FA: ácido graxo FACS: citômetro de fluxo FMT: fotomultiplicador GdnHCI: hidrocloreto de guanidina HPLC: aparelho de cromatografia líquida em alta pressão i-face: sítio de reconhecimento interfacial iPLA₂: fosfolipase A₂ independente de Ca²⁺ IPTG: isopropil- β-D-tiogalactopiranosídeo IRS: sítio de reconhecimento interfacial kDa: quilodalton LA: ácido lipoteicóico LP: lipoproteína LPS: lipopolissacarídeo LysoPC: lisofosfolipídeo M. luteus: Micrococcus lysodeikticus

MC: membrana citoplasmática ME: membrana externa MET: microscopia eletrônica de transmissão MyoII: miotoxina II N: nucleóide NMR: ressonância magnética nuclear NPN: N-fenil-N-naftilamina NTSB: disódio-2-nitro-5-(tiosulfo)-benzoato PA: ácido fosfatídico PAF-AH: fator de agregação de plaquetasacetilhidrolase PC: parede celular P-Cho: fosfocolina PCR: reação em cadeia de polimerase pET: plasmídeo para expressão pela T7 RNA polimerase PG: peptídeoglicano PLA₁: fosfolipase A₁ PLA2-Asp49: fosfolipase A2 com resíduo de ácido aspártico na posição 49 PLA₂-Lys49: fosfolipase A₂ com resíduo de lisina na posição 49 PLA₂s: fosfolipases A₂ PLB: fosfolipase B PLC: fosfolipase C PLD: fosfolipase D PPP: proteína espaço periplasmático PR: porina Rec: BthTx-I recombinante tipo selvagem SG: Sytox Green sPLA₂: fosfolipase A₂ secretadas sn-2: seqüencialmente numerada no carbono 2 do fosfolipídeo UV:ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

FIGURA 1: Hidrólise de fosfatidilcolina pela PLA ₁ , PLA ₂ , PLB, PLC e PLD, e os respectivos produtos da reação1
FIGURA 2: Representação em fita da estrutura tridimensional de uma PLA ₂ de Crotalus atrox4
FIGURA 3: Mecanismo de tríade catalítica de PLA ₂ s6
FIGURA 4: Representação dos resíduos 27-33 e 49, que compreendem a alça de ligação do cálcio das classes I e II de sPLA ₂ s8
FIGURA 5: Traços de Cα da cadeia principal de Miotoxina II de <i>Bothrops asper</i> (linha vermelha) superpostos aos traços da cadeia principal de Bothropstoxina I de <i>Bothrops jararacussu</i> (linha azul)9
FIGURA 6: Esquema ilustrativo das diferenças na parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram -negativas
MATERIAIS E MÉTODOS
FIGURA 7: Esquema ilustrativo da desnaturação e modificação química de proteínas sob a forma de corpos de inclusão22
FIGURA 8: Diagrama de formação de lipossomos pelo método de evaporação de fase reversa
FIGURA 9: Esquema ilustrativo do teste de liberação de calceína encapsulada em lipossomo
FIGURA 10: Esquema ilustrativo do ensaio bactericida
FIGURA 11: Esquema ilustrativo dos ensaios fluorimétricos das sondas NPN e Sytox Gre en (SG) nos compartimentos celulares de <i>E.coli</i>
FIGURA 12: Representação esquemática de um citômetro de fluxo
RESULTADOS
FIGURA 13: Perfil de eluição da BthTx-I recombinante tipo selvagem e mutantes da cromatografia de troca catiônica em HPLC
FIGURA 14: Espectro de dicroísmo circular na região UV CD da proteína nativa, recombinante tipo selvagem e mutantes da região C-terminal e do sítio ativo de BthTx-I
FIGURA 15: Espectro de dicroísmo circular na região UV CD da proteína nativa e a mutante K127A40

FIGURA 16: Efeito bactericida de BthTx-I nativa contra linhagem de <i>M. luteus</i>
FIGURA 17: Curva dose-resposta apresentada por BthTX-I contra 4x10 ⁵ células.mL ¹ de <i>E.coli</i> K1242
FIGURA 18: Efeito bactericida de Bothropstoxina I nativa, recombinante tipo selvagem (Rec) e mutantes da região C-terminal contra linhagem de <i>E. coli</i> (K12)43
FIGURA 19: Efeito bactericida na concentração fixa de 6 μg/mL de BthTx-I nativa (BthTx-I VEN), recombinante tipo selvagem (BthTx-I REC) e mutantes da região C-terminal contra linhagem <i>E. coli</i> (K12)44
FIGURA 20: Atividade de dose-resposta apresentada por 9 μg/mL de BthTx-I contra diferentes concentrações de <i>E.coli</i> (K12)45
FIGURA 21: Curva dose-resposta apresentada por BthTX-I contra 4x10 ⁵ e 4,5x10 ⁷ células.mL ⁻¹ de <i>E.coli</i> K1246
FIGURA 22: Efeito bactericida de BthTx-I nativa, recombinante tipo selvagem (rec) e mutantes da região Gterminal na concentração fixa de 6 μg/mL contra linhagem <i>E. coli</i> (K12)47
FIGURA 23: Aumento da emissão de fluorescência da sonda NPN devido a ação da proteína BthTx-I nativa contra a membrana externa de <i>E.coli</i>
FIGURA 24: Porcentagem de intensidade de fluorescência da sonda NPN na atividade de permeabilização da membrana externa de <i>E.coli</i> pela ação de BthTx-I50
FIGURA 25: Porcentagem de intensidade de fluorescência da sonda NPN na atividade de permeabilização da membrana externa de <i>E.coli</i> para as proteínas nativa (bth), recombinante tipo selvagem (rec) e mutantes, na concentração fixa de 13µg/mL
FIGURA 26: Cinética de emissão de fluorescência da sonda NPN em função do tempo, devido a ação de 13 μg/mL da proteína BthTx-I nativa, contra integridade da membrana externa de <i>E.coli</i>
FIGURA 27: Porcentagem de intensidade de fluorescência da sonda SG na atividade de permeabilização da membrana citoplasmática de <i>E.coli</i> apresentada por BthTx-I nas concentrações 0, 1, 3, 6, 9, 13 e 27 μg/mL53
FIGURA 28: Cinética de emissão de fluorescência da sonda Sytox Green (SG) em função do tempo, devido a ação de 27 µg/MI da proteína BthTx-I nativa, contra integridade da membrana citoplasmática de <i>E.coli</i> 54
FIGURA 29: Porcentagem de intensidade de fluorescência da sonda SG na atividade de permeabilização da membrana citoplasmática de <i>E.coli</i> para BthTx-I nas concentrações 0, 1, 3, 6, 9 e 27 µg/mL
FIGURA 30: Porcentagem de intensidade de fluorescência da sonda SG na atividade de permeabilização da membrana citoplasmática de <i>E.coli</i> para as proteínas nativa, recombinante tipo selvagem e mutantes, na concentração fixa de 5 µg/mL56

FIGURA 31: Histogramas da intensidade de fluorescência de Sytox Green (SG) para avaliar a atividade de BthTx-I na permeabilização da membrana citoplasmática de <i>E.coli</i> , através de citometria de fluxo
FIGURA 32: Porcentagem de permeabilização da membrana citoplasmática de células <i>E.coli</i> pela ação de BthTx-I, nas concentrações 0, 3, 5, 9, 13 e 27 μg/mL, medida através da citometria de fluxo
FIGURA 33: Porcentagem de permeabilização da membrana citoplasmática de <i>E.coli</i> pela ação das mutantes da região C-terminal de BthTx-I, na concentração fixa de 5 μg/mL monitorada pela citometria de fluxo60
FIGURA 34: Comparação da porcentagem de inibição de CFU demonstrada pelos ensaios bactericidas com a porcentagem de permeabilização da membrana citoplasmática de <i>E.coli</i> monitorada pela citometria de fluxo61
FIGURA 35: Cinética de emissão de calceína em 520 nm62
FIGURA 36: Liberação de calceína encapsulada em lipossomos63
FIGURA 37: Representações em fita da estrutura tridimensional de BthTx-I65
FIGURA 38: Representações da superfície sólida de BthTx-I66
FIGURA 39: Micrografias de <i>E.coli</i> , em condições do controle experimental, obtidas através da microscopia eletrônica de transmissão
FIGURA 40: Micrografias obtidas através da microscopia eletrônica de transmissão

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Substituições conservativas e não-conservativas	
introduzidas na região C-terminal de BthTx-I e a substituição	
conservativa na região do sítio ativo da proteína1	15

Código 1 letra	Código 3 letras	nome
А	Ala	Alanina
В	Asx	Asparagina ou aspartato
С	Cys	Cisteína
D	Asp	Aspartato
Е	Glu	Glutamato
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
Н	His	Histidina
Ι	Ile	Isoleucina
Κ	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
М	Met	Metionina
Ν	Asn	Asparagina
Р	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
Т	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptofano
Y	Tyr	Tirosina
Z	Glx	Glutamina ou glutamato

NOMENCLATURA E ABREVIATURA DE AMINOÁCIDOS

Abstract

Phospholipases A₂ (PLA₂ - EC 3.1.1.4) catalyze the hydrolysis of acid ester bonds at the *sn*-2 position of glycerophospholipids liberating fatty acids and lysophospholipids as catalysis products. Lysine 49 phospholipase A₂ (Lys49-PLA₂) are isolated from the venom of viperid snakes, and in these proteins, the aspartic acid at position 49 is replaced by a lysine, resulting in the elimination of hydrolytic activity against phospholipid substrates. Despite the absence of catalytic activity, these Lys49-PLA₂s present various pharmacological properties and furthermore damage artificial membranes by a Ca²⁺-independent mechanism. Lys49-PLA₂s form homodimers in solution, and crystallographic and spectroscopic studies of the bothropstoxin-I (BthTx-I), a Lys49-PLA₂ isolated from venom of *Bothrops jararacussu*, reveal that a quaternary structure transition in the homodimer results in a change in the position of the C-terminal loop of the protein, suggesting the involvement of this region in the Ca²⁺independent membrane damaging activity. A role for the C-terminal region of Lys49-PLA₂ has also been suggested for the bactericidal activity of theses proteins, and using BthTx-I one as a model system, the present study investigates the possible correlation and between the Ca²⁺-independent membrane damaging and the bactericidal activities.

The bactericidal effect of native BthTx-I and site-directed mutants of the C-terminal loop was evaluated using the Gram negative bacteria *E. coli* strain K12. Both the native and wild type recombinant BthTx-I presented a high bactericidal activity at a concentration of 5 µg/mL, whereas the mutants Y117W, Y119W, K122A and F125W showed significantly reduced the bactericidal effects, showing a correlation between the structural determinants of the bactericidal and membrane damaging activities. The fluorescent probe NPN was used to evaluate the integrity of the external membrane of the bacterial cells after exposure to the BthTx-I and mutants. The permeabilization of the external membrane is complete within 2 minutes, and neither the kinetics nor the extent of membrane damage was influenced by mutagenesis in the C-terminal region. The fluorescent probe Sytox Green (SG) was used to evaluate the integrity of the bacterial plasma membrane, an event which showed a significantly slower kinetic, with a maximum effect observed after two hours exposure to the BthTx-I. Furthermore, the extent of the membrane damage is influenced by mutagenesis in the C-terminal loop, and the structural determinants for the bactericidal activity of BthTx-I are the same as those that determine the permeabilization of the bacterial plasma membrane. Evidence obtained using flow cytometry and transmission electron microscopy support of the suggestion that the C-terminal region of BthTx-I is an important structural determinant of the plasma membrane damaging bactericidal activities.

Resumo

As fosfolipases A₂ (EC 3.1.1.4) catalisam a hidrólise das ligações ácido-éster na posição sn-2 de glicerofosfolipídios liberando, como produto da catálise, ácidos graxos e lisofosfolipídios. Membros da sub-família de fosfolipases A₂-Lisina49 (PLA₂-Lys49), isolados de venenos de serpentes Viperidae mostram uma substituição do resíduo de aspartato na posição 49 por uma lisina, com a eliminação concomitante da atividade hidrolítica contra fosfolipídeos. Apesar da ausência de atividade catalítica, as PLA2-Lys49 apresentam propriedades farmacológicas variadas incluindo miotoxicidade, e danifica membranas artificiais por um mecanismo Ca²⁺-independente, que não envolve hidrólise de fosfolipídeos. As PLA₂-Lys49 formam homodímeros em solução, e estudos cristalográficos e espectroscópicos de Bothropstoxina-I, uma PLA₂-Lys49 do veneno de Bothrops jararacussu, revelaram que a transição na estrutura quaternária do dímero provoca a mudança de posição da região C-terminal, apoiando a sugestão do envolvimento desta região no modelo proposto de danificação da membrana Ca²⁺-independente. Um papel para a região Cterminal das PLA₂-Lys49 também foi sugerido na atividade bactericida observada para esta proteína, e o presente estudo investiga uma possível correlação entre a atividade de danificação de membranas Ca²⁺-independente e o efeito bactericida.

O efeito bactericida de BthTx-I e mutantes da proteína na região Gterminal foi avaliado contra bactéria Escherichia coli (K12). A BthTx-I nativa e recombinante tiposelvagem apresentaram alta atividade bactericida com uma concentração de 5 µg/mL, porém as mutantes Y117W, Y119W, K122A e F125W reduziram significativamente este efeito, mostrando uma correlação entre os determinantes estruturais das atividades bactericida e de danificação em membranas artificiais. Na tentativa de correlacionar o mecanismo de danificação de membranas artificiais com a atividade bactericida de BthTx-I contra linhagem E.coli (K12), um estudo por partição de sondas fluorescentes em compartimentos celulares específicos foi realizado. A sonda hidrofóbica N-fenil-N-naftilamina (NPN) foi utilizada para avaliar a integridade da membrana externa da bactéria e a sonda Sytox Green (SG) para avaliar a integridade da membrana citoplasmática bacteriana. A cinética de permeabilização da membrana externa é rápida e não foi influenciada por mutagênese da região C-terminal da proteína. Entretanto, a cinética de permeabilização da membrana plasmática mostrou-se lenta, com um efeito máximo de 2 horas de ação e identificou os mesmos determinantes estruturais como os identificados para a atividade bactericida de BthTx-I. Resultados obtidos pelas técnicas de citometria de fluxo e microscopia eletrônica de transmissão auxiliaram os dados evidenciando a importância da região C-terminal de BthTx-I na atividade bactericida contra linhagem E.coli.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO.

As fosfolipases (PLAs) são enzimas que degradam especificamente fosfolipídeos e estão nomeadas como A₁ (PLA₁), A₂ (PLA₂), B (PLB), C (PLC) e D (PLD) de acordo com a ligação hidrolisada no fosfolipídeo (figura 1). As fosfolipases A₂ (PLA₂s, ou fosfatidil-acil hidrolases EC 3.1.1.4) catalisam especificamente a hidrólise das ligações ácido-éster na posição *sn-2* de glicerofosfolipídios liberando, como produto da catálise, ácidos graxos e lisofosfolipídio (VAN DEENAN & DE HAAS, 1963). Estas enzimas mostram uma atividade acentuada sobre lipídeos em agregados micelares e lamelares, ambos em membranas ou em outras interfaces água-lipídeo (RAMIREZ E JAIN, 1991). As PLA₂s têm sido alvo de muitos estudos, uma vez que estão envolvidas em uma ampla variedade de processos fisiológicos incluindo digestão fosfolipídica, remodelagem da membrana, defesa do hospedeiro e participação em processos patofisiológicos através da produção de mediadores lipídicos tais como prostaglandinas e leucotrienos.



FIGURA 1: Hidrólise de fosfatidilcolina pela PLA₁, PLA₂, PLB, PLC e PLD, e os respectivos produtos da reação (em parênteses). As fosfolipases A₂ hidrolisam especificamente a ligação éster *sn2* de fosfolipídios e liberam ácido graxo e lisofosfolipídio, como produtos da catálise. Cho, colina; DAG, diacilglicerol; P-Cho, fosfocolina, FA, ácido graxo. Em verde estão destacados os ácidos graxos *sn*-1 e *sn*-2 e em azul o grupo polar colina associado ao fosfato.

Inicialmente, as PLA₂s foram divididas em dois grupos com base na posição das ligações dissulfeto, alças únicas e extensões na cadeia polipeptídica (DAVIDSON E DENNIS, 1990). Atualmente, as PLA₂s são classificadas em 11 grupos distintos (SIX E DENNIS, 2000), sendo agrupadas mediante sua localização, regulação, mecanismo, seqüência de aminoácidos e estrutura. A descoberta de uma nova PLA₂ isolada de células T-helper por HO e colaboradores (2001) levou ao estabelecimento do 12^o grupo.

Existem quatro principais subfamílias de fosfolipases A2: PLA2s secretadas (sPLA2), PLA₂s citosólicas (cPLA₂), PLA₂s independente de Ca²⁺ (iPLA₂) e as PAF-acetilhidrolases (PAF-AH). As PLA₂ secretadas compreendem os grupos I, II, III, V, IX, X, XI e XII. São enzimas interfaciais, de baixo peso molecular, dependentes de Ca2+ e são encontradas em plantas, mamíferos e em veneno de animais vertebrados e invertebrados. Estas enzimas estão implicadas na digestão fosfolipídica, geração de mediadores lipídicos, proliferação celular, exocitose, atividade bactericida, câncer e doenças inflamatórias. As sPLA₂s do grupo I são enzimas encontradas tanto no suco pancreático de mamíferos como no veneno de serpentes das famílias Elapidae e Hidrophidae. Apresentam peso molecular de 13 a 15 kDa e 14 resíduos de cisteínas que formam 7 pontes dissulfeto. Ao grupo II pertencem as sPLA₂s do veneno de serpentes das famílias Viperidae e Crotalidae e do fluido sinovial de mamíferos (grupo IIA), do veneno da víbora Gaboon (grupo IIB), do testículo de camundongos (grupo IIC), do baço e pâncreas de camundongo/humano (grupo IID), do útero, coração e cérebro de camundongo/humano (grupo IIE) e do embrião e testículo de camundongos (grupo IIF). São enzimas que apresentam peso molecular de 13-17 kDa e contêm de 6 a 8 pontes dissulfeto. As proteínas dos grupos I e II apresentam alta similaridade em suas seqüências de aminoácidos e alto grau de homologia estrutural. As sPLA₂s do grupo III incluem enzimas dos venenos de abelhas, lagartos e também são encontradas nos exudados inflamatórios e grânulos de plaquetas e mastócitos. O grupo V é composto de sPLA₂s encontradas em macrófagos, coração e pulmão de mamíferos e são expressas principalmente em resposta a

2

estímulos inflamatórios. Ao grupo IX pertencem as sPLA₂s isoladas do veneno de um gastrópodo marinho, e o grupo X compreende sPLA₂s isoladas do timo, baço e leucócito humano. O grupo XI apresenta sPLA₂s isoladas de plantas e finalmente ao grupo XII pertencem enzimas de 20 kDa isoladas de células T-helper.

