ESTUDOS DA INTERAÇÃO ENTRE ÁCIDOS GRAXOS E Lys49-FOSFOLIPASES A₂ POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X E RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Andre Luis Berteli Ambrosio

Dissertação apresentada ao
Instituto de Física de São
Carlos da Universidade de São
Paulo, para a obtenção do título
de Mestre em Física Aplicada –
Área de concentração: Física
Biomolecular.

Orientador: Prof. Dr. Richard Charles Garratt

São Carlos
2003

à minha mãe, à
memória de meu pai,
à minha irmã Cíntia
e à minha namorada Sandra

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Richard Charles Garratt e à Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza pela indubitável orientação, liberdade de trabalho, amizade, etc...

À Dra. Maria Cristina Nonato pela preciosa colaboração e constante incentivo, desde meus tempos de iniciação científica. Um exemplo que sigo.

À todo o pessoal do grupo de Cristalografia de Proteínas do Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural (professores, alunos e funcionários), pela agradável convivência.

À Dra. Lucimara Forato e ao Prof. Luis Alberto Colnago, da Embrapa/SC, essenciais aos objetivos deste projeto.

À todos os meus amigos dentro e fora da USP.

À todo o pessoal do Instituto de Física de São Carlos/USP.

À minha família.

E àqueles que de maneira direta ou indireta contribuíram para o bom andamento deste projeto.

Obrigado à **FAPESP** pelo auxílio financeiro (processo # 00/14959-8).

SUMÁRIO

Lista de figuras.....	III
Lista de tabelas.....	VI
Resumo.....	VIII
Abstract.....	IX
 CAPÍTULO 1 - A ENZIMA E O PROBLEMA BIOLÓGICO.....	 1
1.1 - Classificação.....	2
1.2 - Fosfolipases A₂.....	3
1.2.1 - Sítio de ligação de cálcio.....	8
1.2.2 - Sítio ativo.....	9
1.2.3 - Mecanismo catalítico.....	10
1.2.4 - Lys49-fosfolipases A₂ (Lys49-PLA₂).....	13
1.3 - Referências.....	15
 CAPÍTULO 2 - CRISTALIZAÇÃO DA MIOTOXINA ACL.....	 18
2.1 - Extração e purificação.....	20
2.2 - Cristalização.....	21
2.3 - Referências.....	24
 CAPÍTULO 3 - COLETA E PROCESSAMENTO DOS DADOS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X.....	 26
3.1 - Preparação dos cristais e coleta de dados.....	28
3.1.1 - Primeira forma cristalina (forma I).....	28
3.1.2 - Segunda forma cristalina (forma II).....	35
3.1.3 - Terceira forma cristalina (forma III).....	37
3.2 - Referências.....	41
 CAPÍTULO 4 - OBTENÇÃO DAS FASES E REFINAMENTO DAS ESTRUTURAS CRISTALOGRÁFICAS.....	 43
4.1 - Primeira forma cristalina.....	46
4.1.1 - Obtenção das fases iniciais.....	46
4.1.2 - Construção e refinamento do modelo.....	48
4.1.3 - Análise da qualidade do modelo.....	56

4.2 - Segunda forma cristalina.....	60
4.2.1 - Obtenção das fases iniciais.....	60
4.2.2 - Construção e refinamento do modelo.....	60
4.2.3 - Análise da qualidade do modelo.....	62
4.3 - Terceira forma cristalina.....	65
4.3.1 - Obtenção das fases iniciais.....	65
4.3.2 - Construção e refinamento do modelo.....	65
4.3.3 - Análise da qualidade do modelo.....	67
4.4 - Referências.....	71
 CAPÍTULO 5 - ANÁLISES ESTRUTURAIS E DISCUSSÕES.....	73
5.1 - Descrição dos modelos cristalográficos.....	74
5.1.1 - Primeira forma cristalina.....	74
5.1.2 - Segunda forma cristalina.....	82
5.1.3 - Terceira forma cristalina.....	86
5.2 - Análise conjunta das variações estruturais.....	89
5.3 - Comparação estrutural com outras Lys49-PLA ₂	94
5.4 - Dímero versus monômero.....	99
5.5 - Correlação entre atividade catalítica, efeito citotóxico e estrutura.....	104
5.6 - Uma proposta consenso.....	107
5.7 - Referências.....	110
 CAPÍTULO 6 - ANÁLISE DA INTERAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS COM A MIOTOXINA ACL POR ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹³ C.....	113
6.1 - Resultados experimentais.....	117
6.1.1 - Complexo ácido oléico:proteína.....	117
6.1.2 - Complexos ácido palmítico:proteína e ácido esteárico:proteína.....	120
6.2 - Análise dos resultados.....	122
6.3 - Referências.....	124
 CAPÍTULO 7 - CONCLUSÕES.....	125
 Apêndice A.....	128
Apêndice B.....	129

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1.1: A especificidade das fosfolipases.....	3
Fig. 1.2.1: Representação de uma molécula de fosfolipídio na interface de uma membrana.....	4
Fig. 1.2.2: Enovelamento das PLA ₂ ilustrando as características gerais das classes I e II.....	8
Fig. 1.2.1.1: Ilustração do íon Ca ²⁺ e seus ligantes	8
Fig. 1.2.2.1: Ilustração do sítio ativo das fosfolipases A ₂	9
Fig. 1.2.3.1: O mecanismo catalítico das PLA ₂ segundo White e colaboradores ..	12
Fig. 1.2.4.1: Esquema do sítio ativo das Lys49-PLA ₂	14
Fig. 2.1.1: Exemplar da serpente <i>A.c. laticinctus</i> , e sua localização geográfica.....	20
Fig. 2.2.1: Esquema do método de difusão de vapor em gotas suspensas	22
Fig. 2.2.2: Cristais da Miotoxina ACL crescidos na condição 15 do fatorial I Hampton	23
Fig. 2.2.3: Cristais da miotoxina ACL crescidos na condição determinada por Treharne e colaboradores.....	23
Fig. 3.1.1.1: Padrão de difração característico da Miotoxina ACL para os cristais da forma I	29
Fig. 3.1.1.2: Autoindexação com o programa MOSFLM.....	31
Fig. 3.1.1.3: Principais estatísticas do processamento de dados para a forma I.....	33
Fig. 3.1.2.1: Principais estatísticas do processamento de dados para a forma II.....	36
Fig. 3.1.3.1: Análise da quantidade e da qualidade do sinal anômalo do enxofre a 1,5418 Å.....	39
Fig. 3.1.3.2: Principais estatísticas do processamento de dados para a forma III.....	40
Fig. 4.1.1.1: Alinhamento sequencial para a escolha de um modelo para a substituição molecular da forma I da Miotoxina ACL	47
Fig. 4.1.2.1: Evolução do refinamento da estrutura cristalográfica da primeira forma cristalina em função do numero de ciclos.....	51
Fig. 4.1.2.2: Densidade eletrônica para o ácido graxo na forma I.....	52
Fig. 4.1.2.3: Densidade eletrônica do íon sulfato na forma I.....	53
Fig. 4.1.2.4: Densidade eletrônica da molécula de glicerol na forma I	53
Fig. 4.1.2.5: Regiões de boa correlação nos mapas de densidade eletrônica	54

Fig. 4.1.2.6: Regioes de ausência de densidade eletrônica.....	55
Fig. 4.1.3.1: Diagrama de Ramachandram para a forma I drais (ϕ e ψ)	56
Fig. 4.1.3.2: Análise estereoquímica da forma I feita pelo PROCHECK	58
Fig. 4.1.3.3: Avaliação do acordo entre o modelo e a densidade eletrônica para a Miotoxina ACL na primeira forma cristalina feita pelo SFCHECK	59
Fig. 4.2.2.1: Íon sulfato co-cristalizado na forma II	61
Fig. 4.2.3.1: Diagrama de Ramachandram para a segunda forma.....	62
Fig. 4.2.3.2: Análise estereoquímica da forma II feita pelo PROCHECK	63
Fig. 4.2.3.3: Avaliação do acordo entre o modelo e a densidade eletrônica para a forma II feita pelo SFCHECK	64
Fig. 4.3.2.1: Modelo inicial construído pelo programa ARP/wARP, indicando os sítios dos enxofres	66
Fig. 4.3.2.2: Parte representativa do mapa de densidade eletrônica após modificação da densidade através de achatamento do solvente e construção automática do modelo.	67
Fig. 4.3.3.1: Diagrama de Ramachandram para a terceira forma cristalina	68
Fig. 4.3.3.2: Análise estereoquímica da terceira forma feita pelo PROCHECK....	69
Fig. 4.3.3.3: Avaliação do acordo entre o modelo e a densidade eletrônica para a forma III feita pelo SFCHECK.....	70
Fig. 5.1.1.1: Estrutura cristalográfica da primeira forma cristalina da Miotoxina ACL, em representações de átomos (a) e estruturas secundárias.....	75
Fig. 5.1.1.2: Padrão de pontes dissulfeto características das Lys49-PLA ₂	76
Fig. 5.1.1.3: Coordenações da Lys49 na primeira forma cristalina da Miotoxina ACL.....	76
Fig. 5.1.1.4: Ilustração das moléculas de ácido graxo e glicerol, presentes na primeira forma cristalina da Miotoxina ACL	79
Fig. 5.1.1.5: Íon sulfato presente na forma I.....	80
Fig. 5.1.1.6: Contatos entre C-terminal e loop de ligação de Ca ²⁺ para a forma I da Miotoxina ACL.....	81
Fig. 5.1.1.7: "Calo" hidrofóbico observado na forma I.....	82
Fig. 5.1.2.1: Localizações da Lys49 e o íon sulfato na forma II.....	84
Fig. 5.1.2.2: Contatos entre C-terminal e loop de ligação de Ca ²⁺ para a segunda forma da Miotoxina ACL	85
Fig. 5.1.2.3: Superfície de van der Waals indicando a ausência do “calo” hidrofóbico para a forma II.....	86
Fig. 5.1.3.1: Coordenações da Lys49 e do íon sulfato para a terceira forma cristalina.....	87