As PLA₂s citosólicas compreendem o grupo IV composto de enzimas que apresentam de 61 a 114 kDa e são encontradas tanto no músculo esquelético e cardíaco de humanos (grupo IVC), no cérebro, coração e fígado de humanos (grupo IVB) quanto no fígado de rato e plaquetas de humanos (grupo IVA). As PLA₂s citosólicas têm recebido mais atenção como reguladoras da biossíntese do fator de agregação de plaqueta (PAF) e eicosanóides, devido à liberação seletiva de ácido araquidônico. Estas enzimas sofrem translocações dependentes de Ca²⁺ do citosol para as membranas do retículo endoplasmático e perinuclear, onde estão localizadas várias enzimas associadas com a síntese de eicosanoídes, como ciclooxigenases e lipoxigenases.

As iPLA₂ (grupo VI) exibem função central na remodelagem de fosfolipídios. São PLA₂s citosólicas de peso molecular entre 84-90 kDa, independentes de Ca²⁺ e são encontradas no músculo esquelético/cardíaco, testículo, linfócito e macrófago de humanos. As PAF-AHs (grupos VII e VIII) pertencem a um subtipo de fosfolipase A₂ que degrada especificamente PAF e lipídios oxidados relacionados. Os grupos VII e VIII compreendem enzimas com atividade de PAF acetilhidrolases sendo pertencentes ao grupo VII àquelas que apresentam de 40 a 45 kDa e são encontradas tanto no plasma quanto intracelularmente no fígado e rim de humano/bovino e ao grupo grupo VII aquelas com 26 kDa encontradas no cérebro humano.

Estrutura da PLA₂s dos grupos I e II.

As estruturas tridimensionais das proteínas dos grupos I, II e III na presença e ausência do cofator Ca²⁺ e também de inibidores da atividade catalítica foram resolvidas por

cristalografia de raio-X (SCOTT *et al.*, 1990a,b). Como apresentado na figura 2, as PLA₂s dos grupos I e II apresentam duas a hélices anti-paralelas conservadas, onde se localizam os resíduos do sítio ativo, associadas com uma alça rica em resíduos de glicina, que está envolvida na ligação do Ca²⁺ (SCOTT *et al.*, 1990a,b; ARNI & WARD, 1996).

Sabe-se que as PLA₂s de venenos apresentam uma ampla preferência por substratos fosfolipídicos, as quais são determinadas pela topologia de superfície específica da região da proteína que interage com a superfície da membrana. Estudos cristalográficos, fluorimétricos e de NMR propuseram uma superfície protéica de ligação interfacial comum para as PLA₂s. Esta superfície inclui o sítio ativo (RAMIREZ & JAIN, 1991; SCOTT & SIGLER, 1994) e nos grupos I/II é definida por uma fenda na superfície hidrofóbica altamente conservada que liga a cadeia de ácido graxo do substrato fosfolipídico, juntamente com um anel de resíduos carregados e polares. Esta superfície é denominada de sítio de reconhecimento interfacial, IRS (PIETERSON *et al.*, 1974) ou i-face (RAMIREZ & JAIN, 1991).



FIGURA 2 Representação em fita da estrutura tridimensional de uma PLA₂ de *Crotalus atrox* (BRUNIE *et al.*, 1985). Estrutura tridimensional típica das classes I e II de PLA₂s. As principais hélices e alças estão indicadas.

Segundo RENETSEDER e colaboradores (1985), as posições dos resíduos His48, Asp49, Tyr52 e Asp99 são altamente conservadas no sítio ativo dos dois grupos, sendo que resíduos análogos são encontrados na estrutura do grupo III. O grupo carboxila do resíduo de aspartato presente na posição 49, juntamente com três oxigênios carbonil da cadeia principal dos resíduos Tyr28, Gly30 e Gly32, estão envolvidos na ligação do Ca²⁺ (THUNNINSEN *et al.*, 1990), que funciona como um cofator no mecanismo de hidrólise (VERHEIJ *et al.*, 1981; SCOTT, *et al.*, 1990b). Este cofator orienta tanto o substrato fosfolipídico, como estabiliza o intermediário catalítico tetraédrico (SCOTT *et al.*, 1990b; THUNNISSEN *et al.*, 1990; SCOTT & SIGLER, 1994) e, na sua ausência, as PLA₂s são cataliticamente inativas.

O mecanismo proposto por VERHEIJ e colaboradores (1981) e recentemente revisado (BERG *et al.*, 2001) sugere que os resíduos Asp99, His48 e uma molécula de água formam uma tríade catalítica (figura 3A). A seqüência do mecanismo catalítico proposto ocorre em 3 etapas (figura 3B): (1) desprotonação da molécula de água pela díade catalítica His48/Asp99; (2) ataque nucleofílico na ligação éster *sn-2* do glicerofosfolipídio pela água desprotonada; e a formação do intermediário tetraédrico, que é estabilizado pelo cofator Ca²⁺; (3) e finalmente, colapso do intermediário da reação, com a liberação dos produtos da catálise, ácido graxo e lisofosfolipídio.



FIGURA 3: Mecanismo de tríade catalítica de PLA₂s (A) Representação em fita de uma PLA₂⁻ Asp49 de *Gloydius halys pallas* (ZHAO *et al.*, 1998); **(B)** Representação esquemática do mecanismo catalítico proposto para PLA₂s. Asp 99, His48 e uma molécula de água formam uma tríade catalítica, na qual a desprotonação da molécula de água pelo resíduo de His48 gera o ataque nucleofílico (ver texto para detalhes).

A análise das seqüências de aminoácidos de duas PLA₂s cataliticamente inativas isoladas dos venenos de Agkistrodon p. piscivorus e Bothrops atrox (MARAGANORE et al., 1984) mostrou que estas PLA₂s apresentam alto grau de similaridade com outras PLA₂s do grupo II e que a maioria dos resíduos do sítio ativo está conservada, incluindo a His48 e o Asp99. Entretanto, nestas PLA₂s o resíduo de ácido aspártico na posição 49 (PLA₂s-Asp49), invariável nas PLA2s cataliticamente ativas, está substituído por um resíduo de lisina (PLA2s-Lys49). As estruturas cristalinas dessas PLA₂s-Lys49 mostrou que o grupo-e-amino do resíduo Lys49, está localizado na posição ocupada pelo Ca²⁺ nas PLA₂s-Asp49 (HOLLAND et al., 1990; SCOTT et al., 1992; ARNI et al., 1995), impedindo a ligação do cofator e como conseqüência as PLA₂s-Lys49 são cataliticamente inativas (figura 4). Estudos de mutagênese sítio dirigida na PLA₂ do grupo IB de pâncreas suíno demonstraram que a substituição do resíduo de aspartato na posição 49 pelo de lisina também provoca perda da capacidade de ligação do cofator Ca2+ (LI et al., 1994), com conseqüente redução na atividade catalítica da enzima cerca de 25.000 vezes (VAN DER BERGH et al., 1989). Segundo LOMONTE e colaboradores (2003), trinta e cinco PLA₂s foram isoladas do veneno de serpentes e não apresentam ou mantêm atividade catalítica residual.



FIGURA 4 Representação dos resíduos 27-33 e 49, que compreendem a alça de ligação do cálcio das classes I e II de sPLA₂s (WARD *et al.*, 1998). (A) PLA₂-Asp49 de *Naja naja atra*, ilustrando que a coordenação pentagonal bipiramidal do Ca²⁺ é concluída por interações dos átomos de oxigênio carbonil da alça de ligação de cálcio, átomos de oxigênio carboxil de Asp49 e duas moléculas de água. (B) PLA₂-Lys49 de *Bothrops pirajai*, no qual o átomo de № da cadeia lateral da Lys49 ocupa a posição do íon Ca²⁺ formando ligações de hidrogênio.

Embora sem atividade catalítica fosfolipásica, a interação da PLA₂-Lys49 com membranas de lipossomos provoca uma rápida liberação do conteúdo aquoso dos mesmos. Essa liberação é independente de Ca²⁺ e ocorre sem atividade hidrolítica fosfolipásica (RUFINI *et al.*, 1992; PEDERSEN *et al.*, 1995, DE OLIVEIRA *et al.*, 2001, WARD *et al.*, 2002). Na natureza, as PLA₂s-Lys49 existem em solução em formas diméricas (FRANCIS *et al.*, 1991; DA SILVA GIOTTO *et al.*, 1998; DE OLIVEIRA *et al.*, 2001). Estudos cristalográficos e espectroscópicos de BthTx-I, uma PLA₂-Lys49 do veneno de *Bothrops jararacussu*, mostraram que a interface dos monômeros forma uma "dobradiça" que resulta nas formas "aberta" e "fechada" do dímero (figura 5). Demonstrou-se que essa transição na estrutura quaternária do dímero provoca a mudança de posição da região C-terminal (DA SILVA GIOTTO *et al.*, 1998), sugerindo o envolvimento desta região no modelo proposto de danificação da membrana Ca²⁺-independente.



FIGURA 5: Traços de Ca da cadeia principal de Miotoxina II de *Bothrops asper* (linha vermelha) superpostos aos traços da cadeia principal de Bothropstoxina I de *Bothrops jararacussu* (linha azul). (A) estrutura dimérica "aberta" e (B) estrutura dimérica "fechada". O movimento relativo dos monômeros resulta no deslocamento da região C-terminal por uma distancia de 13 Å na conformação fechada.

Base estrutural das funções farmacológicas das PLA2s-Lys49.

"In vivo", as PLA₂s-Lys49 induzem rapidamente mionecrose local, formação de edema (LOMONTE & GUITIÉRREZ, 1989, OWNBY *et al.*, 1999), citólise de uma grande variedade de tecidos celulares (LOMONTE *et al.*, 1994a,b), e também exibem atividade bactericida direta (PÁRAMO *et al.*, 1998, SOARES *et al.*, 2000b). Além da função catalítica, muitas PLA₂s do veneno de serpentes do grupo II apresentam propriedades farmacológicas

variadas como miotoxicidade (MEBS, 1986; GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1995), neurotoxicidade pré-sináptica (CHANG *et al.*, 1977), cardiotoxicidade (FLETCHER *et al.*, 1981) e agregação de plaquetas (GERRARD *et al.*, 1993; YUAN *et al.*, 1993). Além disso, estas PLA₂s evocam inflamação local e dor (TEXEIRA *et al.*, 1994, 2003; CHACUR *et al.*, 2003, 2004). Embora os mecanismos através dos quais as PLA₂s causam tais efeitos sejam ainda pouco conhecidos, a função catalítica não é necessária para algumas destas propriedades farmacológicas (LOMONTE *et al.*, 1994b; PÁRAMO *et al.*, 1998, SOARES *et al.*, 2000; CHACUR *et al.*, 2003, 2004).

Ainda não foi esclarecida qual seria a base estrutural das funções biológicas apresentadas pelas PLA₂s de veneno. Várias evidências sugerem que estas atividades podem ser mediadas por interações entre PLA₂s de veneno e receptores de PLA₂s endógenas sobre a membrana de células alvo (LAMBEAU & LAZDUNSKI, 1999; HANASAKI & ARITA, 1999; VALENTIM & LAMBEAU, 2000). Por outro lado, um mecanismo envolvendo a estrutura quaternária de Bothropstoxina I (BthTx-I), uma PLA₂-Lys49 do veneno de *Bothrops jararacussu*, explica o aumento da permeabilidade sobre membranas artificiais, sendo este mecanismo independente da atividade catalítica e da interação da proteína com aceptores (DA SILVA GIOTTO *et al.*, 1998).

Algumas evidências sugerem que agrupamentos de resíduos carregados positivamente/hidrofóbicos encontrados na superfície de várias proteínas e peptídeos podem interagir com membranas biológicas para formar estruturas com capacidade para penetrar na bicamada lipídica (SEGREST *et al.*, 1990). Nas PLA₂s-Lys49, a alça C-terminal apresenta alto conteúdo de resíduos positivamente carregados, como também de 3-4 resíduos de aminoácidos aromáticos (WARD *et al.*, 1998).

Experimentos realizados com Miotoxina II, uma PLA₂-Lys49 do veneno de *B. asper* (BaspMTII) mostraram que a ligação de heparina inibe a atividade citotóxica sobre células endoteliais (LOMONTE *et al.*, 1994b), e este efeito foi estudado através do uso de peptídeos

10

sintéticos. Um peptídeo (115-129) da região Cterminal, com alto conteúdo de resíduos positivamente carregados, mostrou ter habilidade para reproduzir o efeito citolítico e miotóxico da BaspMTII em altas concentrações e esta atividade foi inibida pela ligação da heparina. Além disso, estudos realizados por CHACUR e colaboradores (2003) mostraram que a atividade de hiperalgesia apresentada por Miotoxina II de *B. asper* também é causada pela região C-terminal, mas especificamente pelos resíduos positivos e hidrofóbicos presentes nas posições 115-129. Estudos feitos por PÁRAMO e colaboradores (1998) revelaram que a região C-terminal (resíduos 115-129) de PLA₂s-Lys49 isoladas do veneno de Viperidae também exibe uma importante função no efeito bactericida apresentado por estas miotoxinas, tanto sobre bactérias gram-negativas quanto gram-positivas.

Recentemente, estudos realizados por mutagênese sítio dirigida mostraram os aminoácidos da região Cterminal da BthTx-I de *Bothrops jararacussu* que contribuem ao sítio miotóxico e ao mecanismo de danificação de membranas (CHIOATO E WARD, 2003). A estratégia envolveu a substituição dos resíduos positivos da região 115-129 por alanina e dos resíduos de tirosina e fenilalanina da mesma região por triptofano. Uma seqüência linear de aminoácidos entre os resíduos Y117 e K122 foi identificada, onde a eliminação de carga positiva e a substituição conservativa do resíduo aromático diminuem o efeito miotóxico em relação à proteína nativa. As mesmas mutações foram avaliadas quanto ao efeito Ca²⁺-independente de danificação de membranas, e embora a região C-terminal tenha se mostrado importante para as duas atividades, a substituição de aminoácidos individuais resultou em diferentes efeitos sobre a miotoxicidade e danificação de membranas. A substituição de resíduos positivos na região 115 e 117 e na posição 122 diminuiu o efeito danificador de membranas, enquanto que as substituições na posição 118, 127 e 129 não tiveram efeito significativo (CHIOATO et al., 2002).

11

Investigação dos determinantes estruturais do mecanismo bactericida de Bothropstoxina-I (PLA₂-Lys49).

A figura 6 apresenta as diferenças significativas na composição da parede celular de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.



FIGURA 6: Esquema ilustrativo das diferenças na parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Abreviações: PG: peptídeoglicano; MC: membrana citoplasmática; LA: ácido lipoteicóico; CS: superfície celular; LPS (O: polissacarídeo O-específico; C: núcleo polissacarídeo; LA: lipídio A); PR: porina, LP: lipoproteína, PPP: proteína espaço periplasmático; T: proteína de transporte; ME: membrana externa.

A parede da bactéria Gram-positiva observada na microscopia eletrônica de transmissão é organizada em uma estrutura única, composta de 3 camadas, superfície celular (CS), peptídeoglicano (PG) e membrana citoplasmática (MC), enquanto a parede celular da bactéria Gram-negativa forma duas estruturas distintas, a membrana citoplasmática (MC) e a membrana externa (ME). Na Gram-negativa, entre a membrana externa e a membrana citoplasmática encontra-se o espaço periplasmático no qual está a camada de peptídeoglicano (PG) e externamente à membrana externa existe uma camada de lipopolissacarídeos (LPS). As disparidades existentes na composição da parede celular entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas podem influenciar significativamente o mecanismo de ação de agentes bactericidas.

As variantes PLA₂s-Lys49 do veneno de Viperidae apresentaram atividade bactericida sobre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (PÁRAMO *et al.*, 1998). A cinética de danificação de membrana foi avaliada pela transferência de uma sonda fluorescente hidrofóbica *N*-fenil-*N*-naftilamina (NPN) e sua atividade foi relatada, em parte, pela presença de combinações de aminoácidos básicos e hidrofóbicos próximos da região C-terminal da molécula, que compreende os resíduos de 115-129 (PÁRAMO *et al.*, 1998). Além disso, peptídeos sintéticos da região 115-129 de Miotoxina II de *Bothrops asper* reproduziram efeitos da proteína íntegra, fornecendo evidências a favor de um mecanismo bactericida que não relatou atividade catalítica na molécula de PLA₂ (PÁRAMO *et al.*, 1998).

Estudos na literatura sobre atividade bactericida das PLA₂s-Lys49 são descritivos, porém não existe um modelo consistente que explique esse efeito. Baseado nas evidências que sugerem atividades farmacológicas independentes da atividade catalítica e que a região C-terminal está envolvida tanto no modelo proposto de danificação de membranas Ca²⁺- independente como também em uma série de outras atividades biológicas, nós propusemos investigar o mecanismo bactericida de Bothropstoxina-I (BthTx-I), uma PLA₂-Lys49 purificada do veneno de *Bothrops jararacussu*.

13

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS.

Sabendo-se da importância da região C-terminal de BthTx-I tanto no mecanismo de danificação de membranas Ca²⁺-independente como também em algumas funções farmacológicas, o presente trabalho tem como objetivo geral elucidar as bases estruturais da atividade bactericida apresentada por esta proteína, com os seguintes objetivos específicos:

1) Avaliar o efeito de mutagênese sítio dirigida na região C-terminal de BthTx-I na atividade bactericida contra linhagem Gram-negativa *Escherichia coli* (K12) mapeando os possíveis determinantes estruturais de BthTx-I para tal atividade;

2) Investigar o mecanismo bactericida de BthTx-I, através de uma avaliação do efeito das proteínas nativa e mutadas, na permeabilidade das membranas bacterianas, utilizando as sondas fluorescentes: (A) *N*-fenil-*N*-naftilamina (NPN) para avaliar o efeito de BthTx-I na permeabilização da membrana externa da bactéria *E. coli* (K12) e (B) Sytox Green para avaliar o efeito de permeabilização da membrana citoplasmática bacteriana;

 Avaliar se existe uma correlação entre as atividades de danificação Ca²⁺independente de membranas artificiais e o efeito bactericida de BthTx-I.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS.

Os mutantes, K115A, K116A, Y117W, R118A, Y119W, K122A, F125W, K127A, K129A da região C-terminal da proteína e o mutante H48Q na região do sítio ativo foram gerados dentro de um projeto para mapear o sítio miotóxico de BthTx-I (Projeto de Mestrado de Lucimara Chioato, processo 98/14568-7 (2001); CHIOATO *et al.*, 2002). Todos esses mutantes foram introduzidos no cDNA de BthTx-I por PCR mutagênico e clonados no vetor de expressão pET-3d. Posteriormente, foram transformados na linhagem de *E. coli* BL21(DE3){pLysS} para a expressão de BthTx-I recombinante. A tabela abaixo mostra as substituições conservativas e não-conservativas da região C-terminal de BthTx-I e a substituição na região do sítio ativo da proteína. A representação da proteína mutante K115A, por exemplo, indica que o resíduo de lisina na posição 115 foi substituído por uma alanina.

Substituições não-conservativas	Substituições conservativas
K115A	Y117W
K116A	Y119W
R118A	F125W
K122A	Sítio ativo: H48Q
K129A	

TABELA 1: Substituições conservativas e não-conservativas introduzidas na região C-terminal de BthTx-I e a substituição conservativa na região do sítio ativo da proteína. Considere a nomenclatura dos aminoácidos como: K (Lisina); A (Alanina); R (Arginina); Y(Tirosina); F (Fenilalanina) e W (Triptofano).
3.1. METODOLOGIA PARA OBTENÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES TIPO SELVAGEM E MUTADAS DE BTHTX-I.

3.1.1. Transformação em *Escherichia coli* DH5a Ca²⁺competente.

O processo de transformação ocorre quando o DNA plasmidial de interesse é internalizado pela bactéria. Para que a internalização seja favorecida, é necessário que a bactéria passe por mudanças fisiológicas, tornando-se competente. As técnicas para tornálas competentes envolvem tratamento com soluções como cloreto de cálcio e mudanças bruscas de temperatura, que alteram a permeabilidade da parede celular. A transformação do vetor recombinante pET-3d foi realizada em células competentes da linhagem de *E.coli* DH5a.

A preparação de células DH5 α competentes foi feita através do inóculo de algumas células DH5 α em meio LB sólido, para posteriormente serem incubadas por cerca de 12 horas a 37°C. Algumas colônias foram inoculadas em 5 mL de meio LB a 180rpm, 37°C por 12 horas. Todo conteúdo foi transferido para 500mL de meio e incubado a 37°C entre 2 a 3 horas, sob agitação de 180 rpm, até atingir a densidade óptica de 0,3 em 600 nm. Em seguida, a cultura foi incubada por 5 minutos no gelo e centrifugada a 1200 x g, em 4°C, por 10 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado celular, por leve agitação, foi ressuspendido em 100 mL do tampão de competência (CaCl₂ 60 mM, PIPES 10 mM e glicerol 15%) gelado. A centrifugação foi repetida e o precipitado celular ressuspendido foi mantido em gelo por 30 minutos. Após centrifugação a 4°C, 3000 rpm por 10 minutos, o precipitado celular foi ressuspendido em um volume final de 12 mL de tampão e as células, agora competentes, distribuídas em alíquotas de 50 µL. As mesmas foram estocadas a -70°C até o uso.

A transformação celular se processou da seguinte forma: a cada tubo de 50μ L de células competentes, adicionou-se uma mistura de 2μ L de DNA plasmidial; $0,5\mu$ L de CaCl₂ (1M); 1μ L de MgCl₂ (1M) e 46,5 μ L de água. Incubou-se a mistura por 20 minutos no gelo e por mais 10 minutos em temperatura ambiente. Os íons cálcio presentes na mistura têm a função de neutralizar as cargas negativas do DNA e da membrana bacteriana, facilitando a passagem do vetor pela mesma quando as células são transferidas do gelo para a temperatura ambiente. Em seguida, foram acrescentados em cada tubo, 900 μ L de meio LB e as células foram regeneradas por 1 hora a 37° C sob agitação a 180 rpm.

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 5000rpm por 2 minutos, onde cerca de 900 μ L do sobrenadante foram descartados e o restante (100 μ L) inoculado em placas de Petri com meio LB sólido contendo 100 μ g/mL de ampicilina. As células cresceram por 12 horas a 37°C. Depois desse período de crescimento, as placas foram retiradas da estufa e no final da tarde duas colônias foram inoculadas em tubos contendo 3 mL de LB normal com 100 μ g/mL de ampicilina, os quais foram crescidos por mais 12 horas, sob agitação de 180 rpm a 37°C.

3.1.2. Extração do DNA plasmidial para transformação bacteriana.

Três mL de cultura de DH5 α transformada foram distribuídos em tubos de 1,5 mL e centrifugados a 5000 rpm, a 25°C por 3 minutos. Subseqüentemente, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 100 µL de solução GET (50 mM de glicose, 10 mM de EDTA pH 8,0; 25 mM Tris-HCl). As células bacterianas foram lisadas com a adição de 200 µL de uma solução contendo 0,2 M de NaOH e 0,01 M de SDS por 5 minutos, e em seguida a precipitação do DNA genômico foi iniciada pela adição de 150 µL de acetato de potássio 3 M. A amostra foi centrifugada a 13000 rpm, em temperatura ambiente por 5 minutos e 400 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo de 1,5 mL. A

adição de 1 mL de etanol 100% e a incubação em gelo seco por 5 minutos precipitou o DNA plasmidial que foi subseqüentemente coletado por centrifugação a 13000 rpm, 4°C, por 5 minutos. O precipitado foi lavado pela adição de 1 mL de etanol 70%, e o sobrenadante descartado. O RNA bacteriano foi eliminado pela incubação do DNA plasmidial em 100 μ L de RNAse A (200 μ g.mL⁻¹) durante 3 horas. Foram acrescentados 50 μ L de fenol/clorofórmio à amostra, a qual foi agitada em vortex e subseqüentemente centrifugada a 13000 rpm, 25°C por 5 minutos. A fase aquosa contendo o DNA plasmidial foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL, e o DNA foi precipitado pela adição de 10% de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e 2 vezes o volume de etanol 100% gelado. A amostra foi incubada por 5 minutos em gelo seco e centrifugada a 13000 rpm, por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 70%. Após completa secagem, o DNA plasmidial purificado foi ressuspendido em 30 μ L de TE (10 mM de Tris-HCl, 0,1 mM de EDTA, pH 8) e armazenado a -20°C.

3.1.3. Expressão de BthTx-I recombinante em *Escherichia coli* BL21 (DE3){pLysS} competente.

O vetor de expressão pET-3d, contendo as seqüências codificadoras mutadas de BthTx-I, foi utilizado para transformar *Escherichia coli* da linhagem BL21(DE3){pLysS} competente. A linhagem de *Escherichia coli* BL21(DE3){pLysS} é lisógena do bacterófago DE3, um derivado lambda que carrega um fragmento de DNA contendo o gene para T7 RNA polimerase sob controle do promotor lacUV5, que é induzido por isopropil-β-D-thiogalactopiranosídeo (IPTG). A adição de IPTG numa cultura de bactérias em crescimento induz a expressão da T7 RNA polimerase, que por sua vez reconhece o promotor T7 presente no vetor e transcreve o DNA inserido do plasmídeo de expressão (STUDIER &

18

MOFFAT, 1986). As PLA₂s recombinantes sintetizadas por esta linhagem encontram-se sob a forma de corpos de inclusão insolúveis dentro do citoplasma da bactéria.

3.1.3.1. Preparação de células competentes de BL21 (DE3){pLysS}.

A preparação das células competentes iniciou-se através do inóculo de bactérias *E.coli* da linhagem BL21(DE3){pLysS}, em meio HDM sólido (15 g.L⁻¹ triptona, 25 g.L⁻¹ extrato de levedura, pH 7,5) contendo 34 μ g/ml de cloranfenicol e, posteriormente, foram incubadas a 37°C durante 12 horas. Em torno de 3-5 colônias foram inoculadas em 5 mL de HDM líquido e incubadas sob agitação a 180 rpm e 37°C durante aproximadamente 12 horas para fornecer um pré-inóculo. Todo o conteúdo deste pré-inóculo foi transferido para 500 mL de HDM líquido, ficando sob agitação a 180 rpm e 37°C até atingir a densidade óptica de 0,3 em 600 nm (cerca de 2 horas). A cultura foi incubada por 5 minutos no gelo. Após centrifugação a 4°C, 3000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 100 mL de tampão (CaCl₂ 60 mM, PIPES 10 mM e glicerol 15%). O homogeneizado foi novamente centrifugação por 10 minutos a 3000 rpm, 4°C e o precipitado ressuspendido em 100 mL de tampão. O homogeneizado foi incubado em gelo por 30 minutos e a centrifugação repetida. Juntou-se o precipitado originado em cada um dos tubos e ressuspendeu-se em 12 mL de tampão final. As células competentes foram distribuídas em alíquotas de 50 µL e estocadas a -70°C.

3.1.3.2. Transformação de BL21 (DE3){pLysS} e indução de expressão.

Após a preparação das células competentes, a transformação nesta linhagem segue similarmente ao protocolo de transformação em DH5 α , porém possui algumas pequenas alterações. Em cada tubo de 50 µL de células competentes foram adicionados 2 µL de DNA plasmidial recombinante (0,1µg.mL⁻¹), 1,0 µL de 1M MgCl₂, 0,5 µL de 1M CaCl₂ e 46,5 µL de

água estéril. A mistura foi mantida no gelo por 20 minutos e em seguida a temperatura ambiente durante 10 minutos. A cada tubo foram adicionados 900 μ L de meio HDM contendo 10 mM de sulfato de magnésio e 20 mM de glicose para a regeneração celular, por 1 hora a 37°C sob a agitação de 180 rpm. Cerca de 50-100 μ L das células regeneradas foram plaqueados em HDM sólido contendo 100 μ g.mL⁻¹ de ampicilina, 34 μ g.mL⁻¹ de cloranfenicol e 10 mM de sulfato de magnésio. As células cresceram durante 12 horas a 37°C. Depois de 16 a 20 horas de crescimento, algum as colônias foram inoculadas em 400 mL de meio HDM contendo 100 μ g/mL de ampicilina, 34 μ g/mL de cloranfenicol e 4 mL de MgSO₄ (1M). A cultura foi incubada a 37°C sob agitação de 60 rpm, durante 12 horas, período no qual a fase logarítmica de crescimento é atingida. A expressão de BthTx-I foi induzida com 600 μ M de IPTG por 7 horas, a 37°C sob agitação de 250 rpm. A cultura foi centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado (corpo de inclusão) armazenado a - 20°C.

3.1.4. Isolamento dos corpos de inclusão.

Devido ao alto conteúdo de pontes dissulfeto, as proteínas de BthTx-I recombinante expressas são insolúveis no citoplasma celular, levando à formação desses agregados, cujo isolamento representou o primeiro passo da purificação das proteínas. O isolamento é necessário, pois as etapas de renovelamento subseqüentes são fortemente influenciadas pela presença de contaminantes, como lipídios, ácidos nucléicos, etc. Os corpos de inclusão foram tratados com tampão de lise (50mM de Tris-Cl, 20mM de EDTA, 0,5% de Triton X-100 e 0,4M de uréia, pH 8) para a eliminação de restos celulares da bactéria. O EDTA é utilizado para quelar os cátions bivalentes, inibindo desta maneira a atividade de proteases bacterianas. Após lise celular completa por ultra-sonicação em aparelho Sonic Dismembrator (Fisher scientific), a amostra foi centrifugada a 10000 rpm por 10 minutos, e o

sobrenadante contendo restos celulares descartado. Os corpos de inclusão foram feitos três ciclos de solubilizações com 60 mL, 40 mL e 10 mL do tampão, seguidas de sonicação para homogeneização da amostra e posterior centrifugação. Antes da última centrifugação, as amostras foram aliquotadas em tubos de 2 mL e os corpos de inclusão obtidos foram estocados em -20°C. O conteúdo de cada corpo de inclusão foi equivalente a aproximadamente 80 mL de cultura bacteriana.

3.1.5. Modificação química de BthTx-l e solubilização dos corpos de inclusão.

Os corpos de inclusão foram incubados por 1 hora em 500 μ L de uma solução contendo 4,8 M do agente desnaturante (tiocianato de guanidina) e NTSB (disódio 2-nitro-5-(tiosulfo)-benzoato). O reagente NTSB foi obtido a partir da reação do composto DTNB com sulfito de sódio (THANNHAUSER *et al.*, 1984). O agente desnaturante promove a solubilização dos corpos de inclusão, uma vez que rompe a camada de solvatação existente entre a solução e a proteína, desestabilizando as interações hidrofóbicas e conseqüentemente expondo æ pontes dissulfeto. Uma vez expostas, as pontes dissulfeto sofrem redução através dos grupos sulfito do NTSB. A adição de um grupo SO₃ as cisteínas aumenta a solubilidade das mesmas. O esquema é ilustrado na figura 7.



FIGURA 7: Esquema ilustrativo da desnaturação e modificação química de proteínas sob a forma de corpos de inclusão.

Após esse período, a amostra foi aplicada em uma coluna de filtração em gel (2 x 5 cm) contendo resina P-6 (Bio-Gel[®]), 200-400 mesh, previamente equilibrada com 2 M de cloreto de guanidina, 20 mM de Tris e 2 mM de EDTA, pH 8,0, segundo protocolo previamente descrito por WARD e colaboradores (2001). Esta etapa separa a proteína modificada, retirando o excesso de NTSB, como também reduz a concentração de GdnHCl de 4,8 M para 2 M. O pico de proteína eluído em cerca de 1,5 mL serviu como material inicial para o processo de redobramento.

3.1.6. Renovelamento da BthTx-I.

Para o processo de renovelamento das proteínas, fez-se necessário a incubação por 1 hora da proteína (~1,5 mL) em 15 μL de uma solução de 10 mM de cistina, 80 mM de cisteína, pH 7,5 diluída em Tris-HCl 25 mM. Posteriormente, esta solução foi diluída com Tris-HCl 25 mM para 2 mL e incubada por mais 1 hora. Em seguida, a amostra foi centrifufgada a 14000 rpm e o sobrenadante foi aplicado em coluna de filtração em gel (1,5 x 6 cm), contendo resina P-6 (Bio-Gel[®]), 200-400 mesh previamente equilibrada com tampão de renovelamento (25 mM Tris-HCl, 1 mM de cistina, 8 mM de cisteína e 0,3 M de hidrocloreto de guanidina, pH 8,0). O fluxo da amostra na coluna foi direcionado lentamente, durante 15 a 18 horas, com o intuito de evitar a formação de agregados de proteína e assim propiciar o renovelamento mais eficiente. Após esse período, as amostras foram eluídas em 5 mL do tampão (50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 1 mM de EDTA e 0,3 M de hidrocloreto de guanidina), aos quais foram adicionados 10 mL do mesmo tampão contendo 1 e 8 mM de cistina e cisteína, respectivamente. As amostras permaneceram sob agitação lenta por 2 dias em temperatura ambiente, e posteriormente foram purificadas.

3.1.7. Purificação de BthTx-I recombinante tipo selvagem e mutadas.

A BthTx-I foi purificada por cromatografia de troca catiônica. Utilizou-se uma coluna de dimensões 2x10cm previamente empacotada com resina SOURCE 15S (Amershampharmacia). Essa resina é fortemente aniônica e sua matriz apresenta grupos metil-sulfonato. O mecanismo de separação por cromatografia de troca catiônica é baseado nos diferentes graus de afinidade que substâncias básicas diferentes apresentam pela matriz, devido a densidade e distribuição das cargas sobre a superfície molecular. A coluna foi equilibrada com 20 mM de Tris-Cl pH 7,5 e a proteína eluída em um gradiente linear entre 0 e 2,0 M de NaCl, com fluxo de 1 mL.min⁻¹. A cromatografia foi realizada em HPLC (Shimadzu) previamente programado para um aumento de 0 a 100% do tampão salino em 20 minutos, sendo a absorbância do eluente monitorada em 280 nm. A pureza das amostras foi verificada por eletroforese utilizando-se gel de poliacrilamida 16%. Após a purificação, as proteínas BthTx-I recombinantes tipo selvagem e mutadas foram dialisadas em tampão 5 mM de Tris-HCl durante 24 horas e concentradas.

3.1.8. Dicroísmo circular.

Dicroísmo circular (CD) é uma técnica para o estudo de moléculas quirais em solução. O CD é por definição a diferença em absorção, *A*, da luz polarizada circularmente (CPL) à direita e à esquerda:

$CD = A_i - A_r$

O sinal de CD é observado em comprimentos de onda onde a amostra absorve fótons, e o sinal pode ser positivo ou negativo dependendo da orientação da molécula na amostra e a transição eletrônica que está sendo observada. Na prática, a maioria da espectroscopia de CD de proteínas envolve as regiões ultravioleta-visível do espectro. A ligação peptídica é rígida e planar, e a rotação em volta do C α é limitada por impedimento estérico das cadeias laterais dos aminoácidos vizinhos. Isso faz com que certas conformações da cadeia principal sejam energicamente favorecidas. O conjunto de arranjos das ligações peptídicas tem sinais bem definidos de CD, e a soma das contribuições resulta num espectro que é característico de cada proteína (GORE, 1998).