Fig. 5.1.3.2: Contatos entre C-terminal e o <i>loop</i> de ligação de cálcio para a forma III da Miotoxina ACL.....	88
Fig. 5.1.3.3: Superfície de van der Waals indicando a ausência “calo” hidrofóbico, mas na terceira forma cristalina.....	89
Fig. 5.2.1: Desvio quadrático médio dos Ca por resíduo na sobreposição estrutural das formas II e III em relação à forma I da Miotoxina ACL 90	
Fig. 5.2.2: Sobreposição estrutural entre os Ca das três formas cristalinas da Miotoxina ACL.....	91
Fig. 5.2.3: Sobreposição equivalente à mostrada na figura anterior, agora ilustrando a enorme variação conformacional também das cadeias laterais para os <i>loops</i> C-terminal e de ligação de cálcio	92
Fig. 5.2.4: Sobreposição estrutural entre as formas II e III da Miotoxina ACL, com a estrutura de uma Asp49-PLA ₂ em complexo com o análogo do estado de transição.....	93
Fig. 5.3.1: Alinhamento sequencial entre as Lys49-PLA ₂ envolvidas na discussão deste trabalho	95
Fig. 5.3.2: Sobreposição de todas as estruturas de Lys49-PLA ₂ disponíveis, indicando variações conformacionais dos <i>loops</i> de ligação de Ca ²⁺ e C-terminal.....	96
Fig. 5.3.3: Mudanças conformacionais observadas nas formas II e III da Miotoxina ACL (em verde), devido à presença dos íons sulfato	99
Fig. 5.4.1: Modelo de dimerização proposto por Ward e colaboradores.....	100
Fig. 5.4.2: Disposição desfavorável das asas-β para formação do dímero proposto por Ward e colaboradores, observada na estrutura cristalina da forma I da Miotoxina ACL.....	102
Fig. 5.4.3: Sobreposição estrutural entre a estrutura da Miotoxina II com as estruturas das Lys49-PLA ₂ monoméricas.....	103
Fig. 5.6.1: Desenho esquemático da correlação entre a atividade catalítica e os efeitos miotóxicos e de danos à membrana, proposta neste trabalho.....	110
Fig. 6.1.1: Espectros de RMN de ¹³ C para a Miotoxina ACL, após interações com 2 e 3 equivalentes de ácido oléico.....	118
Fig. 6.1.2: Espectro de RMN de ¹³ C para o ácido oléico livre em solução e nas proporções de 2:1 e 3:1.....	119
Fig. 6.2.1: Espectro de RMN de ¹³ C para o ácido palmítico em solução com a Miotoxina ACL.....	121
Fig. 6.2.2: Espectro de RMN de ¹³ C para o ácido esteárico em solução com a Miotoxina ACL.....	122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.2.1: As diferentes classes de fosfolipases A_2 e algumas de suas características.....	7
Tabela 3.1.1.1: Parâmetros e valores finais do processamento dos dados coletados para a primeira forma cristalina da Miotoxina ACL.....	34
Tabela 3.1.2.1: Parâmetros e valores finais do processamento dos dados coletados para a segunda forma cristalina da Miotoxina ACL.....	37
Tabela 3.1.3.1: Parâmetros e valores finais do processamento dos dados coletados para a terceira forma cristalina da Miotoxina ACL.....	41
Tabela 4.1.1: Melhores soluções para as funções de rotação e translação na busca por uma cópia da molécula na unidade assimétrica, para a primeira forma cristalina da Miotoxina ACL, através do MOLREP. Valores idênticos obtidos para a função de rotação, para os grupos $P4_12_12$ e $P4_32_12$, ilustram o fato dessa busca envolver autovetores de Patterson. A escolha correta deve ser feita analisando-se as soluções para translação e os coeficientes de correlação	48

* todas as figuras de representação de moléculas estão no formato **estereográfico** e foram feitas utilizando-se o programa *PyMOL* vs. 0.86 (Warren L. DeLano "The PyMOL Molecular Graphics System." DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA, USA). <http://www.pymol.org>

RESUMO

Fosfolipases A₂ (PLA₂; E.C. 3.1.1.4) constituem uma família de enzimas amplamente estudada com o objetivo de se caracterizar as bases estruturais de suas propriedades tóxicas e catalíticas. Nos últimos anos, muita atenção tem sido direcionada às PLA₂ miotóxicas e cataliticamente “inativas” (classe II, ~ 15 Kda), nas quais um dos ligantes do cofator Ca²⁺, o resíduo Asp49, é sistematicamente substituído por uma lisina. Estudos recentes mostram que essas variantes apresentem atividade catalítica limitada, uma vez que um dos produtos, uma molécula de ácido graxo, não deixa o sítio ativo após a catálise, devido à presença da Lys122 que de maneira indireta, segura eletrostaticamente o grupo ácido desta molécula. Cristais da Miotoxina ACL (extraída do veneno da serpente *Agkistrodon contortrix laticinctus*), crescidos no grupo espacial P4₁2₁2, foram obtidos em três condições diferentes. Dados de difração de raios X para cristais das primeiras e segundas formas foram coletados usando radiação síncrotron na linha PCr do LNLS e para cristais da terceira forma foram coletados no sistema de ânodo rotatório ultraX 18 em nosso laboratório. O processamento dos dados foi realizado e uma solução para a substituição molecular das duas primeiras formas foi encontrada usando a também Lys49-PLA₂ da serpente *Agkistrodon p. piscivorus* como modelo de busca. Para resolução da terceira forma foram usadas informações do espalhamento anômalo dos átomos de enxofre da molécula, com dados coletados à um comprimento de onda correspondente a radiação K α do cobre. Ciclos sucessivos de refinamento, tanto no espaço recíproco como no real, foram realizados, e a existência de uma densidade eletrônica dentro do sítio ativo na forma I sugere a presença de uma molécula de ácido graxo, não observada nas outras duas formas. Comparações entre as três formas demonstram que modificações envolvendo o *loop* de ligação de cálcio e o C-terminal são as responsáveis pelas diferenças estruturais principais, uma vez que nas duas últimas formas, a His33 ocupa o lugar da Lys122 na primeira forma e o Trp31 oclui parcialmente o sítio de ligação do ácido graxo. Essa é primeira vez em que são observadas três formas estruturalmente diferentes para uma Lys49-PLA₂. Neste trabalho propomos um mecanismo relacionando a retenção do ácido graxo com mudanças conformacionais associadas à danos em membranas e miotoxicidade.

ABSTRACT

Phospholipases A₂ (PLA; E.C. 3.1.1.4) constitute a family of enzymes which has been widely studied with a view to the clarification of the structural basis of their catalytic properties and toxicity. In recent years much attention has been directed toward studies of catalytically 'inactive' myotoxic PLA₂ (class II, ~ 15 KDa), in which one of the ligands of the essential ion Ca²⁺, Asp49, is substituted by a lysine. Recent studies have shown that the Lys49 variants may present limited catalytic activity but that one of the products, fatty acid, does not leave the active site after catalysis due the presence of Lys122 which indirectly electrostatically secures the acidic headgroup. Crystals of the Myotoxin ACL (from *Agkistrodon contortrix laticinctus*), in the space group P4₁2₁2, were obtained in three different conditions. Data from the best crystals of the first and second forms were collected using synchrotron radiation on the PCr beamline of the LNLS and the data set for the third crystal form was collected on an ultraX 18 rotating anode system in our own laboratory. Data processing was performed and a molecular replacement solution for the two first forms found using the Lys49-PLA₂ of the *Agkistrodon p. piscivorus* as a search model. Sulfur-SAD at the Cu-K α wavelength was used to solve the structure of the third form. Cycles of refinement in both reciprocal and real space have been undertaken, and the presence of an electron density residing in the active site channel of the first crystal form suggests the presence of a bound ligand (interpreted as a free fatty acid), not observed in the second and third crystal forms. Comparisons suggest that a concerted conformational change involving the exit to the Ca²⁺ binding loop and the C-term loop represents the principal structural differences between the crystal forms. Fatty acid binding in the second two forms is impeded as a consequence of His33 occupying the site occupied by Lys122 in the first form and by Trp31 which partially occludes the fatty acid binding site. This is the first time that three crystal structures have been described for a Lys49-PLA₂ in both the bound and unbound conformations. In this work we propose a mechanism relating fatty acid retention to conformational changes associated with membrane damage and myotoxicity.

- CAPÍTULO 1 -

A ENZIMA E O PROBLEMA BIOLÓGICO

A importância de moléculas lipídicas no organismo é reflexo de seu envolvimento em processos celulares fundamentais altamente regulados, como crescimento, adesão, formação de membranas, secreção e apoptose, além de interesses medicinais desde trombose até asma (Prescott, 1997). A caracterização dos detalhes moleculares e bioquímicos das fosfolipases merece atenção especial. Estas enzimas, envolvidas em vias sinalizadoras, são tipicamente presentes em baixa quantidade nas células, onde apresentam baixa solubilidade e na maioria das vezes seus substratos hidrofóbicos, os fosfolipídios, se encontram agregados. São conhecidas desde a década de 50, quando suas atividades foram inicialmente caracterizadas em sucos pancreáticos de mamíferos e venenos de cobra (Wittcoff, 1951; Dennis, 1994). Desde então, esforços em clonagem, expressão, purificação, seqüenciamento e determinação estrutural, bem como estudos de regulação de atividade, expressão e localização têm contribuído na elucidação de detalhes funcionais em todas as classes de fosfolipases (Dennis, 1997). Dentro dessas classes, os mais bem conhecidos elementos pertencem à superfamília das fosfolipases A₂ (PLA₂; E.C. 3.1.1.4, Apêndice A). Estas são enzimas que catalisam a hidrólise de fosfolipídios em uma posição específica,

gerando ácidos graxos livres e lisofosfolípidios, sendo assim a chave na liberação de precursores lipídicos de mediação.

A diversidade dentro dessa superfamília de enzimas pode ser classificada de acordo com a localização de seus membros (secretórios ou citosólicos), homologia sequencial, cofator catiônico e peso molecular, resultando assim em pelo menos cinco grupos principais (Dennis, 1997). A justificativa para essa grande diversidade vem do fato de que tecidos e células de mamíferos, assim como venenos de cobras, que freqüentemente abrigam mais que um tipo de PLA₂, possuem vias diferentemente reguladas para metabolismo de ácidos graxos, requerendo que estas enzimas realizem funções cruciais como digestão e modificação de fosfolípidios, reconstrução de membrana, defesa celular, transmissão de sinais e produção de mediadores inflamatórios (Dennis, 1994). As divergências apresentadas por essas enzimas em termos de estrutura, necessidade de cofator e mecanismo catalítico é notável quando se considera que todas visam o mesmo alvo fosfolipídico e catalisam uma reação de hidrólise. No primeiro capítulo deste trabalho, serão descritas as principais características dessa classe de enzimas, assim como todo o problema biológico que as envolve e que direciona este trabalho.

1.1 - CLASSIFICAÇÃO

As fosfolipases são enzimas que catalisam a hidrólise de fosfolípidios sendo agrupadas de acordo com sua especificidade nas seguintes classes: A₁, A₂, C e D. As ligações hidrolisadas por cada uma dessas classes estão ilustradas na

figura 1.1, onde R_1 e R_2 se referem aos ácidos graxos, respectivamente nas posições *sn-1** e *sn-2* e X se refere a um grupo polar (Dennis, 1983).

Fig. 1.1: A especificidade das fosfolipases. As classes A_1 e A_2 hidrolisam as ligações éster de glicerofosfolípidios nas posições *sn-1* e *sn-2* do glicerol, respectivamente. Cada uma das fosfolipases C e D rompem uma das ligações fosfodiéster no grupo polar.

Geralmente, as fosfolipases possuem maior especificidade nas posições de ataque dos fosfolípidios do que para um particular ácido graxo ou grupo polar presente nestas ligações. Em sua grande maioria são enzimas digestivas presentes em altas concentrações no suco intestinal, secreções bacterianas e venenos. Participam também em cascatas enzimáticas que geram lipídios altamente ativos e transmissão de sinais.

1.2 - FOSFOLIPASES A_2

As fosfolipases A_2 (PLA_2 , EC 3.1.1.4., Dennis, 1983) foram as primeiras fosfolipases descobertas, baseado em observações de que o suco pancreático e venenos de cobra eram capazes de hidrolisar fosfatidilcolina (Wittcoff, 1951). São enzimas freqüentes na natureza, produzidas por muitos tecidos diferentes, tais como pâncreas de mamíferos e glândulas secretórias de venenos de serpentes.

* *sn* – *stereospecific nomenclature* – adotada pela Comissão de Nomenclatura Bioquímica da IUPAC-IUB (1978)

Estão provavelmente entre as proteínas mais estudadas em termos de características estruturais e propriedades catalíticas. Também conhecidas como fosfatidil acil-hidrolases, são enzimas lipolíticas que catalisam especificamente a hidrólise de grupos 2-acil (posição *sn*-2) dos L-fosfolipídeos (figura 1.2.1), em um mecanismo dependente de cálcio, resultando na produção de ácidos graxos e lisofosfolipídeos. As PLA₂ apresentam notavelmente maior atividade contra membranas ou micelas do que contra fosfolipídios isolados, fenômeno esse conhecido como ativação interfacial (Jain *et al.*, 1986; Gelb *et al.*, 1995).

Em sua maioria são enzimas pequenas, com peso molecular em torno de 14 KDa, solúveis e muito estáveis, provavelmente devido à suas sete pontes dissulfeto, e requerem um íon Ca²⁺ para uma atividade ótima.

Fig. 1.2.1: Representação esquemática de uma molécula de fosfolipídio (no exemplo, uma molécula de fosfatidilcolina) na interface de uma membrana, indicando, pela seta vermelha, a posição *sn*-2 atacada pela fosfolipase A₂.

São tradicionalmente classificadas como intra ou extracelulares (citossólicas ou secretórias). PLA₂ intracelulares são freqüentemente associadas às membranas e estão envolvidas no metabolismo fosfolipídico, transmissão de sinais e outras funções celulares essenciais (Mukherjee *et al.*, 1994).

Além da característica atividade estereolítica, PLA₂ extraídas de venenos de serpentes possuem uma ampla variedade de atividades farmacológicas, tais como neurotoxicidade, miotoxicidade, atividades hemolíticas e anticoagulantes, e propriedades de inibição de agregação plaquetária (Wang *et al.* 1996). Essas atividades são bastante variáveis tanto em número quanto em intensidade de uma PLA₂ para outra, apesar do alto nível de identidade seqüencial freqüentemente observado entre elas.

Estudos cristalográficos têm encontrado aplicações no desenho racional de potentes inibidores de PLA₂ secretória não-pancreática humana (Schevitz, *et al.*, 1995) e o uso do estado de transição e substratos análogos tem contribuído de maneira importante para o corrente entendimento do mecanismo catalítico. Tais estudos têm sido complementados com mutações sítio-dirigidas, determinando funções de resíduos específicos e contribuindo para o entendimento do mecanismo catalítico (White *et al.*, 1990; Scott *et al.*, 1990; Scott *et al.*, 1991; Thunnissen *et al.*, 1990).

Venenos de serpente em geral, são complexos de matéria protéica com diversos efeitos fisiológicos, onde cada espécie de veneno possui diferentes tipos e níveis de toxicidade.

De acordo com os efeitos fisiopatológicos e com a similaridade sequencial as fosfolipases A₂ podem ser classificadas em duas grandes classes, designadas I e II (Cintra *et al.*, 1993).

A classe I é encontrada em venenos das famílias *Elapidae* e *Hydrophidae*, os quais são altamente neurotóxicos, causam paralisia e morte devido à insuficiência respiratória. A classe II, por sua vez, está presente em venenos das famílias *Viperidae* e *Crotalidae*, os quais induzem efeitos locais, tais como hemorragia, necrose e edemas, não causando efeitos neurotóxicos.

Nos últimos anos, novas PLA₂ foram descritas e não se encaixavam em nenhum destes grupos tradicionais, tornando-se então necessária uma nova classificação para estas enzimas. Foi criada então a classe III, com toxinas isoladas principalmente de venenos de lagartos e abelhas. O grupo IV é um grupo distinto, pois inclui enzimas intracelulares de alto peso molecular, mas como os outros três grupos anteriores, é dependente do íon Ca²⁺ para a catálise. O grupo V e outros descritos posteriormente, ainda foram poucos estudados e possuem características não muito bem definidas.

Na tabela 1.2.1 (Six, 2000) encontra-se a classificação dessas diferentes classes, de acordo com peso molecular, fonte, número de pontes dissulfeto, pontes dissulfeto características, e extensão do C-terminal (em relação à classe I).

Tabela 1.2.1: As diferentes classes de fosfolipases A₂ extracelulares e algumas de suas características.

Classes	Fontes comuns	P.M. (KDa)	Número de pontes S-S	Pontes S-S únicas	Extensão C-term
I A	Veneno de serpente	13 - 15	7	11 - 77	—
B	Pâncreas mamífero	13 - 15	7	11 - 77	—
II A	Fluido sinuial humano e veneno de serpente	13 - 15	7	50 - 137	7 res.
B	Veneno de serpente	13 - 15	6	50 - 137	6 res.
C	Testículo de rato	15	8	50 - 137, 86 - 92	7 res.
D	Baço/pâncreas de humano/rato	14 - 15	7	50 - 137	7 res.
E	Cérebro/coração/útero de humano/rato	14 - 15	7	50 - 137	7 res.
F	Testículo/embrião de rato	16 - 17	7	50 - 137	30 res.
III	Abelha/lagarto/escorpião/humano	15 - 18	6	11 - 77, 50 - 137	8 res.
V	Coração/pulmão humano	14	5	—	—
X	Baço/timo humano	14	8	N/A	N/A
IX	Venenos de serpente	14	6	N/A	N/A
XI A	Brotos de arroz (PLA ₂ -I)	12,4	6	N/A	N/A
B	Brotos de arroz (PLA ₂ -II)	12,9	6	N/A	N/A

Nessa dissertação, será dada atenção especial a enzimas obtidas a partir de venenos de diferentes serpentes e pâncreas bovino, membros das classes I e II, que apresentam características parecidas e estão diretamente relacionadas a Miotoxina ACL, as toxinas em estudo.

Membros das classes I e II exibem um alto grau de conservação estrutural (figura 1.2.2), caracterizado por uma α -hélice de doze resíduos na região N-terminal, um *loop* relativamente longo contendo o sítio de ligação do íon cálcio, um par de α -hélices paralelas, uma dupla fita- β antiparalela curta e um *loop* C-terminal (Renetseder *et al.*, 1985; Tomoo *et al.*, 1992; Westerlund *et al.*, 1992, 1997; Perbandt *et al.*, 1997).

Fig. 1.2.2: Enovelamento das PLA₂ ilustrando as características gerais das classes I e II. Os principais elementos de estrutura secundária estão identificados, como as três hélices- α , a asa- β , o *loop* de ligação de Ca^{2+} (presente nas Asp49-PLA₂) e o *loop* C-terminal.

1.2.1 - SÍTIO DE LIGAÇÃO DE CÁLCIO

O íon cálcio (Ca^{2+}) é um cofator para a atividade dessas enzimas. Este geralmente se encontra heptacoordenado, em sua maior parte por resíduos do chamado *loop* de ligação de cálcio (resíduos 25 a 33, segundo numeração de Renetseder *et al.*, 1985), duas moléculas de água e o conservado aminoácido Asp49. A figura 1.2.1.1 ilustra o íon Ca^{2+} e suas respectivas coordenações presentes na fosfolipase A₂ pancreática bovina (Dijkstra *et al.*, 1981).

Fig. 1.2.1.1: Ilustração do íon Ca^{2+} (laranja) e seus ligantes (em um total de sete coordenações), incluindo duas moléculas de água conservadas, para a PLA₂ do pâncreas bovino.

O Asp49 é um resíduo fundamental para essa ligação, pois proporciona uma carga negativa para o equilíbrio eletrostático do íon e fornece dois átomos de oxigênio na heptacoordenação.

Outros cátions divalentes não funcionam como cofatores e são frequentemente inibidores da enzima (Veiheij *et al.*, 1980; Roberts *et al.*, 1977). A posição do íon, ligado ao Asp49 e próximo à His48 tem sido sugerida como fundamental para a ligação da enzima na molécula substrato, presumivelmente ao grupo fosfato do fosfolipídio (Dijkistra *et al.*, 1981; Veiheij *et al.*, 1980).

1.2.2 - SÍTIO ATIVO

O sítio ativo das fosfolipases A₂ consiste em um canal hidrofóbico na superfície da molécula, como mostrado na figura 1.2.2.1, com início no sítio de ligação de cálcio. Essa característica de hidrofobicidade é garantida pela grande quantidade de resíduos com cadeias laterais apolares (alaninas, valinas, leucinas, isoleucinas e fenilalaninas) expostos a contatos dentro dessa cavidade.

Fig. 1.2.2.1: Superfície de van der Waals (em branco), ilustração do sítio ativo (em amarelo) das fosfolipases A₂, próximo ao íon Ca²⁺ (rosa).

Embora muitas diferenças ocorram entre seqüências de aminoácidos das várias PLA₂, três resíduos funcionalmente importantes permanecem absolutamente conservados: His48, Tyr73 e Asp99, estando situados no fundo do sítio ativo. O par de resíduos Asp99 e His48, juntamente com uma molécula de água, formam a chamada tríade catalítica e estão diretamente relacionados com a ação catalítica dessas enzimas, como será discutido posteriormente.

1.2.3 - MECANISMO CATALÍTICO

A base do corrente entendimento do mecanismo catalítico das PLA₂ de baixo peso molecular foi originalmente inferida por Veiheij *et al.* (1980) e posteriormente melhorada por Scott *et al.* (1990), baseada em estruturas cristalinas de complexos com o análogo do estado de transição L-1-*O*-octil-2-heptilfosfonil-*sn*-glicerol-3-fosfoetanolamina [diC₈(2Ph)Pe]. Esse mecanismo ainda é bastante estudado e um grande número de estudos envolvendo modificações estruturais e químicas tem sugerido um mecanismo similar para o revezamento de prótons das enzimas proteolíticas, como serinoproteases, onde a tríade catalítica é formada pelos resíduos His48 e Asp49 e uma molécula de água (Dennis, 1983).

O diC₈(2Ph)Pe forma um complexo estável com a PLA₂ pois possui um segundo grupo fosfato na posição *sn*-2. Por ter geometria tetraédrica e possuir carga negativa, este imita o estado de transição da reação catalisada. Nas estruturas usadas para descrição deste modelo, pode-se observar a presença de dois íons Ca²⁺ ligados a cada um dos monômeros das estruturas, sendo um no sítio convencional e o outro num segundo sítio. Na estrutura cristalina da PLA₂ da serpente *Naja naja atra* nativa, os dois cálcios estão separados por uma distância

de 11,1 Å, sendo que na estrutura em complexo com o análogo, a distância entre estes é de 6,6 Å. De acordo com estes resultados os autores propõe um mecanismo detalhado para a ação destas enzimas, como descrito a seguir.

Os processos de formação, estabilização e colapso do estado de transição estão esquematizados nas figura 1.2.3.1 (a-c), respectivamente.

Na figura 1.2.3.1 (a) é mostrado o início da reação, onde acontece a acomodação da molécula de fosfolipídio dentro do sítio ativo, com o grupo fosfato dessa molécula sendo preso ao íon cálcio, que também coordena com o oxigênio da molécula de ácido graxo na posição *sn*-2, deixando-o em uma posição favorável para o ataque nucleofílico da água orientada pela His48 e parte da tríade catalítica. A ligação do substrato, portanto leva ao deslocamento de duas moléculas de água coordenadas ao íon Ca^{2+} .

Em 1.2.3.1 (b), devido à presença da molécula de água (parte da tríade catalítica), observa-se a presença de uma carga negativa no oxiânion do estado intermediário, que interage com o íon Ca^{2+} . Porém formalmente as cargas negativas do Asp49 e do fosfato *sn*-3 já neutralizam a carga positiva deste íon, mesmo antes da contribuição do oxiânion do intermediário tetraédrico ser considerada. O segundo íon Ca^{2+} é coordenado pelo oxigênio O da carbonila do resíduo Cys29. Pode se ver que o NH da Gly30 interage com o oxiânion do estado intermediário. Dessa maneira, esse íon é descrito como responsável por polarizar a ligação peptídica entre Cys29 e Gly30, assim estabilizando a carga negativa que aparece no oxiânion durante a catálise. Os dois cálcios estariam portanto, relacionados com o processo e mecanismo de catálise através da estabilização do oxiânion do intermediário tetraédrico de maneira direta (no caso do primeiro íon) e indireta (pela polarização de uma ligação peptídica pelo segundo íon).