O espectro de CD de proteínas é geralmente medido dentro das regiões entre 250 e 300 nm (denominada região UV-próxima) e em comprimentos de onda menores do que 250 nm (UV-distante). O espectro de CD na região próxima é dominado por sinais das cadeias laterais aromáticas, embora transições de ligações dissulfeto também contribuam para a intensidade de absorção total. A absorção na região do UV-distante é dominada por transições eletrônicas da cadeia polipeptídica da proteína, mas algumas cadeias laterais também contribuem nesta região, especialmente se o conteúdo de α-hélices da proteína é baixo. Uma das utilizações da técnica de CD no estudo de proteínas é a avaliação da conformação e estrutura protéica. O espectro de CD da proteína nativa é a soma das porcentagens apropriadas de cada componente do espectro. A avaliação da estrutura secundária das proteínas recombinantes mutadas foi realizada em espectropolarímetro Jasco 810, em comprimentos de onda de 200 a 250 nm. Como cada proteína apresenta um padrão característico de sinal de CD, foram retirados espectros da proteína nativa e comparados aos espectros das proteínas recombinantes mutadas para avaliar se a mutação introduzida não causou alteração na estrutura secundária da proteína. Para cada medida, utilizou-se 5 µL de proteína de concentração desconhecida em 195 µL de tampão Hepes 20 mM, pH 7,0. Foi utilizada cubeta de quartzo 1mm e o sinal de CD obtido foi resultado de uma média de três medidas de cada amostra. O sinal obtido da análise para apenas tampão foi subtraído de todas as amostras. O valor de elipticidade (?) em 222 nm foi anotado e a concentração foi calculada de acordo com uma curva padrão de espectros de CD com concentrações crescentes de BthTx-I (10 a 500 µg.mL⁻¹). A amplitude do sinal de elipticidade em 222 nm foram plotados contra concentração para gerar uma curva padrão que foi utilizada para determinar a concentração de cada amostra de proteína utilizada.

3.2. METODOLOGIA DAS CARACTERIZAÇÕES BIOQUÍMICA E BIOFÍSICA DAS BASES ESTRUTURAIS DAS ATIVIDADES DE BTHTX-I.

3.2.1. Atividade de liberação de calceína encapsulada em lipossomos.

3.2.1.1. Preparação dos lipossomos.

A calceína ($C_{30}H_{26}N_2O_{13}$) PM = 622,5 (Sigma) é um fluoróforo cujo comprimento de excitação (λ ex= 490nm) e emissão (λ em = 520nm) são muito próximos. Assim, a emissão de uma molécula pode resultar na excitação de outra em um processo denominado "auto-supressão". Devido ao processo de auto-supressão, em concentrações altas (\geq 25mM) a luz fluorescente emitida por uma amostra é baixa, porém em soluções diluídas a intensidade da fluorescência aumenta. Portanto, os lipossomos carregados com uma alta concentração de calceína (50 mM) exibem uma intensidade de emissão de fluorescência baixa. Quando ocorre a danificação da membrana do lipossomo, a calceína encapsulada é liberada, diluindo-se na cubeta e em conseqüência a emissão da amostra aumenta cerca de 10 vezes.

Os lipossomos foram preparados pela técnica de evaporação de reverso de fase (SKOZA E PAPAHADJOPOULOS, 1978), que permite a manipulação da composição fosfolipídica da bicamada artificial. Uma mistura de 90% de fosfatidilcolina da gema de ovo (EYPC – Calbiochem PM: 625) e 10% de dimiristoil ácido fosfatídico (DMPA – Sigma PM=613,77) foi dissolvida em éter (10 mg/mL) e, em seguida, submetida à secagem por evaporação. Posteriormente, colocou-se mais 2 ml de éter para dissolvê-los novamente e adicionou-se 1 ml de solução para encapsulação (tampão 25 mM de calceína, 20 mM Hepes, 150 mM NaCl pH7,0). Sonicou-se (Sonicator XL-Misonix) no gelo por 2 minutos na presença deste tampão para formar uma emulsão de fase em reverso, na qual a solução aquosa foi encapsulada dentro de micelas reversas numa suspensão em éter. A fusão das micelas reversas foi induzida por uma evaporação lenta do éter (evaporador rotativo Tecnal),

resultando no "reverso" de fase (Figura 8). Essa mistura é incubada em banho a 45°C por 30 minutos produzindo lipossomos unilamelares de diâmetro $1\rightarrow 100 \ \mu m$.

Os lipossomos foram filtrados com uma membrana de policarbonato (400 nm), produzindo uma população de lipossomo homogênea e de diâmetro definido, e subseqüentemente, uma coluna de filtração em gel (Sephadex G-25, 1 x 10cm) foi usada para separar os lipossomos intactos contendo a sonda encapsulada da sonda livre. Como a filtração em gel dilui a solução de lipossomos, fez-se necessária a dosagem do fosfato das amostras com lipossomos. Esta dosagem serve para estimar a quantidade de fosfolipídios e dessa maneira, pode-se calcular a razão de toxina para fosfolipídio nos experimentos de liberação do marcador.



FIGURA 8: Diagrama de formação de lipossomos pelo método de evaporação de fase reversa. Os lipídios são dissolvidos em solventes apropriados e ficam solúveis (1), após a fixação na superfície (2) eles formam as micelas em fase reversa (3). Com a sonicação, elas formam os lipossomos pela fusão entre as micelas (4, 5 e 6).

3.2.1.2. Estimativa da concentração de fosfato dos fosfolipídios.

A dosagem de fosfato é muito sensível e permite a avaliação na faixa de 0,1 a 10 μ g.ml¹ de PO₄⁻³. A amostra de lipossomo (100 μ L) foi mantida a 300°C (banho de areia) em ácido perclórico 70% por 5 minutos. Após o resfriamento, foram adicionados 4,2 mL de água, 200 μ L de molibidato de amônio (Merck) 5% (Sigma) e 200 μ L 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 830 nm em cubeta de quartzo de 1cm de caminho óptico em espectrofotômetro Hitach U-2000. A curva padrão foi feita com amostras contendo 0, 2, 4, 6, 8 e 10 μ g de Na₂HPO₄.

3.2.1.3. Liberação de calceína encapsulada em lipossomos.

Os experimentos de liberação de calceína em lipossomos foram realizados em tampão 20 mM HEPES (Sigma) com 150 mM de NaCl (Merck) em pH 7,0 com 3 µg/ml de BthTx-I nativa, recombinante tipo selvagem e mutantes. Essa quantidade de toxina e lipossomo corresponde à proporção de uma molécula de BthTx-I para 250 moléculas de lipídio. Os experimentos foram realizados usando um espectrofluorímetro (Spectronic SLM 8100C), utilizando cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm, sob agitação. O comprimento de excitação foi em 480 nm e a emissão em 520 nm, sendo a abertura de excitação e emissão de 4 nm e a voltagem fotomultiplicadora de 600V em 25°C. O detergente Triton X-100 foi adicionado (0,1%) no final do processo de liberação para se obter a intensidade de fluorescência máxima de liberação da calceína encapsulada. A figura 9 mostra um esquema ilustrativo do ensaio de liberação de calceína encapsulada em lipossomos.



FIGURA 9: Esquema ilustrativo do teste de liberação de calceína encapsulada em lipossomo. (A) Os comprimentos de onda de excitação e emissão da molécula de calceína são muito próximos, por isso ocorre auto-supressão; (B) Perfil da liberação de calceína provocada pela adição da proteína em 20 segundos e da liberação máxima de calceína provocada pela adição de TRITON X100 em 170 segundos em um total de 200 segundos de ensaio.

3.2.2. Atividade bactericida.

O efeito bactericida de BthTx-I foi avaliado contra as bactérias Gram-negativa: *Escherichia coli* (K12) e Gram-positiva: *Micrococcus luteus* (ATCC 9341).

3.2.2.1. Linhagem Gram-positiva: *Micrococcus luteus* (ATCC 9341).

O teste realizado com a bactéria Gram-positiva, *Micrococcus luteus (M. lysodeikticus*-ATCC 9341), foi feito segundo o protocolo descrito por BEERS e colaboradores (2002). Em torno de 3-4 colônias de uma placa fresca cresceram por 12 horas a 37°C em 5 mL de meio LB líquido. Um mililitro dessa cultura foi inoculado em 50 mL de LB fresco e a cultura agitada a 180 rpm, 37°C até atingir densidade óptica de 0,45 em 600 nm. A cultura foi centrifugada a 6000 rpm por 10 minutos e o sedimento ressuspendido em 10 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M pH 7,4 contendo 1% de triptona, sendo ajustado para 2x10⁷ unidades formadoras de colônias (CFU).mL⁻¹ para determinação da atividade bactericida. Diferentes quantidades de toxina foram incubadas com 2x10⁶ células por 3 horas a 37°C. Em seguida, foi feita uma diluição serial das bactérias em LB sólido. O número das células viáveis foi analisado no dia seguinte, através da contagem de unidades formadoras de colônia (CFU) por placa de cultura.

3.2.2.2. Linhagem Gram-negativa: Escherichia coli (K12).

O teste realizado com a bactéria Gram-negativa, *Escherichia coli* (K12) foi feito segundo protocolo descrito por PÁRAMO (1998) e MARTÍNEZ DE TEJADA (1995). Em torno de 3-4 colônias de uma placa fresca foram inoculadas em 5 mL de meio LB e cresceram por 12 horas sob agitação. Um mililitro dessa cultura foi inoculado em 50 mL de LB e a cultura agitada a 180 rpm, 37°C até atingir densidade óptica de 0,7 em 660 nm. As bactérias foram diluídas em tampão fosfato de sódio 0,01 M pH 7.4 contendo 1% de triptona e ajustadas para

4,5x10⁸ unidades formadoras de colônias (CFU).mL¹. Diferentes quantidades de toxina foram incubadas com 4,5x10⁷ células por 2 horas a 37°C. Em seguida, uma diluição serial foi realizada, e as bactérias dispersas em LB sólido. A sobrevida das células foi contada no dia seguinte. A figura 10 representa o esquema ilustrativo do ensaio bactericida.



FIGURA 10: Esquema ilustrativo do ensaio bactericida. Considere tampão como controle negativo experimental (CFU = 100%).

3.2.3. Fluorimetria.

Para investigar o mecanismo bactericida de BthTx-I contra linhagem *E.coli* (K12) e a contribuição da região C-terminal dessa proteína para tal atividade, um estudo da partição de sondas fluorescentes em dois compartimentos celulares foi realizado, segundo metodologia descrita por PÁRAMO e colaboradores (1998). Diante da complexidade da composição da parede celular da bactéria, a sonda hidrofóbica *N*-fenil-*N*-naftilamina (NPN) foi utilizada para avaliar a integridade da membrana externa da bactéria *E.coli* (K12) e a sonda de viabilidade celular Sytox Green (SG) para avaliar a integridade da membrana citoplasmática bacteriana. A figura 11 mostra um esquema ilustrativo para os ensaios fluorimétricos realizados pelas sondas nos compartimentos celulares de *E.coli*.



FIGURA 11: Esquema ilustrativo dos ensaios fluorimétricos das sondas NPN e Sytox Green (SG) nos compartimentos celulares de *E.coli*. A partir da permeabilização na membrana externa da bactéria provocada por BthTx-I, a sonda NPN se liga a compartimentos hidrofóbicos e emite fluorescência. Após a atividade de BthTx-I na permeabilização da membrana citoplasmática bacteriana, a sonda SG intercala as ligações moleculares de DNA, emitindo fluorescência.

3.2.3.1. Avaliação da permeabilização da membrana externa de *Escherichia coli* com a sonda hidrofóbica N-fenil-N-naftilamina "NPN".

A sonda fluorescente *N*-fenil-*N*-naftilamina (NPN, Ferosa, Scharlau S.A.) foi utilizada para detectar alterações na permeabilidade da membrana externa da bactéria, uma vez que um aumento de eficiência quântica é observado quando a sonda é transferida do ambiente hidrofílico do solvente aquoso para o hidrofóbico da membrana interna (TRAIIBE E OVERATH, 1973 e PÁRAMO *et al.*, 1998). Na célula intacta, a NPN pode penetrar na bicamada da membrana externa. Portanto, na presença de um agente que perturbe a estrutura da membrana externa, a sonda passa a ter acesso à membrana interna, resultando em um aumento de intensidade total da emissão de fluorescência.

Células bacterianas na fase de crescimento exponencial foram centrifugadas a 6500 rpm, 4°C por 10 minutos e ressuspendidas em tampão 0,01 M de fosfato de sódio, pH 7.2, até densidade óptica final de 0,47 em 660 nm. Uma alíquota de 50 µL de cultura contendo 4,5x10⁷ células/mL foi transferida para uma cubeta contendo 950 µL do tampão. Após 10 segundos do início do experimento, foi adicionada uma mistura contendo 10µM da sonda NPN e concentrações variáveis de BthTx-I ou mutantes da região C-terminal. A mudança da intensidade de fluorescência da sonda NPN foi monitorada a 25°C no espectrofluorímetro (Spectronic SLM 8100C), com excitação em 350nm e emissão em 420nm. A cinética da partição da sonda NPN na membrana externa da bactéria foi medida entre 0 a 200 segundos.

3.2.3.2. Avaliação da permeabilização da membrana citoplasmática de *Escherichia coli* com a sonda Sytox Green (SG).

Sondas de viabilidade celular podem detectar mudanças no estudo fisiológico ou no metabolismo, tanto de células eucarióticas quanto de procarióticas. Células sadias excluem tais sondas e não se tornam fluorescentes, entretanto células mortas ou que sofreram alterações na integridade da membrana citoplasmática permitem a entrada do marcador que

se associa aos ácidos nucléicos, com um aumento conseqüente de fluorescência (MORTIMER *et al.*, 1999).

Células de *Escherichia coli* na fase de crescimento exponencial foram centrifugadas a 6500 rpm, 4°C por 10 minutos, ressuspendidas em tampão 0,01 M de fosfato de sódio com 1% de triptona, pH 7,4 e ajustadas para densidade óptica de 0,47 em 660 nm. Alíquotas de 50 μ L de cultura contendo 4,5x10⁷ células/mL foram incubadas com diferentes concentrações de BthTx-I nativa, recombinante tipo selvagem ou mutantes por 2 horas a 37°C. Dois controles experimentais foram utilizados: controle negativo (células apenas na presença de tampão) e controle positivo (células fervidas por 5 minutos). Após esse período, as amostras foram diluídas (1:10) com tampão e transferidas para uma cubeta. Depois de 10 segundos de início do experimento fluorimétrico, 5 μ g/mL da sonda SG (100 μ g/mL) foram adicionados às amostras. A mudança da fluorescência da sonda SG foi monitorada a 25°C no espectrofluorímetro (Spectronic SLM 8100C), com excitação em 488nm e emissão em 530nm e a medida da cinética da partição da sonda no citoplasma bacteriano foi medida entre 0 a 200 segundos.

3.2.4. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Um estudo ultra-estrutural de microscopia eletrônica de transmissão foi realizado com intuito de investigar possíveis alterações morfológicas na célula bacteriana provocadas pela BthTx-I. Populações de *Escherichia coli* (K12) em torno de 5 x 10⁸ células (1,5mL) foram incubadas com 25 µg/mL de BthTx-I em dois tempos diferentes: 30 minutos e 2 horas. Após esses períodos, as células foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 5 minutos a 25°C, fixadas em 500 µL de uma solução de glutaraldeído 3% por 2 horas no gelo. Posteriormente, as células foram centrifugadas novamente e ressuspendidas em 500 µL de tampão fosfato 0,1M. As amostras foram fixadas em uma solução de OsO₄ em 1% e cacodilato 0,2 M por 1 hora em

temperatura ambiente, e lavadas por duas vezes em tampão cacodilato 0,2M. Em seguida, as amostras foram desidratadas por 5 minutos com concentrações crescentes de 30, 50, 70, 90 e 95% de etanol e por mais três vezes em 100% de etanol P.A. com 10 minutos cada. As amostras foram incubadas em uma solução de resina Embed 812 e óxido de propileno (1:1), durante à noite sob agitação. Essa solução foi retirada e uma nova solução dessa mistura (3:1) foi adicionada às amostras, sob agitação por mais 4 horas. Após esse período, retirouse a solução e a resina pura foi adicionada às amostras e estas foram transferidas para cápsulas "Beem" no vácuo, com resina suficiente para cobrir o material. As cápsulas "Beem" foram completadas com resina pura e deixadas na estufa a 60°C por 72 horas para polimerização. Finalmente, cortes do material foram feitos em ultramicrótomo com lâminas de 0,5 µm e ultrafino com 600 nm. Posteriormente, o material foi colocado em grades de cobre e contrastados em acetato de uranila 4% por 30 minutos e em citrato de chumbo 0,3% por 3 minutos. As imagens foram realizadas em equipamento Phillips Modelo 208 no laboratório de Microscopia da FMRP-USP.

3.2.5. Citometria de fluxo.

Citometria de fluxo é uma técnica de medição das propriedades óticas das células (ou partículas em geral) individuais passando uma de cada vez por um feixe de laser, em um fluxo contínuo. A interação das partículas ou células com a luz é detectada com sensores para medir fluorescência e dispersão de luz. A figura 12 mostra uma representação esquemática de um citômetro de fluxo. Esse aparelho faz com que as células em suspensão sejam obrigadas a fluir em fluxo laminar, de tal modo que se dispõem em fila única intersectando um feixe de iluminação com origem em uma ou mais fontes de iluminação, seja laser(s) e/ou lâmpada de vapor de mercúrio (DOLEŽEL *et al.*, 1997). Quando uma célula (ou partícula microscópica) intersecta o feixe de luz, provoca um processo de dispersão fotónica e/ou de emissão de fluorescência, cuja intensidade depende das

35

características da célula (CORTE-REAL *et al.*, 2002). Os fótons dispersos na direção do feixe de laser podem ser detectados diretamente por um fotodiodo ou podem ser colhidos a 90° por lentes, espelhos dicróicos e filtros ópticos e focados em fotomultiplicadores (FMT). Geralmente, a maioria dos citômetros possui pelo menos três fotomultiplicadores: um para detectar dispersão lateral e dois para fluorescências.



FIGURA 12: Representação esquemática de um citômetro de fluxo.

A combinação da técnica citômetro de fluxo com sondas fluorescentes poderia se tornar ideal para o desenvolvimento de testes de susceptibilidade bacteriana para antibióticos ou outros agentes bactericidas (MORTIMER *et al.*, 1999; HUMPHREYS *et al.*, 1994; MASON *et al.*, 1995a; MASON *et al.*, 1995b; GANT *et al.*, 1993; ORDONÊZ *et al.*, 1993). Células de *E.coli* (K12) na fase de crescimento exponencial foram centrifugadas a 6500 rpm, 4°C por 10 minutos e ressuspendidas em tampão 0,01 M de fosfato de sódio com 1% de triptona, pH 7.4 para densidade óptica de 0,47 em 660 nm. Alíquotas de 50 µL de amostra contendo 4,5x10⁷ células/mL foram incubadas com concentrações variáveis de BthTx-I nativa, recombinante tipo selvagem e mutantes, por 2 horas a 37°C. Após esse

período, as células foram diluídas (1:10) em tampão e 5 µg/mL da sonda Sytox Green adicionados. As amostras foram analisadas em FACsorting (Becton and Dickson, San Jose, CA-USA) utilizando o canal de fluorescência 2 (FL-2 para Sytox Green). As análises foram feitas usando os programas "Cell Quest" (Becton and Dickson) e "Win Midi", os quais permitem analisar todas as células adquiridas (10000 por amostra) ou apenas determinadas populações, individualizadas por janelas (ou "Gates") estabelecidas com base em parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC) ou fluorescência (FL).

RESULTADOS

4. RESULTADOS.

4.1. OBTENÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES TIPO SELVAGEM E MUTADAS DE BTHTX-I.

4.1.1. Purificação das proteínas recombinante de BthTx-I.

Após a expressão em *E. coli* BL21 e renovelamento das proteínas recombinantes, as amostras foram purificadas por cromatografia de troca catiônica em HPLC. A figura 13 mostra uma comparação entre o perfil de eluição da proteína recombinante tipo selvagem e das mutantes Y117W e Y119W. As demais mutantes da região C-terminal (não mostradas no gráfico abaixo), também apresentaram perfil de eluição similar. O pico 1 representa a eluição das proteínas na forma não nativa e o tempo de eluição das proteínas recombinantes na forma não nativa, na coluna de troca catiônica, foi de aproximadamente 12 a 13 minutos (pico 2).



FIGURA 13: Perfil de eluição da BthTx-I recombinante tipo selvagem e mutantes da cromatografia de troca catiônica em HPLC. A coluna foi previamente equilibrada em tampão 20 mM de Tris-CI pH 7,5 e as amostras eluídas em tampão 20 mM Tris-CI, com gradiente de 0 a 2M de NaCI pH 7,5. O pico 1 indica proteínas na forma não nativa e o pico 2 indica o tempo de eluição da proteína nativa.

4.1.2. Dicroísmo circular (CD).

Para avaliar a integridade da estrutura secundária das proteínas recombinantes em comparação à da proteína nativa, mediu-se os espectros de CD na região UV-distante entre os comprimentos de onda de 200 a 250 nm (figura 14). O espectro da proteína nativa mostra mínimos em 208 e 222 nm, perfil típico de proteína rica em α-hélice, em concordância com a estrutura tridimensional da BthTx-I determinada por cristalografia de raio X. Os espectros de todas as proteínas recombinantes purificadas mantiveram -se similares ao da proteína nativa, mostrando que as mutações não provocaram mudanças significativas na conformação secundária da cadeia polipeptídica e que o protocolo utilizado para produção das proteínas recombinantes é válido e reproduzível. As pequenas variações observadas no espectro de algumas proteínas entre a região de 200 a 205 nm ocorrem devido à presença do sal NaCl, utilizado no processo de purificação das amostras, o qual não foi totalmente retirado no processo de diálise.



FIGURA 14: Espectro de dicroísmo circular na região UV CD da proteína nativa, recombinante tipo selvagem e mutantes da região C-terminal e do sítio ativo de BthTx-I.

Embora o protocolo de expressão e renovelamento da maioria dos mutantes foi satisfatório, o rendimento dos processos para a mutante K127A foi baixo, e a proteína purificada mostrou a estrutura secundária totalmente alterada. A figura 15 mostra os espectros da proteína nativa, com perfil típico de proteína rica em α -hélice, em concordância com a estrutura tridimensional da proteína determinada por cristalografia de raios-X e da proteína mutante K127A com a estrutura secundária alterada. Devido à existência de possíveis problemas no construto, essa mutante foi retirada das análises e está sendo novamente seqüenciada.



FIGURA 15: Espectro de dicroísmo circular na região UV CD da proteína nativa e a mutante K127A.

4.2. CARACTERIZAÇÕES DAS BASES ESTRUTURAIS DAS ATIVIDADES DE BTHTX-I.

4.2.1. Avaliação do papel da região C-terminal de BthTx-I na atividade bactericida.

4.2.1.1. Atividade bactericida contra linhagem Gram-positiva: *Micrococcus luteus.*

O efeito bactericida de BthTx-I foi avaliado contra a linhagem *Micrococcus luteus* (ATCC 9341). Concentrações crescentes entre 0 e 130 µg/mL da proteína nativa foram incubadas com 2x10⁷células/mL por 3 horas a 37°C. A figura 16 mostra o número de CFU/mL (unidades formadoras de colônias) em função da concentração de proteína. O experimento foi repetido três vezes, porém em cada caso o resultado mostrou a ausência de efeito de inibição de CFU para BthTx-I. Devido à ausência de atividade bactericida da proteína BthTx-I nativa contra *M. luteus*, foi decidido que os estudos feitos contra essa linhagem não seriam continuados.



FIGURA 16: Efeito bactericida de BthTx-l nativa contra linhagem de *M. luteus.* Mesmo em concentrações elevadas, a BthTx-l não apresenta atividade bactericida contra linhagem *M.luteus*.

4.2.1.2. Atividade bactericida contra linhagem Gram-negativa: *Escherich ia coli* (K12).

A atividade bactericida foi determinada através da incubação de 4x10⁵ CFU/mL da bactéria *E. coli* por 30 minutos, com concentrações variáveis entre 0 e 130 μg/mL da BthTx-I nativa. O efeito bactericida observado para a proteína nativa foi de aproximadamente 70% em uma concentração de 130 μg/mL. 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 em uma concentração de 17 μg.mL⁻¹. A figura 17 compara a porcentagem de redução de CFU/mL de diferentes concentrações de BthTx-I com 30 minutos e 2 horas de incubação. Pôde-se perceber que o efeito bactericida de BthTx-I foi maior quanto maior a concentração da proteína e quanto maior o tempo de exposição.



FIGURA 17: Curva dose-resposta apresentada por BthTx-l contra 4x10^o células.mL⁻¹ de *E.coli* **K12.** Com o aumento da concentração de toxina, o número de CFU é reduzido. O gráfico é representativo de um total de quatro experimentos.

Através desses resultados, testes bactericidas foram feitos para as proteínas recombinantes mutantes com duas horas de incubação. A figura 18 mostra a porcentagem de redução de CFU para todas as proteínas em concentrações entre 0 e 30 µg/mL. Nota-se que, com o aumento no tempo de incubação, a concentração de 6 µg/mL de BthTx-I nativa foi suficiente para que o efeito bactericida atingisse 100 %. A mutante H48Q, no sítio catalítico da proteína, manteve a atividade bactericida mostrando que as atividades catalítica e bactericida são independentes. Para um amostral de dois ensaios, a estatística feita com nível de significância p=0,05 revelou que as mutantes K116A, Y117W, k122A, F125W e K129A reduziram significativamente o efeito bactericida de BthTx-I, mostrando que a região C-terminal de BthTx-I possui um importante papel na atividade bactericida contra linhagem *Escherichia coli* (K12).



FIGURA 18: Efeito bactericida de Bothropstoxina I nativa, recombinante tipo selvagem (Rec) e mutantes da região C-terminal contra linhagem de *E. coli* (K12).

O gráfico em barra (figura 19) mostra a diferença na ação bactericida de cada mutante em relação à proteína nativa, na concentração fixa de 6 μ g/mL de proteína e uma densidade celular de 4x10⁵ CFU/mL. As proteínas mutantes marcadas com asterisco representam aquelas que reduziram significativamente o efeito (p=0,05).



FIGURA 19: Efeito bactericida na concentração fixa de 6 μg/mL de BthTx-I nativa (BthTx-I VEN), recombinante tipo selvagem (BthTx-I REC) e mutantes da região C-terminal contra linhagem *E. coli* (K12). Os dados mostram a média e desvio padrão de duas medidas. As amostras marcadas com (*) representam as proteínas mutantes que reduziram significativamente o efeito (p=0,05).

4.2.1.2.1. Efeito da concentração de células E. coli (K12) no efeito bactericida de BthTx-I.

O método do ensaio fluorimétrico descrito por PÁRAMO e colaboradores (1998) utilizou uma concentração de células de aproximadamente 1000 vezes maior em relação à concentração do teste bactericida. Testes iniciais mostraram que o sinal fluorescente foi muito fraco usando uma concentração celular de 4x10⁵ CFU/mL,. Portanto, para correlacionar o efeito bactericida com o estudo de partição de sondas fluorescentes, fez-se necessário ajustar a concentração de células *E.coli* para as medidas fluorimétricas. Dessa forma, a atividade bactericida foi avaliada em diferentes concentrações celulares, depois de uma incubação por 2 horas com 9 µg/mL de BthTx-1. A figura 20 mostra a porcentagem de CFU/mL apresentada por BthTx-I demonstrando que o aumento na concentração de células reduz o efeito de uma concentração fixa da proteína.



FIGURA 20: Atividade de dose-resposta apresentada por 9 mg/mL de BthTx-I contra diferentes concentrações de *E.coli* (K12). As concentrações de células variam de 4,5x10⁵ a 9x10⁷ células/mL.

A partir desse resultado, as mesmas concentrações celulares foram avaliadas quanto à sensibilidade do espectrofluorímetro, na tentativa de se obter a menor concentração de células inibida pela ação de BthTx-I, mas com sensibilidade suficiente para detecção do aparelho. Dessa forma, a população 4,5x10⁷ células/mL foi escolhida e novos testes bactericidas foram realizados. O efeito bactericida de BthTx-I foi reavaliado contra 4,5x10⁷ células/mL de *E. coli* e a figura 21 compara a atividade da proteína contra as duas concentrações celulares de *E.coli*. Nota-se que o efeito de BthTx-I sofreu uma redução diante do aumento da concentração de células bacterianas.



FIGURA 21: Curva dose - resposta apresentada por BthTx - I contra 4x10° e 4,5x10′ células.mL⁻¹ de *E.coli* (K12). Com o aumento da concentração de proteína, ocorre o aumento de inibição de CFU. O gráfico é representativo da média de um total de três experimentos.

As proteínas recombinantes mutantes também foram avaliadas contra a concentração celular bacteriana de $4,5x10^7$ células/mL. A figura 22 mostra a porcentagem de inibição de CFU/mL das proteínas mutantes na concentração fixa de 5 µg/mL. Esse resultado revela a importância da região Gterminal de BthTx-I na atividade bactericida contra linhagem *E.coli*, uma vez que as mutantes K115A, Y117W, R118A, K122A, F125W e K129A reduziram significativamente o efeito (p=0,05).



FIGURA 22: Efeito bactericida de BthTx-I nativa, recombinante tipo selvagem (rec) e mutantes da região Cterminal na concentração fixa de 6 μ g/mL contra linhagem *E. coli* (K12). Os dados mostram a média e desvio padrão de quatro medidas. As amostras marcadas com (*) representam as proteínas mutantes que reduziram significativamente o efeito (p=0,05). O cálculo de inibição de CFU = 100 – % do número de CFU.

4.2.2. Investigação do mecanismo bactericida de BthTx-I contra linhagem E.coli (K12) através de um estudo de partição de sondas fluorescentes.

4.2.2.1. Fluorimetria.

4.2.2.1.1. Avaliação da integridade da membrana externa de *E. coli* com a sonda hidrofóbica *N*-fenil-*N*-naftilamina (NPN).

Para desvendar o possível mecanismo de ação bactericida de BthTx-I contra *E.coli*, a sonda fluorescente NPN foi utilizada para avaliar alterações na permeabilidade da membrana externa da bactéria. Qualquer alteração que seja provocada por BthTx-I na integridade dessa membrana, a fluorescência é detectada devido à transferência da sonda do ambiente hidrofílico da solução para o compartimento hidrofóbico da membrana bacteriana (PÁRAMO *et al.*, 1998 e MARTÍNEZ DE TEJADA *et al.*, 1995).

Seguindo as condições estabelecidas (ver materiais e métodos seção: 3.2.3.1.), a intensidade de fluorescência da sonda foi medida em uma cinética de 0 a 200 segundos, sem incubação prévia de células com a proteína. A permeabilidade espontânea da sonda foi observada com a utilização de 10 µM da sonda sem acréscimo de proteína (controle negativo do experimento). Bactérias fervidas foram usadas como controle positivo experimental para determinação da partição máxima da sonda. A figura 23 mostra o perfil da cinética de partição da sonda, demonstrado pela ação de concentrações crescentes de BthTx-1. O aumento da intensidade de fluorescência da sonda na membrana externa de *E.coli* (ver esquema ilustrado na figura 11). O efeito de permeabilização da membrana externa mostrouse dependente da concentração da proteína, a qual causa uma perda da integridade da membrana externa da bactéria.



FIGURA 23: Aumento da emissão de fluorescência da sonda NPN devido a ação da proteína BthTx-I nativa contra a membrana externa de *E.coli*. Dois controles são mostrados: bactéria aquecida para estimar a emissão máxima e sonda na ausência da proteína para estimar a permeabilidade espontânea. Sonda + proteína são adicionadas em 20 segundos de experimento.

A partir desse resultado, o gráfico em barras (figura 24) com um amostral de três medidas mostra a porcentagem de aumento da intensidade de fluorescência da sonda NPN para as concentrações crescentes de proteína nativa contra *E.coli*, em relação ao controle positivo e no tempo fixo de 100 segundos. Nota-se que um aumento da intensidade de fluorescência em torno de 35% pertence a partição espontânea da sonda na membrana externa, que depois do tratamento com BhtTx-I chega a quase 70% para 27 µg/mL de proteína.



FIGURA 24: Porcentagem de intensidade de fluorescência da sonda NPN na atividade de permeabilização da membrana externa de *E.coli* pela ação de BthTx-I. A proteína nativa foi utilizada nas concentrações 0, 1, 3, 6, 9 e 27 μg/mL. Dois controles são mostrados: bactéria aquecida (+) para emissão máxima e sonda na ausência da proteína (-) para permeabilidade espontânea.

Uma concentração fixa de 13 µg/mL foi utilizada para avaliar o efeito da proteína nativa e das mutantes na atividade de permeabilização da membrana externa de *E.coli* (figura 25). Esse resultado mostrou que todas as mutantes apresentaram atividades de permeabilização similares à proteína nativa (nível de p=0,05), evidenciando que as mutações pontuais da região C-terminal de BthTx-I não são determinantes estruturais para a atividade de permeabilização da membrana externa da *E. coli*.


FIGURA 25: Porcentagem de intensidade de fluorescência da sonda NPN na atividade de permeabilização da membrana externa de *E.coli* para as proteínas nativa (bth), recombinante tipo selvagem (rec) e mutantes, na concentração fixa de 13µg/mL. Dois controles são mostrados: bactéria aquecida para emissão máxima (controle +) e sonda na ausência da proteína (controle -) para permeabilidade espontânea.

Uma cinética de partição da sonda NPN durante um período de 2 horas (figura 26) foi realizada na tentativa de correlacionar o efeito de BthTx-I na integridade da membrana externa de *E.coli* com o ensaio bactericida. Células bacterianas foram incubadas com uma mistura de sonda com 13 µg/mL de BthTx-I, e a cinética de permeabilização foi observada através da medida de intensidade de fluorescência da sonda. Esse resultado mostra que, embora a cinética de permeabilidade da membrana externa de *E.coli* apresentada pela proteína nativa seja rápida, ocorre um efeito adicional mais lento que atinge um valor

máximo após uma hora de incubação, sugerindo que outros compartimentos hidrofóbicos intracelulares ficam disponíveis para a ligação da sonda (ver figura 11).



FIGURA 26: Cinética de emissão de fluorescência da sonda NPN em função do tempo, devido a ação de 13 µg/mL da proteína BthTx-I nativa, contra integridade da membrana externa de *E.coli*. A cinética acima foi descontada do controle experimental feito com células na ausência de proteína. Número de células igual a 4,5x10⁷ células/mL.

4.2.2.1.2. Avaliação da integridade da membrana citoplasmática de Escherichia coli com a sonda Sytox Green (SG).

Detalhes sobre o mecanismo bactericida de BthTx-I contra *E.coli* podem ser fornecidos através do estudo de fluorescência de Sytox Green (SG), uma sonda utilizada para avaliar a integridade da membrana citoplasmática bacteriana. Esta sonda possui habilidade de emitir fluorescência até mil vezes maior quando ligado a ácidos nucléicos (LEBARON *et al.*, 1998; ROTH *et al.*, 1997). Uma cinética de 0 a 200 segundos foi medida

para diferentes concentrações de BthTx-I contra células de *E.coli*, sem período de incubação prévia. A figura 27 revelou que a BthTx-I não apresentou efeito de permeabilização da membrana citoplasmática de *E.coli* durante os primeiros 200s de incubação.



FIGURA 27: Porcentagem de intensidade de fluorescência da sonda SG na atividade de permeabilização da membrana citoplasmática de *E.coli* apresentada por BthTx-I nas concentrações 0, 1, 3, 6, 9, 13 e 27 mg/mL. Dois controles são mostrados: bactéria aquecida (controle +) para emissão máxima e sonda na ausência de proteína (controle -) para permeabilidade espontânea.

A partir desse resultado, uma cinética de incubação de BthTx-I com células na presença de SG durante um período de 2 horas foi realizada para avaliar a atividade da proteína na permeabilização da membrana citoplasmática de *E.coli*. Dessa maneira, células bacterianas foram incubadas com 27 µg/mL de proteína nativa e monitoradas por 2 horas, através da medida contínua de intensidade de fluorescência da sonda SG. O controle experimental foi feito pela incubação de células bacterianas apenas na presença da sonda. A

figura 28 mostra que a cinética de permeabilidade da membrana citoplasmática da bactéria apresentada por BthTx-I é significativamente mais lenta que da membrana externa, e o efeito máximo foi atingido depois de um tempo de incubação de aproximadamente 2 horas. Esse resultado ilustra a correlação entre a cinética de permeabilidade da membrana citoplasmática e o ensaio bactericida, uma vez que a perda de viabilidade celular ocorre significativamente após duas horas de ação da proteína nativa contra as células de *E. coli*.



FIGURA 28: Cinética de emissão de fluorescência da sonda Sytox Green (SG) em função do tempo, devido a ação de 27 µg/mL da proteína BthTx -I nativa, contra integridade da membrana citoplasmática de *E.coli*. O controle experimental foi feito com células na ausência de proteína. Número de células igual a 1,5x10⁸ células/mL.