Assim, feita a hidrólise da ligação éster *sn*-2, os produtos são liberados, com o retorno de outras três moléculas de água, duas fazendo parte da coordenação do primeiro íon cálcio e a outra restaurando a tríade catalítica (figura 1.2.3.1 (c)).

Deve-se ressaltar porém que já foi observado em outros casos a ausência deste segundo cálcio, como na PLA₂ extraída do veneno de abelha (PDBID 1POC, Scott *et al.*, 1990), e em uma estrutura da PLA₂ do pâncreas bovino (PDBID 1BP2, Dijkistra *et al.*, 1981), onde estas são tidas como ativas.

Fig. 1.2.3.1: O mecanismo catalítico das PLA₂ proposto por White e colaboradores (White *et al.*, 1990) baseado no complexo da *N. n. atra* com o inibidor diC₈(2Ph)PE.

1.2.4 - LYS49-FOSFOLIPASES A₂ (Lys49-PLA₂)

Como pode ser esperado, devido ao seu importante papel estrutural o resíduo ácido aspártico na posição 49 (Asp49) é absolutamente conservado em todas as PLA₂ ativas. A substituição desse ácido aspártico por uma lisina dá origem a uma nova classe de moléculas isoladas do veneno de serpentes, as chamadas Lys49-PLA₂ homólogas. Originalmente descritas por Maraganore (Maraganore *et al.*, 1984), essas variantes têm sido descritas como inativas (van den Berg *et al.*, 1989). A perda de atividade tem sido atribuída à ausência do íon Ca²⁺, cujo sítio de ligação está ocupado pelo grupo ε-amino da cadeia lateral da Lys49 (Arni *et al.*, 1996; Ward *et al.*, 1998a, 1998b). Como consequência, o intermediário tetraédrico não pode ser estabilizado durante o ciclo catalítico. Mesmo assim as Lys49-PLA₂ são miotoxinas capazes de danificar membranas causando edema e necrose de músculo.

Entretanto, alguns trabalhos mostram que variantes Lys49 apresentam atividade catalítica em baixos níveis, porém detectáveis nos experimentos realizados (Shimohigashi *et al.*, 1995; Yamaguchi *et al.*, 1997). Estudos de análise sequencial (Ward *et al.*, 1998b) e de difração de raios-X (Holland *et al.*, 1990; Scott *et al.*, 1992; Arni *et al.*, 1995; de Azevedo Jr. *et al.*, 1997; de Azevedo Jr. *et al.*, 1998; Arni *et al.*, 1999; de Azevedo Jr. *et al.*, 1999; da Silva Giotto *et al.*, 1998) mostram que todas as Lys49-PLA₂ homólogas tem conservado todos os aspectos importantes da maquinaria catalítica, incluindo His48, Asp99, Tyr52, Tyr73, a molécula de água catalítica e a rede de ligações de hidrogênio. Recentemente, a determinação da estrutura de uma Fosfolipase Lys49 (chamada Piratoxina-II) isolada do veneno de *Bothrops pirajai* (Lee *et al.*, 2001) revelou a presença de densidade eletrônica não-protéica no canal hidrofóbico onde se liga o

substrato, que foi interpretada como correspondente a uma molécula de ácido graxo. Densidade semelhante foi observada pela primeira vez na estrutura da Lys49-PLA₂ de *Bothrops nummifer* (de Azevedo Jr. *et al.*, 1999). No caso da estrutura da Piratoxina-II, os autores propõem que o ácido graxo ligado ao sítio ativo seja produto da catálise e sugerem, através de observações das interações dos resíduos envolvidos no sítio ativo principalmente o resíduo Gly30, que a baixa atividade das Lys49 seja devido à alta afinidade destas pelo ácido graxo ou a um ciclo catalítico interrompido. A figura 1.2.4.1 ilustra o sítio ativo de Lys49-PLA₂, mostrando as interações do ácido graxo com os resíduos conservados do sítio catalítico (Lee *et al.*, 2001). Destaca-se a Lys122 (conservada em todas as Lys49-PLA₂), que neste caso, de fato, polariza a ligação peptídica entre a Cys29 e a Gly30, segurando assim o ácido graxo dentro do canal hidrofóbico. A afinidade de Lys49-PLA₂ por ácidos graxos também foi demonstrada em experimentos realizados por Pedersen e colaboradores (Pedersen *et al.*, 1995) em estudos de ressonância paramagnética eletrônica usando ácidos graxos com marcadores de spin covalentemente ligados.

Fig. 1.2.4.1: Esquema do sítio ativo das Lys49-PLA₂ (Lee *et al.*, 2001) em complexo com o ácido graxo.

Embora as fosfolipases tenham sido bastante estudadas, alguns pontos ainda não totalmente esclarecidos principalmente em relação às Lys49. Tais questões incluem:

- uma explicação completa da base estrutural da sua diminuída atividade;
- a especificidade da Lys49-PLA₂ em termos de substratos fosfolipídicos e particularmente a natureza do ácido graxo na posição *sn*-2;
- a natureza e afinidade da ligação entre enzima e o ácido graxo observado no canal hidrofóbico do sítio ativo;
- a relevância desta interação para os efeitos tóxicos.

Neste projeto nos propomos estudar a Lys49-PLA₂ isolada de veneno da serpente *Agkistrodon contortrix laticinctus* usando cristalografia de proteínas por difração de raios X e ressonância magnética nuclear em uma tentativa de contribuir para um maior entendimento de algumas destas questões.

1.3 - REFERÊNCIAS

- Arni, R.K. and Ward, R.J. (1996) *Toxicon* **34**, 827-841
- Arni, R.K., Ward, R.J., Gutiérrez, J.M. and Tulinsky, A. (1995) *Acta Cryst* **D51**, 311-317
- Cintra, A.C.O, Marangoni, S. Oliveira, B. and Giglio, J.R. (1993) *J. Protein Chem.* **12**, 57-64
- de Azevedo Jr., W.F., Ward, R.J., Canduri, F., Soares, A., Giglio, J.R. and Arni, R.K. (1998) *Toxicon* **36**, 1395-1406
- de Azevedo Jr., W.F., Ward, R.J., Gutiérrez, J.M. and Arni, R.K. (1999) *Toxicon* **37**, 371-384
- de Azevedo Jr., W.F., Ward, R.J., Lombardi, F.R., Giglio, J.R., Soares, A., Fontes, M.R.M. and Arni, R.K. (1997) *Prot. Pep. Lett.* **4**, 329-334
- da Silva Giotto, M.T., Garratt, R.C., Oliva, G., Mascarenhas, Y.P., Giglio, J.R., Cintra, A.C., de Azevedo, W.F. Jr., Arni, R.K. and Ward, R.J. (1998) *Proteins* **30**, 442-454
- Dennis, E.A. (1984) *The Enzymes* (Boyer, P.D., ed.) 3rd Ed. **16**, 307-353, Academic Press, New York

- Dennis, E.A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 13057-13060
- Dennis, E.A. (1997) *Trends Biochem. Sci.* **22**, 1-2.
- Dijkstra, B.W., Drenth, J. and Kalk, K.H. (1981) *Nature* **289**, 604-606
- Dijkstra, B.W., Kalk, K.H., Hol, W.G., Drenth, J. (1981) *J. Mol. Biol.* **147**, 97
- Gelb, M.H., Jain, M.K., Hanel, A.M. and Berg, O.G., (1995) *Annu. Ver. Biochem.* **64**, 653-688
- Holland, D.R., Clancy, L.L., Muchmore, S.W., Ryde, T.J., Einspahr, H.M., Finzel, B.C., Heinrickson, R.L. and Watenpaugh, K.D. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 17649-17656
- Jain, M.K., Maliwal, B.P., de Haas, G.H. and Slotboom, A.J. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **860**, 448-461
- Lee, W-H., da Silva Giotto, M.T., Marangoni, S., Toyama, M.H., Polikarpov, I. and Garratt, R.C. (2001) *Biochemistry* **40**, 28-36
- Maraganore, J.M., Merutka, G., Cho, W., Werlches, W., Kezdy, F.J. and Heinrickson, R.L. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 13839-13843
- Mukherjee, A.B., Miele, L. and Pattabiraman, N. (1994) *Biochem. Pharmac.* **48**, 1-10
- Pedersen, J.Z., Lomonte, B., Massoud, R., Gubensek, F., Gutierrez, J.M. and Rufini, S. (1995) *Biochemistry* **34**, 4670-4675
- Perbandt, M., Wilson, J.C., Eschenburg, S., Mancheva, I., Aleksiev, B., Genov, N., Willingmann, P., Weber, W., Singh, T.P. and Betzel, C. (1997) *FEBS Lett.* **412** (3), 573-577
- Prescott, S. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 15043
- Renetseder, R., Brunie, S., Dijkstra, B.W., Drenth, J. and Siegler, P.B. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 11627-11634
- Roberts, M.F., Deems, R.A. and Dennis, E.A. (1977) *PNAS* **74**, 1950-1954
- Schevitz, R.W., Bach, N.J., Carlson, D.G., Chirgadze, N.Y., Clawson, D.K., Dillard, R.D., Draheim, S.E., Hartley, L.W., Jones, N.D., Mihelich, E.D., Olkowski, J.L., Snyder, D.W., Sommers, C. and Wery, J-P. (1995) *Nat. Struct. Biol.* **2**, 458-465
- Scott, D.L., Achari, A., Vidal, J.C. and Siegler, P.B. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 22645-22657
- Scott, D.L., Otwinowski, Z., Gelb, M.H., Sigler, P.B. (1990) *Science* **250**, 1563
- Scott, D.L., White, S.P., Browning, J.L., Rosa, J.J., Gelb, M.H. and Sigler, P.B. (1991) *Science* **254**, 1007-1010
- Scott, D.L., White, S.P., Otwinowski, Z., Yuan, W., Gelb, M. H. and Sigler, P.B. (1990) *Science* **250**, 1541-1546
- Shimohigashi, Y., Tani, A., Matsumoto, H., Nakashima, K., Yamaguchi, Y., Oda, N., Takano, Y., Kamiya, H., Kishino, J., Arita, H. and Ohno, M. (1995) *J. Biochem.* **118**, 1037-1044
- Six, D.A. and Dennis, E.A. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1488**, 1-19

- Thunnissen, M.M.G.M., AB, E., Kalk, K.H., Drenth, J., Dijkstra, B.W., Kuipers, P., Dijkman, R., de Haas, G.H. and Verheij, H.M. (1990) *Nature* **689**, 689-691
- Tomoo, K., Ohishi, H., Doi, M., Ishida, T., Inoue, M., Ikeda, K., Hata, Y. and Samejima, Y. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**, 137-143
- van den Bergh, L.L.M., Slotboom, A.J., Verheij, H.M. and de Haas, G.H. (1989) *J. Cell. Biochem.* **39**, 379-390
- Verheij, H.M., Volwerk, J.J., Jasen, E.H.J.M., Puyk, W.C., Dijkstra, B.W., Drenth, J. and Haas, G.H. (1980) *Biochemistry* **19**, 743-750
- Wang, X., Yang, J., Gui, L., Lin, Z., Chen, Y. and Zhou, Y. (1996) *J. Mol. Biol.* **255**, 669-676
- Ward, R.J., de Azevedo Jr., W.F., and Arni, R.K. (1998a) *Toxicon* **36**, 1623-1633
- Ward, R.J., Rodrigues Alves, A., Ruggiero Neto, J. and Arni, R.K. (1998b) *Protein Eng.* **11**, 285-294
- Westerlund, B., Nordlund, P., Uhlin, U., Eaker, D. and Eaklund, H. (1992) *FEBS Lett.* **301(2)**, 159-164
- Wittcoff, H. (1951) *The Phosphatides*. Van Nostrand-Reinhold, Princeton, New Jersey
- Yamaguchi, Y., Shimohigashi, Y., Chiwata, T., Tani, A., Chijiwa, T., Lomonte, B. and Ohno, M. (1997) *Biochem. Mol. Biol. Int.* **43**, 19-26

- CAPÍTULO 2 -

CRISTALIZAÇÃO DA MIOTOXINA ACL

A cristalização de macromoléculas biológicas é considerada uma técnica de tentativa e erro por se tratar de um processo multiparamétrico. Parâmetros de caráter físico (temperatura, pressão, superfície da molécula, tempo, etc.), químico (pH, agente precipitante, força iônica, grau de supersaturação, etc.) e biológico (pureza da amostra, estado de agregação, ponto isoeletrico, estabilidade, etc.) interferem diretamente na formação de um cristal, de maneira que os diversos métodos existentes tentam variar este espaço multiparamétrico para examinar os efeitos de combinações dessas variáveis. Esses métodos são geralmente aplicáveis à maioria das proteínas, DNAs e RNAs, complexos multimoleculares e vírus existentes.

Cristais de macromoléculas, em especial proteínas, possuem características únicas, quando comparados a outros tipos de cristais, como por exemplo, de pequenas moléculas. São compostos em média, por 50% de solvente, com esse conteúdo variando de 25 a 90%, dependendo da molécula (Matthews, 1985), com a proteína ocupando o volume restante. Essa distribuição faz com que em todo o cristal existam espaços intersticiais, através dos quais solventes e pequenas moléculas podem livremente se difundir. Isso faz com que, geralmente, existam

poucos e fracos contatos de rede, que são os principais responsáveis pela integridade do cristal.

Devido ao fato de a grande maioria das proteínas serem muito instáveis e rapidamente perderem sua estrutura nativa, poucas condições favorecem o crescimento de um cristal protéico, causando nenhuma ou pequenas perturbações às suas propriedades moleculares. Assim, cristais de proteínas crescem geralmente em condições toleráveis de temperatura, força iônica e com pequenas faixas de variação pH, próximas ao pH fisiológico. E a permanência do cristal na solução de cristalização nessas condições (chamada líquido-mãe) é imprescindível para a estabilidade do empacotamento (exceto na criocristalografia²).

O preparo de monocristais de proteínas de boa qualidade para difração de raios X requer uma quantidade considerável de proteína pura. Assim, seja a proteína de interesse extraída diretamente do organismo fonte, ou produzida por expressão em sistema heterólogo, a mesma deve passar por um processo de purificação, visando uma amostra homogênea.

Neste capítulo serão descritos os métodos de extração, purificação e cristalização da Miotoxina ACL, a partir do organismo fonte, o veneno da serpente *Agkistrodon contortrix laticinctus*.

Como citado acima, em todo o processo para se obter um cristal protéico, um grande número de parâmetros precisa ser avaliado para se alcançar os graus de pureza e solubilidade necessários para a cristalização. Uma descrição completa das técnicas, bem como os parâmetros envolvidos na cristalização de macromoléculas, encontra-se em Drenth, J. (1999) e Ducruix & Giegé (1999).

² *criocristalografia* (Hass & Rossmann, 1970): técnica de congelamento do cristal para coleta a temperaturas criogênicas, que minimiza os efeitos da radiação sobre este, promove estabilidade mecânica e conseqüentemente uma melhora na resolução dos dados de difração de raios X, através da adição de um agente crioprotetor.

2.1 - EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO

Este projeto foi realizado em colaboração com a Prof. Dra. Charlotte Ownby do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade do Estado Oklahoma, nos Estados Unidos, a qual forneceu a enzima Miotoxina ACL purificada de acordo com o protocolo desenvolvido em seu laboratório (Johnson *et al.*, 1993).

A Lys49-PLA₂ estudada neste trabalho foi isolada a partir do veneno da serpente *Agkistrodon contortrix laticinctus* (figura 2.1.1(a)), comumente conhecida como ‘*Broad-banded Copperhead*’, habitando apenas a América do Norte, mais especificamente na região centro-oeste do estado do Texas, centro-norte de Oklahoma e sul do estado de Kansas (figura 2.1.1(b)), sendo geralmente encontrada em regiões úmidas, bastante arborizadas e rochosas (Foster, 1994).

Fig. 2.1.1: (a) Um exemplar da serpente *A.c. laticinctus*, que geralmente mede cerca de 70 cm e pesa por volta de 300 gramas. Pela figura nota-se o sentido de seu nome comum *Broad-banded Copperhead*, devido à sua cor em tom cobreado e largas faixas espalhadas ao longo do corpo (© 2000 John White). (b) Localização geográfica da serpente, encontrada apenas na América do Norte, na região destacada em vermelho no mapa, abrangendo os estados de Oklahoma, Texas e Kansas, habitando áreas rochosas, úmidas, geralmente terras baixas e silvestres (Foster, 1994).

A enzima foi inicialmente extraída do veneno bruto e purificada até a homogeneidade. O procedimento adotado foi uma versão em larga escala do

método desenvolvido por Johnson e Ownby em 1993 (Johnson *et al.*, 1993). A purificação da enzima envolve duas etapas de cromatografia, sendo a primeira uma coluna de troca aniônica Whatman DE52, seguida por uma troca catiônica em uma coluna Whatman CM52. A pureza da enzima foi verificada através de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) usando uma unidade PhastSystem Eletrophoresis (Pharmacia Biotech.). A Miotoxina ACL purificada foi então liofilizada e armazenada a -20 °C. A amostra sob estas condições foi enviada ao nosso laboratório, para posteriores ensaios de cristalização.

2.2 - CRISTALIZAÇÃO

A proteína liofilizada foi ressuspensa em água na concentração de 10 mg/ml. Testes de cristalização foram iniciados utilizando-se o método de difusão de vapor com gotas suspensas conhecido como *hanging drop* (Hampel *et al.*, 1968). A gota contendo a solução da proteína e uma quantidade igual da solução precipitante foi depositada sobre uma laminula siliconizada e pendurada sobre a solução do reservatório (poço), como esquematizado na figura 2.2.1. O conjunto foi então selado com graxa de vácuo e o arranjo foi mantido a uma temperatura constante de 18°C. O sistema fechado atingiu o equilíbrio pela difusão de água da gota para o reservatório. O estado de supersaturação é atingido, podendo levar à cristalização da macromolécula. O aparecimento e o crescimento dos cristais foram monitorados através de um microscópio de polarização.

Fig. 2.2.1: Esquema do método de difusão de vapor em gotas suspensas, usados na obtenção de cristais da Miotoxina ACL. A evolução das concentrações da macromolécula, $[M]$, e do agente precipitante, $[AP]$ são indicadas (concentrações iniciais e finais na gota são respectivamente indicadas pelo subíndice i e f , e no reservatório pelo subíndice res), onde k é o fator de diluição dado pela razão das concentrações iniciais do agente precipitante na gota e no reservatório. Geralmente, a concentração inicial do precipitante na gota é a metade da concentração no reservatório ($k = 2$), como utilizado neste projeto.

Foram realizadas triagens iniciais de cristalização, utilizando-se o *kit* de matriz esparsa com 50 soluções do Fatorial I (Hampton Research; Jancarik *et al.*, 1991), no qual uma grande variação de combinações entre soluções tampão, agentes precipitantes e sais são testados. A amostra de proteína foi concentrada a 10 mg/ml, e cristais com qualidade para posteriores coletas de dados por difração raios X foram obtidas em duas condições:

- condição número 15, composta por 0,1 M de ácido cacodílico, pH 6,5, 0,2 M de sulfato de amônio e 30% PEG 8000 (~ 0,5 a 0,8 mm, figura 2.2.2);
- condição número 4, composta de 0,1 M de TRIS HCl, pH 8,5, 2,0 M de sulfato de amônio (~ 0,8 mm × 0,8 mm × 0,8 mm, fotografia não disponível).

Fig. 2.2.2: Cristais da Miotoxina ACL (~ 0,5 a 0,8 mm) a 10 mg/ml, crescidos na condição 15 do fatorial I Hampton (0,1 M de ácido cacodílico, pH 6,5 0,2 M de sulfato de amônio e 30% PEG 8000) a 18 °C.

Cristais de boa qualidade para coleta de dados de difração de raios X também foram obtidos na condição previamente determinada por Treharne e colaboradores (Treharne *et al.*, 1997), cujo trabalho descreve a obtenção dos primeiros cristais dessa enzima. Condição essa constituída por 0,1 M Tris HCl, pH 8,5 com 2,0 M de sulfato de amônio como agente precipitante (equivalente à condição número 4 do Fatorial I descrita acima) e proteína a uma concentração de 16 mg/ml. As respectivas fotos estão mostradas na figura 2.2.3

Fig. 2.2.3: Cristais da miotoxina ACL, crescidos na condição determinada por Treharne e colaboradores (0,1 M de TRIS HCl, pH 8,5 2,0 M de sulfato de amônio e concentração de proteína a 16 mg/ml) a 18 °C. Cristais com dimensões máximas de 0,4 mm.

A fim de facilitar a descrição e o entendimento do processo de coleta de dados para cada um dos cristais das três diferentes condições descritas acima, estes serão divididos da seguinte maneira:

- *primeira forma cristalina* ou *forma I*: cristais crescidos na condição número 15 do Fatorial 1 Hampton (0,1 M de ácido cacodílico, pH 6,5, 0,2 M de sulfato de amônio e 30% PEG 8000, proteína a 10 mg/ml);

- *segunda forma cristalina* ou *forma II*: cristais crescidos na condição previamente determinada por Treharne e colaboradores (Treharne *et al.*, 1997) (0,1 M de TRIS HCl, pH 8,5 e 2,0 M de sulfato de amônio proteína a 16 mg/ml);

- *terceira forma cristalina* ou *forma III*: cristal crescido na condição número 4 do Fatorial I (0,1 M de TRIS HCl, pH 8,5 e 2,0 M de sulfato), mas com amostra de proteína concentrada a 10 mg/ml.

Apesar de as condições de cristalização serem as mesmas para as chamadas formas II e III, e as proteínas serem originária do mesmo lote de purificação, após a resolução e refinamento das estruturas, estas apresentaram conformações bastante diferentes para regiões consideradas funcionalmente importantes, como será mostrado em capítulos posteriores, o que justifica o fato da distinção entre as nomenclaturas destas.