Sabendo que o efeito máximo de BthTx-I na permeabilização da membrana citoplasmática de *E.coli* acontece após duas horas de ação, células bacterianas foram incubadas com as proteínas durante 2 horas a 37°C e após esse período, a fluorescência foi medida com a adição de 5 µM da sonda SG. Bactérias fervidas foram utilizadas como

controle positivo experimental para representar a emissão máxima da sonda. Células com sonda sem a adição de proteína foram utilizadas como controle negativo. A figura 29 mostrou que a atividade de permeabilização da membrana citoplasmática da bactéria pela ação de BthTx-I é dependente da concentração da proteína e apresenta efeito similar a perda de viabilidade celular observada nos ensaios bactericidas (ver figura 21 na seção 4.2.1.2).



FIGURA 29: Porcentagem de intensidade de fluorescência da sonda SG na atividade de permeabilização da membrana citoplasmática de *E.coli* para BthTx-I nas concentrações 0, 1, 3, 6, 9 e 27 μg/mL. Os dados foram normalizados para emissão máxima da sonda (sinal da sonda com bactérias aquecidas) e mínima (sinal da sonda com bactérias sem aquecimento).

Da mesma forma, a atividade de permeabilização da membrana citoplasmática de *E. coli* para as proteínas recombinantes mutantes foram avaliadas em uma concentração fixa de 5 µg/mL. A figura 30 ilustra a porcentagem de aumento de intensidade de fluorescência

da sonda SG para as proteínas nativa, recombinante tipo selvagem e mutantes após um período de 2 horas de incubação com as células bacterianas. Esse resultado mostrou que os resíduos nas posições 117, 119, 122 e 125 reduziram significativamente o efeito (p=0,05), evidenciando que a região C-terminal de BthTx-I é um determinante estrutural do efeito de permeabilidade da membrana citoplasmática de *E.coli*.



FIGURA 30: Porcentagem de intensidade de fluorescência da sonda SG na atividade de permeabilização da membrana citoplasmática de *E.coli* para as proteínas nativa, recombinante tipo selvagem e mutantes, na concentração fixa de 5 µg/mL. Os dados foram normalizados para emissão máxima da sonda (sinal da sonda com bactérias aquecidas) e mínima (sinal da sonda com bactérias sem aquecimento). As amostras marcadas com (*) representam as proteínas mutantes que reduziram significativamente o efeito (p=0,05).

4.2.2.2. Citometria de fluxo.

4.2.2.2.1.Avaliação da integridade da membrana citoplasmática de Escherichia coli com a sonda Sytox Green (SG).

A técnica de citometria de fluxo foi utilizada para avaliar o efeito de BthTx-I e o papel da região C-terminal na permeabilização da membrana citoplasmática de *E.coli* e, posteriormente, correlacionar os dados obtidos com a fluorimetria e atividade bactericida. Dessa forma, uma população de 4,5x10⁷CFU/mL de *E.coli* (K12) foi incubada, por duas horas a 37°C, com BthTx-I nativa em concentrações crescentes de 0 a 27µg/mL. Após esse período, células foram diluídas em tampão (1:10) e 5 µg/mL da sonda Sytox Green (SG) foram adicionados às amostras, e analisadas por citometria de fluxo (FACS). A figura 31 mostra três exemplos de histogramas obtidos utilizando esta técnica. Em (A): distribuição de intensidade de fluorescência das células não tratadas com a proteína (controle negativo); (B): distribuição de intensidade de fluorescência das células não tratadas com 13 µg/mL de BthTx-I. Num total de 10.000 eventos, a denominação (M1) indica a população de células intactas e (M2) é a população que incorporou a sonda SG, ou seja, as células permeabilizadas pela ação de BthTx-I.



FIGURA 31: Histogramas da intensidade de fluorescência de Sytox Green (SG) para avaliar a atividade de BthTx-I na permeabilização da membrana citoplasmática de *E.coli*, através de citometria de fluxo. (A) controle negativo; (B) controle positivo e (C) ação de 13 μg/mL de BthTx-I. A tabela fornece o número total de eventos (M0); o número de células não permeabilizadas (M1) e o número de células permeabilizadas (M2) de cada amostra.

A análise estatística dos dados utilizados nos histogramas de FACS para BthTx-I, nas concentrações entre 0 e 27 µg/mL, forneceu a porcentagem das células com a membrana citoplasmática permeabilizada por BthTx-I (figura 32). Assim como observado nos resultados caracterizados anteriormente, o efeito da proteína nativa na permeabilização da membrana citoplasmática da célula é dependente da concentração da proteína.



FIGURA 32: Porcentagem de permeabilização da membrana citoplasmática de células *E.coli* pela ação de BthTx-I, nas concentrações 0, 3, 5, 9, 13 e 27 mg/mL, medida através da citometria de fluxo. Os dados foram normalizados para emissão máxima da sonda (sinal da sonda com bactérias aquecidas) e mínima (sinal da sonda com bactérias sem aquecimento).

A atividade de permeabilização da membrana citoplasmática de *E.coli* também foi avaliada para as mutantes na região C-terminal de BthTx-I. Seguindo os passos experimentais descritos anteriormente, uma concentração de 5 μg/mL das proteínas recombinantes mutantes foi utilizada e a permeabilização da membrana citoplasmática foi

analisada por citometria de fluxo. A figura 33 mostra a porcentagem de células bacterianas que tiveram a membrana citoplasmática permeabilizada pela ação das proteínas mutadas. O resultado revelou que as proteínas com as substituições aromáticas nas posições 117, 119 e 125, juntamente com a substituição na posição 122 foram importantes no efeito de permeabilização da membrana citoplasmática da bactéria.



FIGURA 33: Porcentagem de permeabilização da membrana citoplasmática de *E.coli* pela ação das mutantes da região C-terminal de BthTx-I, na concentração fixa de 5 mg/mL monitorada pela citometria de fluxo. A porcentagem de permeabilização representa as células que incorporaram a sonda SG. Os dados foram normalizados para emissão máxima da sonda (sinal da sonda com bactérias aquecidas) e mínima (sinal da sonda com bactérias sem aquecimento). As amostras marcadas com (*) representam as proteínas mutantes que reduziram significativamente o efeito (p=0,05).

A figura 34 compara a porcentagem de efeito de inibição de CFU demonstrada pela perda de viabilidade nos ensaios bactericidas com a porcentagem de permeabilidade da membrana citoplasmática de *E.coli* monitorada pela citometria de fluxo. Nota-se que, a porcentagem dos dois efeitos é dependente da concentração de BthTx-I e que o efeito de inibição de CFU demonstrou-se significativamente superior para as concentrações entre 3 e 9 µg/mL de proteína.



FIGURA 34: Comparação da porcentagem de inibição de CFU demonstrada pelos ensaios bactericidas com a porcentagem de permeabilização da membrana citoplasmática de *E.coli* monitorada pela citometria de fluxo. Concentrações utilizadas de BthTx-l: 0, 3, 5, 9 e 27 μg/mL. Densidade celular de *E.coli*: 4,5x10⁷ CFU/mL.

4.2.3. Correlação entre as atividades Ca²⁺-independente de danificação de membranas artificiais e o efeito bactericida de BthTx-I.

4.2.3.1. Atividade de liberação de calceína.

A atividade Ca²⁺-independente de danificação da mem brana foi estudada pela cinética de liberação do marcador fluorescente, calceína, encapsulado em lipossomo. A figura 35 mostra que a cinética de liberação de calceína encapsulada foi atingida rapidamente e em aproximadamente 180 segundos foi adicionado 0,1% de TRITON X-100, ocorrendo 100% de liberação do fluoróforo. A adição de concentrações crescentes da proteína BthTx-I nativa entre 1,5 e 15 μg/mL resultou no aumento gradativo da liberação de calceína dos lipossomos.



FIGURA 35: Cinética de emissão de calceína em 520 nm. Com a adição de 1,5 a 15 μg/mL da proteína BthTx-I nativa (20 seg). A calceína foi liberada do interior dos lipossomos, e após a adição de 0.1% de TRITON X-100, em torno de 180 segundos, ocorreu 100% de liberação. Tampão utilizado: 20 mM de Hepes, 150 mM de NaCl, pH 7,0.

Os experimentos de liberação de calceína com a proteína nativa e recombinates tipo selvagem e mutadas da região Cterminal foram feitos, anteriormente, como parte de um projeto de Mestrado (Lucimara Chioato, processo 98/14568-7,2001) e estão disponíveis na literatura (CHIOATO *et al.*, 2002). Os dados são apresentados aqui para fins comparativos com o teste bactericida. A figura 36 ilustra a porcentagem de liberação de calceína ocorrida depois de 140 segundos de cinética, mostrando que a substituição de aminoácidos positivamente carregados nas posições 115 e 116 causou uma redução significativa da atividade de danificação da membrana, assim como ocorreu com a substituição das cargas positivas nas posições 122 e 125. A substituição dos resíduos aromáticos da alça C-terminal por triptofano, realçou a atividade no caso da mutação 117 e levemente diminuiu no caso da mutação da posição 125, não tendo nenhum efeito significativo com a mutação 119. Baseado nestes resultados, funções alternativas nas regiões distal e proximal da alça C-terminal na atividade de danificação de membrana foram sugeridas (CHIOATO *et al.*, 2002).



FIGURA 36: Liberação de calceína encapsulada em lipossomos. Os valores representam a liberação do fluoróforo após 140 segundos da adição de proteína em uma concentração final de 3 µg/mL. As proteínas marcadas com (*) reduziram significativamente o efeito (p=0,05). A proteína marcada com (*) realçou o efeito.

4.2.3.1.1. Representação da localização dos determinantes estruturais de BthTx-I.

A figura 37 ilustra as representações em fita da estrutura tridimensional do dímero de BthTx-I na orientação frontal (A) e após uma leve rotação (B). A representação em fita de um monômero de BthTx-I, mostrando as cadeias laterais dos resíduos da região C-terminal da proteína, é ilustrada em (C). A figura em (D) mostra a sobreposição de um monômero de BthTx-I nas representações em fita e sólida da superfície.

A figura 38 ilustra as representações da superfície sólida do dímero de BthTx-I, mostrando a localização dos resíduos da região C-terminal da proteína que mudaram significativamente a atividade bactericida (A) com os resíduos que alteraram a atividade danificadora de membranas artificiais (B), sugerindo uma correlação entre estes dois efeitos. Os determinantes estruturais da região C-terminal de BthTx-I que alteraram significativamente a atividade de permeabilização da membrana citoplasmática, demonstrada tanto pela técnica de fluorimetria quanto pela citometria de fluxo, também são apresentados na figura 38, através das representações sólidas da superfície de BthTx-I. Os resíduos em evidências reduziram, respectivamente, a permeabilização da membrana citoplasmática de E.coli, medida pela fluorimetria (C) e pela citometria de fluxo (D) reforçando a sugestão da correlação entre esse efeito com atividade bactericida, uma vez que se torna necessário a permeabilização da membrana interna para que ocorra perda de viabilidade celular observada nos ensaios bactericidas.





FIGURA 37: Representações em fita da estrutura tridimensional de BthTx-I. Estrutura tridimensional do dímero de BthTx-I na orientação frontal (A) e após leve rotação (B). A estrutura de um monômero de BthTx-I (C), mostrando as cadeias laterais dos resíduos mutados da alça C-terminal (fita em vermelho). Em (D) observa-se a sobreposição de um monômero de BthTx-I nas representações da superfície em fita e sólida.



FIGURA 38: Representações da superfície sólida de BthTx-I. Área azul corresponde aos determinantes estruturais para atividade bactericida (A). A figura (B) corresponde aos determinantes estruturais para a atividade de danificação de membranas artificiais, onde a área vermelha representa os resíduos que reduziram o efeito e em verde, o resíduo que realçou a atividade. Área laranja corresponde aos determinantes estruturais para atividade de truturais para atividade de permeabilização da membrana citoplasmática de *E.coli* monitorada pela fluorimetria (C) e a área em verde, pela citometria de fluxo (D).

4.2.3.2. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Os estudos ultra-estruturais da MET foram realizados para avaliar possíveis alterações morfológicas da bactéria *E.coli* provocadas por BthTx-I, em função do tempo. A figura 39 apresenta as micrografias do controle experimental em magnificações crescentes de (A) a (C), onde as células estão apenas na presença do tampão 10 mM de fosfato de sódio, 1% triptona, pH 7,4. Esse resultado mostra que as células estão intactas e em boas condições de preservação morfológica. Nota-se em (B) e (C) que o espaço periplasmático (EP) é evidente e a parede celular (PC) está bem definida. A região nucleóide (N) é delineada na área esbranquiçada.



FIGURA 39: Micrografias de *E.coli*, em condições do controle experimental, obtidas através da microscopia eletrônica de transmissão. Células de *E.coli* em tampão 10 mM de fosfato de sódio, 1% triptona, pH 7,4. As imagens são mostradas em magnificações de 3800 vezes (A); 36000 vezes (B) e 62000 vezes (C). As bar ras de 1 cm equivalem a 2,6 μM (A); 160 nM (B) e 280 nM (C).

A atividade bactericida de BthTx-I contra linhagem *E.coli* foi avaliada pela microscopia eletrônica de transmissão em função do tempo. A figura 40 apresenta as micrografias de células *E.coli* na ausência de proteína (A: controle 30 minutos e C: controle 2 horas) e na presença de 25 µg/mL de BthTx-I, nos períodos de 30 minutos (B) e 2 horas (D) de ação. Depois de 30 minutos de incubação com BthTx-I, a parede externa da bactéria apresenta uma aparência ligeiramente rugosa, mas ainda compacta. Entretanto, após 2 horas, esta rugosidade aumenta e a parede externa parece mais difusa e menos compacta em relação ao controle. Na amostra exposta à BthTx-I por 2 horas, o espaço periplasmático também é mais evidente, e possui regiões onde há a separação entre a membrana citoplasmática e a parede celular. As mudanças morfológicas das células, depois de 2 horas de incubação com BthTx-I, correspondem ao período para a permeabilização completa das células, demonstrada pela sonda Sytox Green, e também às condições de 100% de inibição de CFU.



FIGURA 40: Micrografias obtidas através da microscopia eletrônica de transmissão. Controles experimentais no tempo de 30 minutos (A) e 2 horas (C). Células de *E.coli* incubadas com 25 μg/mL de BthTx-I por 30 minutos (B) e 2 horas (D). As imagens são fornecidas em magnificações na faixa de 30000 a 40000 vezes (ver escala de barras nas micrografias individuais).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO.

5.1. OBTENÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES TIPO SELVAGEM E MUTADAS DE BTHTX-I.

Os protocolos descritos para a produção de PLA₂s recombinantes de veneno envolvem a expressão em *E.coli* sob a forma de corpos de inclusão (KELLEY *et al.*, 1992; KUO *et al.*, 1995; LIU *et al.*, 1999; WARD *et al.*, 2001), através de proteína de fusão (LIANG *et al.*, 1993; GIULIANI *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2003) ou ainda a expressão de PLA₂s de veneno em hospedeiros eucarióticos (LEFKOWITZ *et al.*, 1999). As PLA₂s do veneno de serpentes freqüentemente são bem expressas por *E.coli* e geralmente não são tóxicas para as células hospedeiras. Portanto, a principal desvantagem é que as PLA₂s dos grupos I e II não são expressas na forma nativa e sim como agregados protéicos insolúveis denominados corpos de inclusão. Embora facilmente purificados por centrifugação, os corpos de inclusão devem posteriormente ser solubilizados com desnaturantes químicos e a proteína redobrada na sua conformação nativa, através da redução lenta da concentração do agente desnaturante. Além disso, como as PLA₂s dos grupos I e II apresentam de 6 a 8 pontes dissulfeto, o renovelamento protéico deve ser realizado na presença de tampão de oxidação/redução.

O primeiro passo no processo de purificação das proteínas expressas em *E.coli* BL21 foi o isolamento dos corpos de inclusão. As etapas de purificação dos corpos de inclusão são fundamentais antes do renovelamento protéico, pois a presença de contaminantes influencia fortemente o processo. Um estudo realizado por BATAS e colaboradores (1999) mostrou que de todos os contaminantes estudados, incluindo DNA, RNA, fosfolipídios e outras proteínas, a presença de proteínas contaminantes é o fator que mais interfere no rendimento protéico final. Recentemente, foram relatados protocolos de renovelamento protéico usando uma

resina de filtração em gel que tem sido utilizada com sucesso para renovelar corpos de inclusão de BthTx-I (WARD *et al.*, 2001). A difusão reduzida das proteínas em coluna de filtração em gel suprime as interações não específicas de moléculas parcialmente redobradas, reduzindo assim a agregação (BATAS e CHAUDHURI, 1996). Outra etapa importante do processo de renovelamento é a quantidade de hidrocloreto de guanidina (GdnHCI), um agente desnaturante que interage com o solvente, perturbando a interação entre as moléculas de água e a proteína. A perda da organização das moléculas de solvente ao redor da proteína reduz as interações hidrofóbicas que estabilizam a molécula, permitindo assim maior flexibilidade da cadeia polipeptídica. No caso de BthTx-I, a concentração de 0,3 M de GdnHCI foi ideal para a estabilidade relativa das interações hidrofóbicas, pois proporciona uma maior flexibilidade entre as formas não nativas da proteína, favorecendo no equilíbrio termodinâmico à estrutura nativa da proteína, aumentando assim o rendimento.

No processo de purificação por cromatografia de troca catiônica, o tempo de eluição das mutantes foi similar ao tempo de eluição da forma nativa. A análise da estrutura secundária das proteínas recombinantes é fundamental para eliminar as proteínas recombinantes mutadas com conformação estrutural não nativa. Os resultados de CD na região UV-distante (200-250nm) confirmaram que o perfil padrão da estrutura secundária nativa de BthTx-I permaneceu igual para a maioria das proteínas recombinantes mutadas, as quais tiveram um rendimento que variaram entre 0,3 a 3 mg/mL, quantidade suficiente para realizar os experimentos. O processo de renovelamento para a maioria das proteínas mutadas foi adequado para os estudos relatados, porém a mutante K127A apresentou um rendimento baixo. O renovelamento da K127A pode ter sofrido influências de contaminantes ou possíveis alterações no construto, o que levou, conseqüentemente, à proteína com estrutura secundária não nativa (figura 15). Em conseqüência disso, a mutante foi retirada das análises subseqüentes.