2.3 - REFERÊNCIAS

- Drenth, J. (1999) *Principles of X-ray Crystallography*, 2nd ed. Heidelberg: Springer.
- Ducruix, A. & Giegé, R. (1999). Editors. *Crystallization of proteins and nucleic acids: a practical approach*, 2nd ed. Oxford: IRL press
- Foster, S. and Caras, A.R. (1994) *A Field Guide to Venomous Animals and Poisonous Plants*, Houghton Mifflin Company, Boston, NY
- Hampel, A., Labananskas, M., Connors, P.G., Kirkegard, L., Raj Bhandary, U.L., Sigler, P.B. and Bock, R.M. (1968) *Science* **162**, 1384-1386
- Haas, D.J. and Rossmann, M. (1970) *Acta Crystallographica* **B26**, 998-1004

- Jancarik, J. and Kim, S.H. (1991) *J.Appl. Cryst.* **24**, 409-411
- Johnson, E.K. and Ownby, C.L. (1993) *Toxicon* **31**, 243-255
- Matthews, B.W. (1985) *Methods Enzymol.* **114**, 176-187
- Treharne, A.C., White, S.P., Ownby, C.L., Selistre-de-Araújo, H.S. and Foundling, S.I. (1997) *Toxicon* **35**, 613-615

COLETA E PROCESSAMENTO DOS DADOS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X

A coleta de dados de difração de raios X é a parte central na análise da estrutura cristalina. O problema experimental que envolve a determinação de uma estrutura molecular por difração de raios X é a obtenção dos fatores de estrutura ($F(hkl)$, Apêndice B), das ondas difratadas pelo cristal, que carregam informações sobre a distribuição eletrônica do material espalhador ($\rho(xyz)$, Apêndice B). Esses fatores de estrutura podem ser descritos em termos de amplitudes, $|F(hkl)|$, e de fases, $\alpha(hkl)$ (Apêndice B). Contudo, em um experimento de difração em cristalografia, independente dos tipos de detectores de raios X atualmente disponíveis, é possível se medir apenas a amplitude da onda resultante difratada, sendo a fase perdida. Assim, ao invés de se obter uma imagem direta da estrutura da proteína em um cristal, é necessário medir a intensidade ($I \propto |F(hkl)|^2$, Apêndice B), a direção da onda difratada, estimar as fases (métodos descritos no próximo capítulo) e através de métodos computacionais calcular a estrutura que deu origem ao padrão de difração.

Para estruturas de pequenas moléculas orgânicas e inorgânicas, este problema pode ser resolvido diretamente, obtendo-se um modelo atômico

anisotrópico completo, que pode ser obtido a partir das fortes intensidades de reflexões a altíssimas resoluções ($\sim 0,5 \text{ \AA}$), ou através do cálculo do mapa de Patterson ($P(uvw)$, Apêndice B).

Em se tratando de coleta de dados para cristais de macromoléculas os problemas se tornam maiores. Primeiramente, o maior tamanho da cela unitária acarreta um grande aumento no número de reflexões e as intensidades médias resultantes são mais baixas ($I \propto V_{\text{cristal}}/V_{\text{cela}}^2$, Apêndice B). Por exemplo, para um cristal de proteína com celas unitárias de volume 1000 vezes maior que o de uma pequena molécula, a intensidade média da onda difratada é aproximadamente $1/(1000)^2$ vezes menor. Além disso, os cristais geralmente contêm proporções consideráveis de solvente aquoso, o que faz com que as posições relativas das moléculas sejam um pouco diferentes, de uma cela unitária para outra, reduzindo principalmente intensidades a altas resoluções.

Tais problemas geram sérias implicações em todos os passos desde a determinação até o refinamento da estrutura. Na grande maioria das vezes as soluções para o problema das fases não são obtidas por métodos diretos e os modelos refinados requerem a imposição de vínculos estereoquímicos para que se mantenha uma geometria aceitável.

Avanços recentes, tais como o uso de radiação síncrotron, temperaturas criogênicas (Haas, 1968; Haas & Rossmann, 1970; Teng, 1990) e detectores bidimensionais mais eficientes têm tornado a coleta de dados tecnicamente mais fácil.

Neste capítulo serão descritos os procedimentos adotados e os resultados obtidos para coletas de dados das três diferentes formas cristalinas obtidas para a Miotoxina ACL, oriundas das três diferentes condições descritas no capítulo 2.

Várias revisões descrevendo aspectos teóricos e práticos desse processo têm sido publicadas recentemente, onde toda a fundamentação pode ser encontrada (Carter & Sweet, 1997; Turkenburg *et al.*, 1999; Dauter, 1999; Drenth, 1999).

3.1 - PREPARAÇÃO DOS CRISTAIS E COLETA DE DADOS

Os conjuntos de dados de difração de raios X das três formas cristalinas foram coletados a temperaturas criogênicas (100 K) em fluxo de nitrogênio, com adição de agentes crioprotetores a diferentes concentrações ao líquido-mãe, como descrito em cada seção.

3.1.1 - PRIMEIRA FORMA CRISTALINA (FORMA I)

Cristais da Miotoxina ACL na forma I, crioprotetidos com adição de glicerol 20% (v/v) ao líquido-mãe foram testados na linha PCr do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS/Campinas, Polikarpov *et al.*, 1997). Um conjunto de dados foi obtido através do método de rotação, a partir de um cristal de dimensões aproximadas de 0,6 mm × 0,6 mm × 0,6 mm, usando comprimento de onda a 1,544 Å. Um total de 82 imagens ($\Delta\phi/\text{foto} = 1^\circ$) foram mapeadas em uma placa de imagem MAR345 (MAR RESEARCH). O tempo de exposição de cada foto foi de 150 segundos.

Os dados foram coletados a uma resolução máxima (na borda da placa) de 2,22 Å. Um exemplo dessas imagens, coletadas para o referido cristal encontra-se na figura 3.1.1.1.

Fig. 3.1.1.1: Padrão de difração característico da Miotoxina ACL para os cristais crescidos na condição número 15 do Fatorial I, crioprottegidos com 20 % de glicerol (figura 2.2.2). Imagem de oscilação de 1° com tempo de exposição de 150 segundos, coletada na linha PCr do LNLS.

A autoindexação da primeira imagem foi realizada pelo programa MOSFLM (Leslie *et al.*, 1992), onde valores aproximados dos parâmetros de cela (a , b , c , α , β e γ) e a orientação do cristal foram encontrados.

A partir da distribuição de vetores diferença gerados a partir de pontos recíprocos extraídos do padrão de difração, o programa apresenta os parâmetros de cela calculados para cada uma das 14 possíveis redes de Bravais. Para cada um desses retículos, são atribuídas penalidades correspondentes à distorção da cela triclínica, para que esta se transforme nas redes de maior simetria. A escolha do sistema cristalino correto é então realizada em função dessa penalidade, de maneira a se tomar o sistema de maior simetria ainda com penalidade baixa.

De acordo com estes critérios, a rede da Bravais escolhida foi a tetragonal primitiva. Este resultado se encontra ilustrado na figura 3.1.1.2, com destaque para a coluna de penalidades e a linha escolhida. É importante notar que as redes

primitivas monoclínica e triclínica sempre apresentam valores muito baixos, podendo ser falsos positivos.

A integração das 82 imagens de difração e o refinamento dos parâmetros foram conduzidos ainda com o MOSFLM, até a resolução máxima de 2,3 Å com $\langle I/\sigma(I) \rangle = 1,7$ e $R_{\text{symm}} = 38,2$ % na faixa mais externa de resolução (Dauter, 1997; Dauter 1999).

Imposta a simetria tetragonal primitiva na predição das reflexões, uma estimativa do valor da mosaicidade do cristal foi feita, de maneira a não se deixar nenhuma reflexão fora das predições. O valor estimado da mosaicidade foi de 0,6°.

O escalonamento e a promediação dos dados foi feita pelo programa SCALA (Evans, 1997), que inclui o programa TRUNCATE (French *et al.*, 1978), ambos parte do pacote de programas cristalográficos CCP4 (Collaborative Computational Project Number 4, 1994), gerando um arquivo final que contém os índices de Miller (hkl), os módulos dos fatores de estrutura, $|F(hkl)|$, e suas respectivas incertezas ($\sigma(F)$) para cada reflexão, calculadas a partir das intensidades reduzidas.

List of possible Laue groups, sorted on penalty index.
The lower the PENALTY, the better
Only solutions with PENALTY less than 200 are listed, a complete list is given in the terminal window

N°	PENALTY	LATT	a	b	c	alpha	beta	gamma	Possible spacegroups
16	163	mC	50.01	170.61	81.86	89.8	90.1	73.0	C2
15	162	oC	50.01	170.61	81.86	89.8	89.9	107.0	C222,C222 ₁
14	162	mC	50.01	171.10	81.57	89.7	90.0	73.1	C2
13	161	oC	50.01	171.10	81.57	89.7	90.0	106.9	C222,C222 ₁
12	160	mC	170.61	50.01	81.86	89.9	90.2	73.0	C2
11	159	mC	171.10	50.01	81.57	90.0	90.3	73.1	C2
10	6	tP	81.57	81.86	50.01	90.1	90.0	90.3	P4,P4₁,P4₂,P4₃,P422,P42₁2,P4₁22,P4₁2₁2,P4222,P4₂2₁2,P4₃22,P4₃2₁2
9	4	mC	115.29	115.84	50.01	90.1	90.1	89.8	C2
8	4	oC	115.29	115.84	50.01	90.1	90.1	89.8	C222,C222 ₁
7	3	mP	50.01	81.86	81.57	90.3	90.0	90.1	P2,P2 ₁
6	3	oP	50.01	81.57	81.86	90.3	90.1	90.0	P222,P222 ₁ ,P2 ₁ 2 ₁ 2,P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
5	3	mC	115.84	115.29	50.01	89.9	90.1	90.2	C2
4	2	mP	50.01	81.57	81.86	90.3	90.1	90.0	P2,P2 ₁
3	1	mP	81.57	50.01	81.86	90.1	90.3	90.0	P2,P2 ₁
2	0	aP	50.01	81.57	81.86	89.7	89.9	90.0	P1
1	0	aP	50.01	81.57	81.86	90.3	90.1	90.0	P1

Fig. 3.1.1.2: Autoindexação com o programa MOSFLM. A partir da distribuição de vetores diferença gerados a partir de pontos recíprocos extraídos do padrão de difração, o programa apresenta os parâmetros de cela calculados para cada uma das 14 possíveis redes de Bravais, com penalidades menores que 200. Para cada um desses retículos, são atribuídas penalidades correspondentes à distorção da cela triclinica, para que esta se transforme nas redes de maior simetria. A escolha do sistema cristalino correto é então realizada em função dessa penalidade, de maneira a se tomar o sistema de maior simetria com menor penalidade. Destaque para as comparação entre as penalidades da linha escolhida, referente à rede tetragonal primitiva (solução 10, penalidade 6) e para a penalidade para a próxima solução (número 11, penalidade 159).

Uma vez definida a rede de Bravais satisfatória, é preciso determinar o grupo espacial correto. As possibilidades de grupo espacial para uma rede tetragonal primitiva são: $P4$, $P4_1$, $P4_2$, $P4_3$, $P422$, $P42_12$, $P4_122$, $P4_12_12$, $P4_222$, $P4_22_12$, $P4_322$ e $P4_32_12$. A escolha do grupo correto entre todos os possíveis grupos espaciais foi feita através da análise das extinções sistemáticas, catalogadas na *International Tables for Crystallography* Vol. A (Kluwer Academic, 1996).

Foram observadas apenas as reflexões índices $l = 4n$ (para reflexões do tipo $00l$) e $k = 2n$ (para reflexões do tipo $0k0$). Dessa maneira, as duas possibilidades finais foram $P4_12_12$ e $P4_32_12$, não sendo possível a distinção entre as duas apenas através dessa análise, pois as extinções esperadas são as mesmas para ambos os grupos, que são caracterizados como enantiomorfos.

Em casos onde a determinação da estrutura seja viável por substituição molecular, o método mais seguro para se escolher o grupo correto consiste na busca e análise da solução da função de translação e análise do coeficiente de correlação na substituição molecular, método utilizado para obtenção das fases iniciais. Essa questão será discutida no próximo capítulo, mas pode se adiantar aqui que o grupo espacial correto para esta forma cristalina é $P4_12_12$.

Na figura 3.1.1.3 encontram-se algumas estatísticas divididas por faixa de resolução, em forma gráfica, geradas pelo SCALA (e TRUNCATE), para os dados de difração reduzidos.

Fig. 3.1.1.3: Principais estatísticas, divididas por faixa de resolução, dos dados de difração reduzidos para a primeira forma cristalina da Miotoxina ACL, calculados pelo programa SCALA. (a) Completeness, (b) R_{symm} e R_{meas} e (c) $\langle I/\sigma(I) \rangle$ por faixa de resolução e (d) Wilson Plot experimental (preto) e a respectiva reta de regressão linear (vermelho) para dados com resolução superior a 4,0 Å.

Os parâmetros, estatísticas e valores finais do processamento dos dados coletados para a primeira forma cristalina da Miotoxina ACL encontram-se na tabela 3.1.1.1.

Tabela 3.1.1. 1: Parâmetros e valores finais do processamento dos dados coletados para a primeira forma cristalina da Miotoxina ACL.

PARÂMETROS	PRIMEIRA FORMA CRISTALINA
Local da coleta	LNLS
Tipo de radiação	síncrotron ($\lambda = 1,544 \text{ \AA}$)
Detector	placa de imagem MAR345
Grupo espacial	$P4_12_12$
Parâmetros da cela unitária	$a = b = 81,89 \text{ \AA}$, $c = 49,9 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90,0^\circ$
Mosaicidade	$0,6^\circ$
Faixa de resolução (camada externa)	$57,3 - 2,3 \text{ \AA}$ ($2,41 - 2,3$)
Tempo total de coleta	$\sim 6 \text{ h}$
Solução crioprotetora	líquido-mãe + 20% (v/v) glicerol
Tempo de banho	$\sim 20 \text{ s}$
Total de imagens ($\Delta\phi = 1^\circ$)	82
Reflexões totais	101833
Reflexões únicas	7960
Redundância (camada externa)	6,2 (6,2)
R_{sym}^a total (camada externa)	11,8 % (38,2 %)
R_{meas}^b total (camada externa)	12,9 % (41,9 %)
Completeza total (camada externa)	98,1 % (99,7 %)
$\langle I/\sigma(I) \rangle^c$ total (camada externa)	3,5 (1,7)

$$^a R_{\text{sym}}(F) = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |F_i(hkl) - \overline{F(hkl)}|}{\sum_{hkl} \sum_i F_i(hkl)} : \text{discrepância entre os fatores de estrutura simetricamente relacionados}$$

$$^b R_{\text{meas}}(F) = \frac{\sum_{hkl} \sum_i \sqrt{\frac{N}{N-1}} |F_i(hkl) - \overline{F(hkl)}|}{\sum_{hkl} \sum_i F_i(hkl)} : \text{discrepância corrigida pela multiplicidade do conjunto}$$

$$^c \langle I/\sigma(I) \rangle : \text{intensidade média dividido pelo erro médio associado a cada medida}$$

O número de moléculas presentes na unidade assimétrica foi estimado utilizando-se o programa Matthews_coeff (Collaborative Computational Project Number 4, 1994), que faz uso da metodologia proposta por Matthews (Matthews, 1968). Considerando-se que a massa molecular do monômero da Miotoxina ACL seja 15 KDa, estima-se que há apenas uma molécula na unidade assimétrica, com volume de Matthews equivalente a $3,0 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ e conteúdo de solvente no cristal de 58,5 %.

Com esse resultado, o fator de temperatura (B) do cristal foi encontrado por regressão linear no Wilson Plot (figura 3.1.1.3d), utilizando-se apenas dados de resolução melhores que $4,0 \text{ \AA}$ (Drenth, 1999), obtendo-se $B = 54,9 \text{ \AA}^2$.

3.1.2 - SEGUNDA FORMA CRISTALINA (FORMA II)

Também na linha PCr do LNLS, foi realizada a coleta de um conjunto de dados de difração de raios X para os cristais da forma II (figura 2.2.3). O cristal de melhor qualidade ($\sim 0,4 \text{ mm} \times 0,4 \text{ mm} \times 0,4 \text{ mm}$) foi crioprotégido com a adição de 20% (v/v) de glicerol ao líquido-mãe.

Esse conjunto foi coletado a um comprimento de onda de $1.545 \text{ \AA}$, também na placa de imagem MAR345, até $1,7 \text{ \AA}$ de resolução na borda da placa. Foram gravadas 50 imagens de oscilação ($\Delta\phi/\text{foto} = 1^\circ$), com tempo de exposição 60 segundos por foto.

A caracterização prévia de um cristal da Miotoxina ACL nessas condições havia sido feita no artigo de cristalização de Treharne e colaboradores (Treharne *et al.*, 1997), identificando-se a simetria tetragonal primitiva, o que veio a ser confirmado através da autoindexação do novo conjunto pelo MOSFLM, e como esperado, parâmetros de rede quase idênticos. O valor da mosaicidade estimado foi de $0,5^\circ$.

O processo de integração e redução dos dados foi conduzido da mesma maneira que para a forma I. O grupo espacial foi assumido como sendo $P4_12_12$, o que veio a ser confirmado com as soluções das funções de rotação e translação encontradas na substituição molecular, quando comparadas com as soluções para o grupo $P4_32_12$, (resultados descritos no próximo capítulo).

Na figura 3.1.1.4 encontram-se algumas estatísticas divididas por faixa de resolução, geradas pelo SCALA, para os dados de difração reduzidos da segunda forma cristalina.

Fig. 3.1.2.1: Principais estatísticas, divididas por faixa de resolução, dos dados de difração reduzidos para a segunda forma cristalina da Miotoxina ACL, calculados pelo programa SCALA. (a) Completudeza, (b) R_{symm} e R_{meas} e (c) $\langle I/\sigma(I) \rangle$ por faixa de resolução e (d) Wilson Plot experimental (preto) e a respectiva reta de regressão linear (vermelho) para dados com resolução superior a 4,0 Å.

A determinação do conteúdo da unidade assimétrica, através do programa Matthews_coeff, indicou a presença de um monômero com volume de Matthews de 2,5 Å³/Da e 49,1 % de conteúdo de solvente no cristal.

O valor encontrado para o fator de temperatura do cristal, por regressão linear, no Wilson Plot foi $B = 28,6 \text{ \AA}^2$ (figura 3.1.1.4d), significativamente menor do que encontrado para a forma I. A tabela 3.1.1.2 resume as principais

estatísticas e valores finais do processamento dos dados para a segunda forma cristalina da Miotoxina ACL.

Tabela 3.1.2.1: Parâmetros e valores finais do processamento dos dados coletados para a segunda forma cristalina da Miotoxina ACL.

PARÂMETROS	SEGUNDA FORMA CRISTALINA
Local da coleta	LNLS
Tipo de radiação	síncrotron ($\lambda = 1,545 \text{ \AA}$)
Detector	placa de imagem MAR345
Grupo espacial	$P4_12_12$
Parâmetros da cela unitária	$a = b = 70,50 \text{ \AA}$, $c = 57,14 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90,0^\circ$
Mosaicidade	$0,5^\circ$
Faixa de resolução (camada externa)	$50,0 - 1,8 \text{ \AA}$ ($1,89 - 1,8$)
Tempo total de coleta	$\sim 2 \text{ h}$
Solução crioprotetora	líquido-mãe + 20% (v/v) glicerol
Tempo de banho	$\sim 20 \text{ s}$
Total de imagens ($\Delta\phi = 1^\circ$)	50
Reflexões totais	118620
Reflexões únicas	13872
Redundância (camada externa)	3,9 (3,7)
R_{sym} total (camada externa)	5,9 % (36,1 %)
R_{meas} total (camada externa)	6,8 % (42,0 %)
Completeza total (camada externa)	97,5 % (99,6 %)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$ total (camada externa)	8,3 (2,0)

3.1.3 - TERCEIRA FORMA CRISTALINA (FORMA III)

A coleta de dados de difração de raios X para o único cristal da forma III foi realizada no Laboratório de Cristalografia de Proteínas do Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural - IFSC/USP, utilizando-se um gerador do tipo ânodo rotatório RIGAKU ultraX 18 com sistema de aquisição MAR345 dtb (placa de imagem). Bons dados foram encontrados até uma resolução máxima de $1,61 \text{ \AA}$, a um comprimento de onda de $1,5418 \text{ \AA}$ (Cu- K_α).

Devido à ótima qualidade da difração observada para este cristal e a disponibilidade de tempo para coleta, os dados foram medidos a uma alta

redundância com o objetivo de se reduzir os erros experimentais e melhorar as estatísticas do processamento (Dauter *et al.*, 2001).

A autoindexação, dessa vez com o programa DENZO (parte do pacote HKL 1.96.1, Otwinowski & Minor, 1997), acusou novamente a presença de simetria tetragonal, com índice de distorção do tensor métrico de 0,62 %, com grupo espacial $P4_12_12$ e parâmetros de rede quase idênticos ao da forma II (tabela 3.1.1.3). Por essa razão, foram coletadas 359 imagens, com $\Delta\varphi = 1^\circ$ e tempo de exposição de 180 segundos por foto.

A indexação, com mosaicidade do cristal estimada em $0,45^\circ$, foi conduzida também com o DENZO e a redução dos dados, agora separando os pares de Friedel ($|F(hkl)|$ e $|F(\overline{h}\overline{k}\overline{l})|$), foi realizada com o programa SCALEPACK (também parte do pacote HKL 1.96.1) a uma resolução máxima de 1,61 Å, com $\langle I/\sigma(I) \rangle = 8,1$ e $R_{\text{symm}} = 31,4$ % na faixa mais externa de resolução. As intensidades foram transformadas em fatores de estruturas utilizando-se o programa TRUNCATE.

A imposição acima foi feita para se verificar a presença ou não de sinal anômalo pelos átomos de enxofre presentes na sequência prevista da estrutura (Apêndice A, Selistre-de-Araújo *et al.*, 1996), através da violação da Lei de Friedel ($|F(hkl)| \neq |F(\overline{h}\overline{k}\overline{l})|$).

A alta redundância dos dados se mostrou o fator determinante na quantificação da diferença anômala e importância deste sinal será discutida no próximo capítulo, pois o mesmo pode ser aplicado na obtenção das fases iniciais e resolução de uma estrutura, sem o uso de estruturas com enovelamentos supostamente similares.

Uma consequência direta do efeito anômalo é o surgimento de um fator de espalhamento atômico complexo para o átomo em questão. Este passa a ser então ser escrito como $f = f^0(\theta) + f'(\lambda) + if''(\lambda)$. Os valores de f' e f'' , para o comprimento de onda em questão, foram calculados pelo programa CROSSEC (Cromer, 1983) e são 0,317 e 0,557 elétrons, respectivamente.

A contribuição teórica do sinal anômalo (Hendrickson & Ogata, 1997) espalhado pelos 16 átomos de enxofre (14 cisteínas e 2 metioninas), num total de 121 aminoácidos na unidade assimétrica foi estimada por volta de 1,54 %. A precisão na medida do sinal anômalo dos átomos de enxofre foi controlada acompanhando a variação da quantidade $(|\Delta F_{\text{anom}}|/F)$ e da qualidade $(|\Delta F_{\text{anom}}|/\sigma\Delta F_{\text{anom}})$ em função da resolução dos dados, como mostrado na figura 3.1.1.5.