5.2. CARACTERIZAÇÕES DAS BASES ESTRUTURAIS DAS ATIVIDADES DE BTHTX-I.

Além da atividade catalítica, muitas PLA₂s do veneno de serpentes do grupo IIA apresentam diversas propriedades farmacológicas como miotoxicidade (MEBS, 1986; GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1995), neurotoxicidade pré-e pós-sináptica (CHANG et al., 1977), agregação de plaquetas (GERRARD et al., 1993; YUAN et al., 1993), cardiotoxicidade (FLETCHER et al., 1981) e atividade bactericida (PÁRAMO et al., 1998, SOARES et al., 2000). Apesar dos mecanismos, pelos quais as PLA₂s exercem tais efeitos, ainda sejam pouco conhecidos, a função catalítica não é necessária para manifestação de algumas destas propriedades farmacológicas (LOMONTE et al., 1994b; PÁRAMO et al., 1998; SOARES et al., 2000). Embora as PLA₂s Lys49 sejam inativas cataliticamente, elas também apresentam uma variedade de funções farmacológicas. "In vivo", a principal ação biológica das PLA₂s-Lys49, quando injetadas intramuscularmente, é a miotoxicidade local. O envolvimento da região C-terminal na atividade miotóxica vem sendo avaliado desde 1994, através de estudos de mapeamento do sítio de interação de Miotoxina II, uma PLA₂-Lys49 do veneno de B. asper (Myo II) com inibidores. Em adição, estudos feitos por CALDERÓN e LOMONTE (1998 e 1999) confirmaram o envolvimento do peptídeo sintético 115-129 da região C-terminal da Myo II de B. asper nas atividades citotóxica e miotóxica. A alca Cterminal, em PLA₂s Lys49, contém alto conteúdo de resíduos positivamente carregados, assim como de 34 resíduos de aminoácidos aromáticos (WARD et al., 1998), e alguns autores sugerem uma possível função dos aminoácidos carregados positivamente sobre a miotoxidade (BABU e GOWDA, 1994; DÍAZ-OREIRO e GUTIÉRREZ, 1997).

A região C-terminal de PLA₂s Lys49 também está envolvida no efeito bactericida (PÁRAMO *et al.*, 1998). O peptídeo sintético da região 115-129 de Myo II de *B. asper* foi capaz de reproduzir o efeito bactericida apresentado pela proteína inteira sobre uma variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O mecanismo proposto foi similar

ao exercido por outros peptídeos catiônicos, no qual as cadeias laterais dos resíduos catiônicos do peptídeo competem com os íons metálicos associados aos grupos carregados negativamente na superfície celular bacteriana. Por causa do maior volume apresentado pelos peptídeos, a membrana é desestabilizada, permitindo a inserção do domínio hidrofóbico do peptídeo dentro da bicamada lipídica. Isso acarretaria a permeabilização da membrana e morte celular (FREER *et al.*, 1996). Baseado nessas informações, o objetivo central do estudo foi investigar o mecanismo bactericida de BthTx-I, uma PLA₂ -Lys49, contra células de *Escherichia coli* (K12) e o envolvimento da região C-terminal através de mutagênese sítio dirigida.

O efeito bactericida foi avaliado contra as linhagens Gram-positiva, *Micrococcus luteus* e Gram-negativa, *Escherichia coli* (K12). Quando BthTx-I nativa foi testada contra a bactéria *Micrococcus luteus*, nenhum efeito foi observado (figura 16). O experimento para avaliar o efeito bactericida foi repetido por várias vezes e o resultado negativo se manteve. Assim, devido à ausência de atividade bactericida da proteína BthTx-I nativa contra *Micrococcus luteus*, os estudos adicionais com esta linhagem não foram seguidos adiante. O fato de BthTx-I possuir efeito bactericida contra a bactéria Gram-negativa e não possuir contra a Gram-positiva pode ser devido às diferenças na composição e estrutura da parede celular das linhagens (figura 6).

A contagem do número de unidades formadoras de colônia (CFU)/mL de *E.coli* (K12) foi realizada em função da concentração de BthTx-I e do tempo de incubação (figura 17), mostrando que o efeito bactericida de BthTx-I nativa é dependente do tempo e da concentração da proteína, pois o número de CFU se tornou menor quanto maior a concentração de proteína e quanto maior o tempo de exposição, atingindo um efeito máximo após 2 horas de ação. Este resultado está em concordância com a atividade bactericida demonstrada por Miotoxina-I, também uma PLA₂s Lys49 do veneno de *B. moojeni* (SOARES *et al.*, 2000) e Piratoxina III do veneno de *B. pirajai* (SOARES *et al.*, 2001). Ensaios

bactericidas feitos por PÁRAMO e colaboradores (1998) utilizaram uma concentração celular de 4,5x10⁵ células/mL. Baseado nesses dados, constatamos que esta concentração de células demonstrou sinais fracos no estudo de partição das sondas fluorescentes. Portanto, para avaliar e comparar os estudos de partição de sondas fluorescentes com o efeito bactericida de BthTx-I contra para avaliar o efeito da concentração celular na atividade bactericida mostrou que para uma determinada concentração de BthTx-I, o aumento da concentração de células bacterianas reduziu o efeito da proteína (figura 20). Portanto, a concentração celular de 4,5x10⁷ células/mL foi escolhida para comparar o efeito bactericida de BthTx-I e da influência de mutagênese na região C-terminal da proteína com os estudos de partição de sondas fluorescentes.

A importância das cargas positivas e aromáticas presentes na alça Cterminal de BthTx-I sobre a atividade bactericida foi avaliada, através das mutantes sítio dirigidas, mostrando que as mutantes K115A, Y117W, R118A, K122A, F125W e K129A reduziram significativamente o efeito em relação à proteína nativa (figura 22). A mutante H48Q foi gerada para avaliar o efeito da mutação no sítio ativo da proteína. No mecanismo de atividade catalítica proposta por SCOTT *et al.*, 1990, o par de aminoácidos H48/D99 é responsável pela abstração dos elétrons da molécula de água que age no ataque nucleofílico da ligação éster *sn*-2 do fosfolipídeo. Assim, a substituição de histidina 48 por glutamina (H48Q) elimina a atividade catalítica, porém mantém ligações de hidrogênio, que são essenciais para a manutenção da estabilidade estrutural. Seguindo esse propósito, o resultado obtido mostrou que a atividade bactericida para esse mutante foi mantida, revelando a independência entre as duas atividades.

Identificando a importância da região C-terminal de BthTx-I no efeito bactericida contra linhagem *E.coli*, nós propusemos investigar o mecanismo de ação bactericida da proteína e a contribuição da região C-terminal para tal atividade, a partir de um estudo por partição de sondas fluorescentes segundo metodologia descrita por PÁRAMO (1998) e

MARTÍNEZ DE TEJADA (1995). A sonda hidrofóbica *N*-fenil-*N*-naftilamina (NPN) foi utilizada para avaliar a integridade da membrana externa da bactéria *Escherichia coli* (K12) e a sonda Sytox Green (SG) para avaliar a integridade da membrana citoplasmática bacteriana.

Um aumento na intensidade de fluorescência da sonda NPN é detectado quando a sonda é transferida do meio hidrofílico para um ambiente hidrofóbico. A cinética de permeabilização da membrana externa de *E.coli* é rápida e dependente da concentração de BthTx-I (figura 23). Este resultado está em concordância com os experimentos fluorimétricos de PÁRAMO e colaboradores (1998), uma vez que demonstraram a rápida permeabilização da membrana externa de bactérias Gram-negativas causada pela ação da Miotoxina II de B. asper ou pelo peptídeo sintético correspondente da região C-terminal entre os aminoácidos 115-129. O efeito de permeabilização da membrana externa bacteriana foi avaliado para as proteínas mutadas na C-terminus de BthTx-I, revelando que todas as mutantes apresentaram atividades de permeabilização iguais à proteína nativa, evidenciando que as mutações pontuais da região C-terminal de BthTx-I não são determinantes estruturais para esta atividade (figura 25). O mutante H48Q não demonstrou nenhuma mudança significativa em comparação à proteína nativa. Isso mostra definitivamente que a permeabilização da membrana externa é independente de qualquer atividade catalítica residual. A rápida permeabilização da membrana externa não resulta na perda de viabilidade celular, pois o efeito máximo da atividade bactericida é demonstrado após um período de 2 horas de ação (ver figuras 23 e 26).

Uma sonda de viabilidade celular foi utilizada para avaliar o efeito de BthTx-I nativa na permeabilidade da membrana citoplasmática. Células em condições sadias excluem a sonda e não emite fluorescência, entretanto células mortas ou com a membrana citoplasmática comprometida incorporam o marcador de ácidos nucléicos, aumentando, assim, a fluorescência detectável no citoplasma. Dentre as sondas mais utilizadas estão: "Sytox green", oxonol, rodamina, iodeto de propídio e TO-PRO-1 e a maioria dos estudos

encontrados na literatura, que utilizam tais sondas, investiga a susceptibilidade e viabilidade bacteriana devido à ação de agentes antimicrobianos (ROTH *et al.*, 1997; MORTIMER *et al.*, 1999; GANT *et al.*, 1993; LEBARON *et al.*, 1998). Com base nesses estudos, a sonda Sytox Green (SG) foi utilizada para investigar o mecanismo bactericida de BthTx-I à nível da integridade da membrana citoplasmática de *Escherichia coli* (K12). A cinética de permeabilização da membrana citoplasmática pela ação de BthTx-I mostrou-se dependente da concentração de proteína, e apresentou um perfil muito mais lento que a cinética de permeabilização da membrana externa. A justificativa para tal efeito deve-se ao fato de que para a proteína entrar em contato com a membrana citoplasmática da bactéria é necessário atravessar a membrana externa, seguida de uma camada de peptídeoglicano, lipoproteínas e espaço periplasmático. A cinética de permeabilidade da membrana citoplasmática de permeabilidade da membrana externa, seguida de uma camada de viabilidade celular ocorre significativamente após duas horas de ação de BthTx-I nativa contra as células de *E. coli.*

O efeito na integridade da membrana citoplasmática bacteriana pelas proteínas mutantes em concentração fixa de 5 µg/mL também foi avaliado. Esse resultado mostrou que as substituições conservativas feitas nas posições aromáticas 117, 119, e 125, assim como a substituição da carga positiva na posição 122 por alanina, reduziram significativamente o efeito (p=0,05), demonstrando a importância das cadeias laterais catiônicas e aromáticas da região C-terminal de BthTx-I no efeito de permeabilidade da membrana citoplasmática de *E.coli*. Além disso, a perda de viabilidade celular observada nos ensaios bactericidas ocorre apenas quando há permeabilidade da membrana citoplasmática bacteriana. A permeabilização da membrana citoplasmática de células eucarióticas também pode ser um evento importante na atividade de BthTx-I in vivo. Mutações nos resíduos localizados nas posições K115, K116, R118 e K122 da região C-terminal de BthTx-I, também foram avaliadas quanto ao efeito nociceptivo apresentado por esta toxina (ZAMBELLI, 2003). Os

importantes tanto para o desencadeamento do efeito hiperalgésico quanto para o efeito edematogênico, e que os aminoácidos positivos localizados nas posições 115 e 116 também são importantes para o efeito de hiperalgesia, mas não participam do efeito edematogênico provocado por esta toxina.

A análise quantitativa de intensidade de fluorescência, realizada através da técnica de citometria de fluxo (FACS) mostrou-se em concordância com os resultados fluorimétricos descritos anteriormente. A fração das células que apresentaram a membrana citoplasmática permeabilizada pela ação de BthTx-I foi diretamente proporcional à concentração da proteína nativa, e evidenciou os mesmos determinantes estruturais da região C-terminal da proteína para tal efeito. Entretanto, a comparação entre a porcentagem de efeito de inibição de CFU nos ensaios bactericidas com a porcentagem de permeabilidade da membrana citoplasmática de E.coli monitorada pela citometria de fluxo, mostrou que o efeito de inibição de CFU foi superior para todas as concentrações utilizadas de BthTx-I (figura 34). A diferença entre esses dois resultados pode ocorrer devido a uma fluorescência associada à célula parcialmente permeabilizada, sem que esse efeito ocasione perda de viabilidade celular. Transportadores de efluxo em bactérias, cujas funções são dependentes do gradiente eletroquímico de prótons na membrana interna, têm sido associados com a remoção de brometo de etídio (EtBr) da bactéria (JERNAES et al., 1994). Assim como a Sytox Green, o EtBr é um marcador de ácidos nucléicos e esse processo de efluxo pode implicar em redução na medida de fluorescência da sonda.

Estudos ultra-estruturais de microscopia eletrônica de transmissão foram realizados para auxiliar a investigação do mecanismo bactericida de BthTx-I contra linhagem *E.coli*. As alterações morfológicas da célula bacteriana provocadas pela proteína nativa, em função do tempo, corroboram com a perda de viabilidade celular relatada nos ensaios bactericidas. Após duas horas de ação da proteína, o compartimento celular bacteriano apresentou uma separação entre as membranas externa e interna e um aumento de volume do espaço

periplasmático, ocasionando a morte celular. Esse resultado está em concordância com os dados obtidos por PÁRAMO e colaboradores (1998), uma vez que comprovaram alterações morfológicas similares em uma série de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, devido a ação provocada pela Miotoxina II de *B. asper* ou pelo peptídeo sintético correspondente da região C-terminal.

Além do envolvimento no efeito bactericida contra linhagem E.coli, a região Cterminal de BthTx-I também está envolvida no mecanismo de danificação de membrana independente de Ca²⁺. Membranas de lipossomos multilamelares compostas de fosfolipídios carregados negativamente são mais suscetíveis aos danos causados por miotoxinas do que vesículas compostas apenas por fosfolipídios positivos (DIAZ et al., 1991; BULTRON et al., 1993). Vesículas unilamelares compostas de fosfatidilcolina e ácido fosfatídico são mais suscetíveis a Miotoxina II de Bothrops asper do que vesículas compostas apenas de fosfatidilcolina (RUFINI et al., 1992). Esta dependência de bicamadas carregadas negativamente na atividade das PLA2s-Lys49 sugere o envolvimento de aminoácidos básicos no efeito de danificação da membrana, talvez no passo de ligação da proteína com a membrana. A liberação do conteúdo aquoso dos lipossomos por miotoxinas que apresentam ausência de atividade enzimática mostrou que o efeito de danificação de membranas é independente da hidrólise enzimática de fosfolipídios e que a atividade fosfolipásica em variantes enzimaticam ente ativas serve para realçar esta danificação. PEDERSEN e colaboradores (1994) confirmaram este modelo ao demonstrar que Miotoxina II de B. asper danifica membranas de lipossomos compostos de fosfolipídios com uma ligação éter na posição sn-2 que impede a atividade hidrolítica.

O fato de BthTx-I não apresentar atividade hidrolítica e mesmo assim provocar a liberação de marcadores fluorescentes encapsulados dentro de lipossomos, mostra que esta toxina apresenta uma atividade danificadora de membranas que é independente da capacidade de hidrolisar fosfolipídios de membranas. Essa atividade de BthTx-I sobre

membranas lipossomais já foi relatada por DE OLIVEIRA e colaboradores (2001) e o estudo dos determinantes estruturais destes efeitos foi iniciado por CHIOATO e colaboradores (2002). Além do papel crucial do dímero de BthTx-I no efeito danificador de membranas, como demonstrado por estudos de dissociação induzida por pH (DE OLIVEIRA *et al.*, 2001) e estudos de mutagênese sítio dirigida de resíduos na interface dimérica (RULLER, 1999), o envolvimento da extensão C-terminal no mecanismo danificador de membranas já havia sido proposto (DA SILVA GIOTTO *et al.*, 1998). Estudos cristalográficos e espectroscópicos de BthTx-I mostraram que a interface dos monômeros forma uma "dobradiça" que resulta nas formas "aberta" e "fechada" do dímero. Demonstrou-se que essa transição na estrutura quaternária do dímero provoca a mudança de posição da região C-terminal (DA SILVA GIOTTO *et al.*, 1998), apoiando a sugestão do envolvimento desta região no modelo proposto de danificação da membrana Ca²⁺-independente.

Resultados recentemente descritos por CHIOATO e colaboradores (2002) mostraram que os resíduos da região C-terminial estão envolvidos no sítio miotóxico e no mecanismo de danificação de membranas. Testes de liberação de calceína encapsulada em lipossomos revelaram que os determinantes estruturais 115-116 e 122 a 127 da região C-terminal de BthTx-I causaram uma redução significativa na atividade de danificação de membranas artificiais (figura 36). A redução na danificação de membranas artificiais para esta região foi mais evidente que no efeito bactericida. Provavelmente, a diferença deve-se à composição diferente das duas membranas. Esses resultados mostraram que os resíduos da região de 115 a 117 e 122 a 129 da alça C-terminal alteraram tanto a atividade bactericida contra linhagem *E.coli*, quanto à atividade de danificação em membranas artificiais, evidenciando uma correlação entre esses dois efeitos. Esta conclusão é significante, pois é a primeira vez que o efeito de danificação de membranas Ca²⁺-independente tem sido correlacionado com a permeabilização de uma membrana biológica. Isto sugere que o modelo do mecanismo de

ação da BthTx-I em membranas artificiais seja relevante para o entendimento do mecanismo de permeabilização de membranas biológicas.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES.

- O efeito bactericida da proteína BthTx-I nativa revelou ausência de atividade contra linhagem Gram-positiva, *Micrococcus luteus* e presença de atividade contra linhagem Gram-negativa, *Escherichia coli* (K12).
- 2) Os aminoácidos da região C-terminal de BthTx-I estão envolvidos no mecanismo bactericida contra linhagem *E.coli*.
- 3) O efeito bactericida de BthTx-I promove a permeabilização da membrana externa de *E.coli*, porém a região C-terminal não está envolvida nesta atividade.
- As cargas positivas e hidrofóbicas da região C-terminal de BthTx-I atuam como determinantes estruturais na atividade de permeabilização da membrana citoplasmática de *E.coli*.
- 5) A técnica de citometria de fluxo confirmou a importância da região C-terminal na atividade de permeabilização da membrana citoplasmática de *E.coli*.
- 6) Os determinantes estruturais do efeito de danificação da membrana citoplasmática bacteriana e danificação de membranas Ca²⁺-independente são os mesmos, mostrando a correlação entre as duas atividades.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

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 cristalogra., D**51**, 311-317.

Arni R.K., Ward R.J. (1996) Phospholipase A2 - A structural review. Toxicon 34, 827-841.

- Babu A.S., Gowda T.V. (1994) Dissociation of enzymatic activity from toxic properties of the most basic phospholipase A2 from Vipera russelli snake venom by guanidination of lysine residues. Toxicon 32, 749 – 752.
- Batas, B., Chauduri, B. (1996) Refolding proteins at high concentration using size-exclusion chromatography. Biotechnol. Bioeng. **50**, 16-23.
- Batas, B., Schiraldi, C., Chauduri, B. (1999) Inclusion body purification and protein refolding using microfiltration and size exclusion chromatography. J. Biotech. **86**, 149-158.
- Beers S.A., Buckland A.G., Koduri R.S., Cho W., Gelb M.H., Wilton DC. (2002) The antibacterial properties of secreted phospholipases A2: a major physiological role for the group IIA enzyme that depends on the very high pl d the enzyme to allow penetration of the bacterial cell wall. J Biol Chem. **277(3)**, 1788-93.
- Brunie S., Bolin J., Gerwith D., Sigler P.B., (1985). The refined crystl structure of dimeric phospholipase A₂ at 2.5 Å. Access to a shielded catalytic site. J. Biol. Chem. **260**, 9742-9749.
- Bultron E., Gutierrez J.M., Thelestam M. (1993) Effects of Bothrops asper (terciopelo) myotoxin III, a basic phospholipase A2, on liposomes and mouse gastrocnemius muscle. Toxicon. **31**, 217-22.

- Calderon, L., Lomonte, B. (1998) Immunochemical characterization and role in toxic activities of region 115-129 of myotoxin II, a Lys49 phospholipase A2 from *Bothrops asper* snake venom. Arch Biochem Biophys. **358(2)**, 343-50.
- Calderón, L., Lomonte, B. (1999) Inhibition of the myotoxic activity of Botrops asper myotoxin II im mice by immunization with its synthetic 13-mer peptide 115-129. Toxicon 37, 683-687.
- Chacur M., Longo I., Picolo G., Gutierrez J.M., Lomonte B., Guerra J.L., Teixeira C.F., Cury Y. (2003) Hyperalgesia induced by Asp49 and Lys49 phospholipases A2 from Bothrops asper snake venom: pharmacological mediation and molecular determinants. Toxicon. **41(6)**, 667-78.
- Chacur M., Milligan E.D., Sloan E.M., Wieseler-Frank J., Barrientos R.M., Martin D., Poole S., Lomonte B., Gutierrez J.M., Maier S.F., Cury Y., Watkins L.R. (2004) Snake venom phospholipase A2s (Asp49 and Lys49) induce mechanical allodynia upon peri-sciatic administration: involvement of spinal cord glia, proinflammatory cytokines and nitric oxide. Pain. **108(1-2)**, 180-91.
- Chang C.C., Lee C.Y., Eaker D. e Fohlman J. (1977) The presynaptic neuromuscular blocking action of taipoxin. A comparison with β-bungarotoxin and crotoxin. Toxicon, **15**, 571-576.
- Chioato L., (2001) "Análise funcional da alça C-terminal de Botropstoxina-I, uma fosfolipase A₂LYS 49 isolada do veneno de *Bothrops jararacussu*", Dissertação de mestrado apresentada a Faculdade de Medicina USP Ribeirão Preto.
- 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 Gterminal region of a Lys49-phospholipase A2. Biochem **366**, 971-6.
- Chioato L., 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)**, 869-83.
- Côrte-Real, M.; Sansonetty, F.; Ludovico, P.; Prudêncio, C.; Rodrigues, F.; Fortuna, M.; Sousa, M.; Silva, M. e Leão, C. 2002. Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras. Boletim de Biotecnologia **71**: 19-33.
- Davidson F.F., Dennis, E.A. (1990) Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipase A₂ from snake venom to human secreted forms. J Mol Evol. **31(3)**, 228-38.
- Díaz C., Gutiérrez J.M., Lomonte B., 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.
- Díaz Oreiro C., Gutiérrez J.M. (1997) Chemical modification of histidine and lysine residues of myotoxic phospholipases A2 isolated from Bothrops asper and Bothrops godmani snake venoms: effects on enzymatic and pharmacological properties.Toxicon **35**, 241-252.
- Doležel, J. 1997a. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. *Journal of Applied Genetics* **38 (3)**: 285-302.
- Fletcher J.E., Rapuano B.E., Condrea E., Yang C.C., Rosenberg P. (1981) Relationship between catalysis and toxicological properties of three phospholipases A2 from elapid snake venoms. Toxic Appl. Pharmac. 59, 375-382.
- Francis B., Gutiérrez J.M., Lomonte B., Kaiser, I.I. (1991) Myotoxin II from Bothrops asper (Terciopelo) venom is a lysine-49 phospholipase A2. Arch Biochem Biophys **284**, 352-359.

- Freer E., Moreno E., Moriyon I., Pizarro-Cerda J., Weintraub A., Gorvel J.P. (1996) Brucella-Salmonella lipopolysaccharide chimeras are less permeable to hydrophobic probes and more sensitive to cationic peptides and EDTA than are their native Brucella sp. counterparts. J Bacteriol. **178(20)**, 5867-76.
- Gant, V. A., Warnes, G., Phillips, I., Savidge, G. F. (1993) The application of flow cytometry to the study of bacterial responses to antibiotics. *J. Med. Microbiol.* **15**, 147-154.
- Gerrard J.M., Robinson P., Narvey M. and McNicol A. (1993) Increased phosphatidic acid and decreased lysophosphatidic acid in response to thrombin is associated with inhibition of platelet aggregation. *Biochem.* Cell. Biol. **71**, 432-439.
- Giuliani C.D., Iemma M.R., Bondioli A.C., Souza D.H., Ferreira L.L., Amaral A.C., Salvini T.F., Selistrede-Araujo, H.S. (2001) Expression of an active recombinant lysine 49 phospholipase A(2) myotoxin as a fusion protein in bacteria. Toxicon. **39(10)**, 1595-1600.

Gore M.G. Spectrofotometry & Spectrofluorimetry (1998). Ed. Pratical Approach, p 345.

- Gutierrez J.M., Lomonte B. (1995) Phospholipase A2 Myotoxins from Bothrops Snake Venoms. Toxicon, **33**, 1404-1424.
- Hanasaki K, Arita H. (1999) Biological and pathological functions of phospholipase A(2) receptor. Arch Biochem Biophys. **372(2)**, 215-23.
- Ho I.C., Arm J.P., Bingham C.O., Choi A., Austen K.F., Glimcher L.H. (2001) A novel group of phospholipase A2s preferentially expressed in type 2 helper T cells. J Biol Chem. 276(21), 18321-6.

- Holland D.R. Clancy L.L., Muchmore S.W., Ryde T.J., Einspahr H.M., Finzel B.B., Heinrickson R.L.,
 Watenpaugh K.D. (1990) The crystal structure of a lysine 49 phospholipase A2 from the venom of
 the cottonmouth snake at 2.0-A resolution. J. B. Chem., **265**, 17649-17655.
- Humphreys, M. J., Allman R. and Lloyd D. (1994) Determination of the viability of *Trichomonas vaginalis* using flow cytometriy, *Cytometriy* **15**, 343-348.
- Jernaes, M. W., Steen, H. B. (1994) Staining of Escherichia coli for flow cytometry-influx and efflux of ethidium bromide. *Cytometry* **17**, 302-309.
- Kelley M.J., Crowl R.M., Dennis E.A. (1992) Renaturation of cobra venom phospholipase A2 expressed from a synthetic gene in Escherichia coli. Biochim Biophys Acta. **1118(2)**, 107-115.
- Kuo K.W., Chen Y.C. and Chang C.C. (1995) cDNA sequence analysis and expression of alphabungarotoxin from Taiwan banded krait *Bungarus multicinctus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216, 1088–1094.
- Lambeau G., Lazdunski M. (1999) Receptors for a growing family of secreted phospholipases A2. Trends Pharmacol Sci., **20(4)**, 162-70.
- Lebaron, P., Catala, P., Parthuisot, N. (1998) Effectiveness of Sytox green stain for bacterial viability assessment. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2697-2700.
- Lefkowitz L.J., Deems R.A., Dennis E.A. (1999). Expression of group IA phospholipase A₂ in *Pichia pastoris*: identification of a phosphatidylcholine activator site using site-directed mutagenesis. Biochemistry **38(43)**, 14174-14184.

- Li Y., Yu B.Z., Zhu H., Jain M.K., Tsai M.D. (1994) Phospholipase A2 engineering. Structural and functional roles of the highly conserved active site residue aspartate-49. Biochemistry **33(49)**, 14714-22.
- Liang N.S., Pungercar J., Krizaj I., Strukelj B., Gubensek, F. (1993) Expression of fully active ammodytoxin A, a potent presynaptically neurotoxic phospholipase A2, in Escherichia coli. FEBS Lett. **334(1)**, 55-59.
- Liu X., Pan H., Yang G., Wu X. and Zhou Y. (1999) Cloning, expression and biochemical characterization of a basic–acidic hybrid phospholipase A₂-II from *Agkistrodon halys Pallas*. Biochim. Biophys. Acta **1431**, 157–165.
- Lomonte B., 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.
- Lomonte B., Moreno E., Tarkowski A., Hanson L.A., Maccarama, M. (1994a) Neutralizing interaction between heparin and myotoxin II, a Lys49 phospholipase A2 from Bothrops asper snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modelling. J. Biol. Chem. **269**, 29867-29873.
- Lomonte B., Lundgren J., Johansson B., Bagge U. (1994b) The dynamics of local; tissue damage induced by Bothrops asper snake venom and myotoxin **I** on the mouse cremaser muscle: an intravital and electron microscopic study. Toxicon **32**, 41-55.
- Lomonte B., Angulo Y., Calderon L. (2003) An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. Toxicon. **42(8)**, 885-901.

- Mason, D. J., Gant, V. A. (1995a) The application of flow cytometry to the estimation of antibiotic susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.* **36**, 441-443.
- Mason, D. J., Power, E. G. M., Talsania, H., Phillips, I., Gant, V. A. (1995b) Antibacterial action of ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 2752-2758.
- Maraganore J.M., Merutka G., Cho W., Welches W., Kezdy F.J., Heinrikson R.L. (1984) A new class of phospholipases A2 with lysine in place of aspartate 49. Functional consequences for calcium and substrate binding. J Biol Chem. **259(22)**, 13839-43.
- Martinez de Tejada, G., Pizarro-Cerdá, J., Moreno, E. & Moriyón, I. (1995) The outer membranes of *Brucella spp.* are resistant to bactericidal cationic peptides, *Infect. Immun.* **63**, 3054-3061.
- Mebs D. (1986). Myotoxic activity of phospholipase A2 isolated from cobra venoms: neutralization by polyvalent antivenoms. Toxicon **24**,161-168.
- Mortimer, F.C., Mason, D.J., Gant, V.A. (1999) Flow cytometric monitoring of antibiotic-induced injury in *Escherichia coli* using cell-impermeant fluorescent probes, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**, 676-681.
- de Oliveira A.H., Giglio J.R., Andriao-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. Biochemistry. 40(23), 6912-20.
- Ordoñez, J. V., Wehman, N. M. (1993) Rapid flow cytometric antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus*. *Cytometry* **14**, 811-818

- Ownby C.L., Selistre de Araujo H.S., White S.P., Fletcher J.E. (1999) Lysine 49 phospholipase A2 proteins. Toxicon **37(3)**, 411-45.
- 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: syntthetic Lys49 myotoxin II-(115-129)-peptide identifies its bactericidal region. Eur. J. Biochem. 253, 452-461.
- Pedersen J.Z., de Arcuri B.F., Moreno R.D., Ruffini, S. (1994) Phospholipase-like myotoxins induce rapid membrane leakage of non-hydrolyzable ether-lipid liposomes. Biochim. Biophys. Acta **1190**, 117-180.
- Pedersen J.Z., Lomonte B., Massoud R., Gubensek F., Gutierrez J.M., Rufini S. (1995) Autocatalytic acylation of phospholipase-like myotoxins. Biochemistry. **34(14)**, 4670-5.
- Pieterson 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. Biochemistry **13(7)**, 1455-1460.

Ramirez F., Jain M.K. (1991). Phospholipase A2 at the bilayer interface. Proteins. 9(4), 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.
- Roth, B. L., Poot, M., Yue, S. T., Millard, P.J. (1997) Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX green nucleic acid stain. *App. And Environ. Microbiol.* **63**, 2421-2431.

- Rufini S., Cesaroni P., Desideri R.F., Gubensek F., Gutiérrez J.M., Luly P., Maassoud R., Morero R., Pedersen, J. Z. (1992) Calcium Ion Independent Membrane Leakage Induced by Phospholipaselike Myotoxins. Biochemistry **31**, 12424-12430.
- Ruller R. (1999) "Avaliação da forma dimérica na atividade danificadora de membranas Cálcio independente de Botropstoxina-I de Bothrops jararacussu", Dissertação de mestrado apresentada a Faculdade de Medicina – USP Ribeirão Preto.
- 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.
- Scott D.L., White S. P., Otwinowski Z., Yuan, W., Gelb M. H. e Sigler P. B. (1990b) Interfacial Catalysis: The Mechanism of Phospholipase A2. Science **250**, 1541-1546.
- Scott D.L., Achari A., Vidal J.C. and Sigler P.B. (1992) Crystallographic and biochemical studies of the (inactive) Lys-49 phospholipase A2 from the venom of Agkistridon piscivorus piscivorus. J.Bio. Chem. 267, 22645-22657.
- Scott D.L., Sigler P.B. (1994) Structure and catalytic mechanism of secretory phospholipases A2. Adv. Protein Chem. **45**, 53-88.
- Segrest J.P., de Loof H., Dohlman J.G., Brouillette C.G. and Anantharamaiah G.M. (1990) Amphipatic Helix Motif: Classes and Properties. Proteins, **8**, 103-117.
- 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 Lys49phospholipase A₂ homologue. Prot. Struct. Funct. Genet. **30**, 442 – 454.

- Six D.A., Dennis E.A. (2000) The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. Biochim Biophys Acta, **1488(1-2)**, 1-19.
- Soares A.M., Andrião-Escarso S.H., Angulo Y., Lomonte B., Gutiérrez J.M., Marangoni S., Toyama M.H., Arni R.K., Giglio J.R., (2000a) Structural and Functional Characterization of Myotoxin I, a Lys49 Phospholipase A Homologue from *Bothrops moojeni* (Caissaca) Snake Venom. Arch. Biochem. Biophy. **373**, 7-15.
- Soares A.M., Guerra-Sá R., Borja-Oliveira C.R., Rodrigues V.M., Rodrigues-Simioni L., Rodrigues, V., Fontes M.R.M., Lomonte B., Gutiérrez J.M., Giglio, J.R. (2000b) Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. Arch. Biochem. Biophy. **378**, 201-209.
- Soares A.M., Mancin A.C., Cecchini A.L., Arantes E.C., Franca S.C., Gutierrez J.M., Giglio J.R. (2001) Effects of chemical modifications of crotoxin B, the phospholipase A(2) subunit of crotoxin from Crotalus durissus terrificus snake venom, on its enzymatic and pharmacological activities.Int J Biochem Cell Biol.;**33(9)**, 877-88.
- Studier F.W., Moffatt B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective highlevel expression of cloned genes. J. Mol. Biol. **189 (1)**, 113-130.
- Szoka F., Papahadjopoulos, D (1978) Formation of large unilamellar vesicles by reverse phase evaporation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **75**, 4194-4198.
- Teixeira C.F., Cury Y., Oga S., Jancar S. (1994) Hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom in rats: role of eicosanoids and platelet activating factor (PAF). Toxicon. **32**, 419-26.

- Teixeira C.F., Landucci E.C., Antunes E., Chacur M., Cury Y. (2003) Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. Toxicon. **42(8)**, 947-62.
- Thannhauser, T.W., Konishi e Scheraga, H.A. (1984) Sensitive quantitative analysis of disulfide bonds in polypeptides and proteins. *Analytical Biochem.* **138**, 181-188.
- Thunnissen M. M. G. M., Elso A. B., Kalk K. H., Drenth J., Dijkastra B. W., Kuipers O. P., Dijkman R., de Haas G. H. e Verheij H. M. (1990) Xray structure of phospholipase A2 complexed with a substrate-derived inhibitor. Nature, **347**, 689-691.
- Träube, H. & Overath, P. (1973) The structure of *Escherichia coli* membranes studied by fluorescence measurements of lipid phase transitions, *Biochim. Biophys. Acta* **307**, 491-512.
- van Deenen L.L.M, 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.
- Valentin E, Lambeau G. (2000) Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A(2) and their receptors and binding proteins. Biochim Biophys Acta **1488(1-2)**, 59-70.
- Verheij H.M., Slotboom A.J., de Haas G.H. (1981) Structure and function of phospholipase A2. Rev Physiol Biochem Pharmacol. **91**, 91-203.

- Ward R.J., Rodrigues Alves A., Rugierro Neto J., Arni R.K., Casari, J. (1998) A SequenceSpace 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.
- Ward R.J., de Oliveira A.H.C., Bortoleto R.K., Rosa J., Faça V.M., Greene L.J. (2001) Refolding and purification of Bothropstoxin-I, a Lys49-Phospholipase A₂ Homologue, expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*. Protein Express. Purific. **21**, 134-140.
- Ward R.J., Chioato L., de Oliveira A.H., Ruller R., Sa, J.M. (2002) Active -site mutagenesis of a Lys49phospholipase A2: biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis. Biochem J. **362** (Pt 1), 89-96.
- Yang W.L., Peng L.S, Zhong X.F., Wei J.W., Jiang X.Y., Ye L.T., Zou L., Tu H.B., Wu W.Y. and Xu A.
 (2003) Functional expression and characterization of a recombinant phospholipase A₂ from sea snake *Lapemis hardwickii* as a soluble protein in *E. coli*. Toxicon **41**, 713–721.
- Yuan Y., Jackson S.P., Mitchell C.A. and Salem H.H. (1993) Purification and characterisation of a snake venom phospholipase A2: a potent inhibitor of platelet aggregation. Thromb. Res., **70**, 471-481.
- Zambelli, V. O. (2003) Efeito nociceptivo inducido por fosfolipase A2 variante Lys49: avaliação do mecanismo de ação através do uso de mutações pontuais de Bothropstoxina-I. Monografia apresentada a Universidade Estadual Paulista, campus de Botucatu.
- Zhao K., Song S., Lin Z., Zhou Y. (1998) Structure of a basic phospholipase A2 from Agkistrodon halys Pallas at 2.13 A resolution. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. **54** (Pt 4), 510-21.