Fig. 3.1.3.1: Análise da quantidade $(|\Delta F_{\text{anom}}|/F)$ e da qualidade $(|\Delta F_{\text{anom}}|/\sigma\Delta F_{\text{anom}})$ do sinal anômalo originado dos átomo de enxofre, medidos um comprimento de onda de 1,5418 Å, em função da resolução dos dados.

A análise do conteúdo de solvente na unidade assimétrica acusou a presença de apenas um monômero na unidade assimétrica com volume de

Matthews de $2,5 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ e 49,1 % de conteúdo de solvente no cristal. Com esses dados, o valor encontrado para o fator de temperatura (B) do cristal, por regressão linear, no Wilson Plot foi $B = 24,4 \text{ \AA}^2$ (figura 3.1.1.6d).

Na figura 3.1.1.6 encontram-se algumas estatísticas e valores finais do processamento dos dados, levando em consideração o espalhamento anômalo dos átomos de enxofre na estrutura, para a terceira forma cristalina da Miotoxina ACL.

Fig. 3.1.3.2: Principais estatísticas, divididas por faixa de resolução, dos dados de difração reduzidos, separando os pares de Friedel, para a terceira forma cristalina da Miotoxina ACL, calculados pelo programa SCALEPACK. (a) Completeza anômala, (b) R_{merge} e (c) $\langle I/\sigma(I) \rangle$ por faixa de resolução e (d) Wilson Plot experimental (preto) e a respectiva reta de regressão linear (vermelho) para dados com resolução superior a 4,0 Å.

As principais estatísticas e valores finais do processamento dos dados, levando em consideração o espalhamento anômalo dos átomos de enxofre na estrutura, para a terceira forma cristalina da Miotoxina ACL estão mostradas na tabela 3.1.1.3.

Tabela 3.1.3.1: Parâmetros e valores finais do processamento dos dados coletados para a terceira forma cristalina da Miotoxina ACL.

PARÂMETROS	TERCEIRA FORMA CRISTALINA
Local da coleta	Anodo rotatório RIGAKU ultraX 18
Tipo de radiação	Cu-K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$)
Detector	placa de imagem MAR345 dtb
Grupo espacial	P4 ₁ 2 ₁ 2
Parâmetros da cela unitária	a = b = 70,57 $\text{\AA}$, c = 57,45 $\text{\AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90,0^\circ$
Mosaicidade	0,45°
Faixa de resolução (camada externa)	26,5 – 1,61 $\text{\AA}$ (1,65 – 1,61)
Tempo total de coleta	~ 21 h
Solução crioprotetora	líquido-mãe + 15% (v/v) etileno glicol
Tempo de banho	~ 10 s
Total de imagens ($\Delta\phi = 1^\circ$)	359
Reflexões totais	526515
Reflexões únicas	35959
Redundância (camada externa)	14,6 (14,1)
R _{sym} total (camada externa)	6,1 % (31,4 %)
Completeza anômala total (camada externa)	99,8 % (99,8 %)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$ total (camada externa)	49,5 (8,1)

3.2 - REFERÊNCIAS

- Carter, C.W.Jr and Sweet, R.M. (1997) Editors. *Methods in Enzymology* **276**, 183-358
- Collaborative Computational Project Number 4 (1994) *Acta Cryst.* **D50**, 760-763
- Cromer, D.T. (1983) *J. Appl. Cryst.* **16**, 437-438
- Dauter, Z. (1997) *Methods in Enzymology* **276**, 326-344
- Dauter, Z. (1999) *Acta Cryst.* **D55**, 1703-1717
- Dauter, Z. and Adams, D.A. (2001) *Acta Cryst.* **D57**, 990-995
- Drenth, J. (1999) *Principles of X-ray Crystallography*, 2nd ed. Heidelberg: Springer.
- Evans, P.R. (1997) *Joint CCP4 and ESF-EACBM Newsletter* **33**, 22-24
- French, G.S. and Wilson, K.S. (1978) *Acta Cryst.* **A34**, 517-525

- Haas, D.J. and Rossmann, M.G. (1970) *Acta Cryst.* **B26**, 998-1004
- Hass, D.J. (1968) *Acta Cryst.* **B24**, 604
- Hendrickson, W.A. & Ogata, C.M. (1997) *Methods Enzymology* **276**, 494-523
- International Tables for Crystallography* Vol. A (1996) Kluwer Academic, 4th edition
- Leslie, A.G.W. (1992) *Newsletter on Protein Crystallography* **26**
- Matthews, B.M. (1968) *J. Mol. Biol.* **33**, 491-497
- Otwinowski, Z. and Minor, W. (1997) *Methods Enzymology* **276**, 307-326
- Polikarpov, I., Perles, L.A., de Oliveira, R.T., Oliva, G., Castellano, E.E., Garratt, R.C. and Craievich, A. (1998) *J. Synch. Rad.* **5**, 72-76
- Selistre-de-Araujo, H.S., White, S.P. and Ownby, C.L. (1996) *Arch. Biochem. Biophys.* **326**, 21-30
- Teng, T.Y. (1990) *J. Appl. Cryst.* **23**, 387-391
- Treharne, A.C., White, S.P., Ownby, C.L., Selistre-de-Araújo, H.S. and Foundling, S.I. (1997) *Toxicon* **35**, 613-615
- Turkenburg, J. Brady, L. Bailey, S., Ashton, A., Broadhurst, P. and Brown, D. (1999) *Acta Cryst.* **D55**, 1631-1772

- CAPÍTULO 4 -

OBTENÇÃO DAS FASES E REFINAMENTO DAS ESTRUTURAS CRISTALOGRÁFICAS

Como citado no capítulo 3, a grande limitação na resolução de uma estrutura cristalográfica através da coleta de dados de difração de raios X, é a obtenção das fases, $\alpha(hkl)$, das ondas espalhadas pelas nuvens eletrônicas dos conjuntos de átomos que constituem o cristal. A construção de um modelo cristalográfico inicial se baseia na análise dos mapas de densidade eletrônica, calculados com fases experimentais ou estimadas ($\rho(xyz)$, Apêndice B). Em princípio, para se resolver o problema das fases e possibilitar o cálculo inicial dos mapas, quatro técnicas básicas foram desenvolvidas: substituição isomórfica múltipla (Green *et al.*, 1958), dispersão anômala a múltiplos comprimentos de onda (Hendrickson, 1985), substituição molecular (Rossmann and Blow, 1962) e métodos diretos (DM, Hauptman, 1997). O uso do espalhamento anômalo dos átomos permite ainda a derivatização de outras técnicas, como dispersão anômala a um único comprimento de onda (SAD) e substituição isomórfica múltipla ou simples, com sinal anômalo (MIRAS ou SIRAS).

Na tentativa de obtenção das fases neste projeto, foram aplicadas as técnicas de substituição molecular (MR) e dispersão anômala a um único comprimento de onda (SAD). Como as fosfolipases A₂ são enzimas bastantes

estudadas, várias estruturas tridimensionais dessas moléculas, oriundas de diversas fontes, já foram elucidadas e atualmente estão disponíveis no PDB (*Protein Data Bank*, Berman *et al.*, 2000; <http://www.pdb.org>). A substituição molecular faz uso das informações de similaridade sequencial entre proteínas da mesma família, uma vez que se espera que estas possuam enovelamentos muito semelhantes.

As coordenadas de muitas estruturas tridimensionais de proteínas, resolvidas por cristalografia de raios X, ressonância magnética nuclear ou por modelagem, podem ser encontradas disponíveis no PDB. Até a data de realização deste trabalho, aproximadamente 20.000 estavam publicamente disponíveis.

No caso de fases obtidas por substituição molecular, a molécula modelo da proteína é modificada de acordo com o mapa e a sequência de aminoácidos da estrutura que se quer determinar. Atualmente, devido ao grande número de estruturas disponíveis, essa é a técnica mais fácil e utilizada para se resolver uma estrutura, mas como dito, requer a existência da estrutura tridimensional de uma proteína com estrutura similar já resolvida.

A análise de espalhamento anômalo, a um ou a múltiplos comprimentos de onda, possibilita em muitos casos, a determinação de fases para estruturas que não possuam homólogos. Necessita-se da presença de átomos com grande número atômico (em relação aos mais abundantes nas proteínas, como C, N e O) e dados de difração de raios X para essa técnica geralmente são coletados em fontes de radiação síncrotron, pois possibilitam o ajuste para o comprimento de onda desejável. A aplicação desta técnica neste projeto tem caráter puramente metodológico, pois os dados foram coletados em um ânodo rotatório, usando simplesmente informações de espalhamento anômalo de átomos de enxofre da

estrutura nativa, a um comprimento de onda longe das bordas de emissão e absorção para esse tipo de átomo. Além do mais, até hoje, só duas estruturas em todo o mundo, foram resolvidas por esses meios (Hendrickson *et al.*, 1981; Lemke *et al.*, 2002). A ótima qualidade do conjunto de dados coletado para a terceira forma cristalina permitiu a aplicação bem sucedida desta análise. Atualmente, as fundamentações teóricas destas técnicas estão bem definidas e, juntamente com considerações práticas, são amplamente encontradas na literatura (*Methods In Enzymology*, Vol. 276; Drenth, 1999).

Após a obtenção do conjunto inicial de fases, é imprescindível o refinamento de parâmetros necessários para se descrever o modelo. Para cada átomo na unidade assimétrica, um número mínimo de 4 (posição e vibração isotrópica) até um máximo de 10 parâmetros (em situações de ocupação parcial e vibrações anisotrópicas) pode ser definido. E uma vez definidos, estes devem ser modificados para melhorar o acordo com os dados experimentais, com abordagem tanto no espaço recíproco (acordo entre fatores de estrutura teóricos e experimentais) como no espaço real (inspeção dos mapas de densidade eletrônica do modelo).

A resolução limitada e a qualidade do conjunto inicial de fases, característicos de dados de difração para macromoléculas faz com que às vezes o refinamento seja guiado de maneira tendenciosa, tornando muito grande a probabilidade de introdução de erros no modelo, principalmente quando o conjunto inicial das fases vem de MR, de maneira que se deve conduzir um constante monitoramento na qualidade do que está sendo feito durante todo o processo de construção. Diversos programas computacionais têm sido

desenvolvidos nesta área, permitindo a visualização, a manipulação, cálculo e refinamento dos parâmetros e a análise da qualidade na construção de um modelo.

No caso da determinação das três estruturas cristalinas da Miotoxina ACL, novamente os resultados serão divididos por forma, para facilitar a descrição e o entendimento dos resultados.

4.1 - PRIMEIRA FORMA CRISTALINA

4.1.1 - OBTENÇÃO DAS FASES INICIAIS

A busca por modelos para a substituição molecular da Miotoxina ACL foi feita no PDB, analisando seqüências da mesma subfamília de proteínas. De acordo com o critério de identidade seqüencial, três enzimas foram selecionadas: a Lys49-PLA₂ extraída da serpente *Agkistrodon piscivorus piscivorus* (PDBID 1PPA, Holland *et al.*, 1994), a estrutura da também Lys49-PLA₂ da serpente *Bothrops godmani* (PDBID 1GOD, Arni *et al.*, 1999) e a Piratoxina-II da serpente *Bothrops pirajai* (PDBID 1QLL, Lee *et al.*, 2001). O alinhamento seqüencial foi realizado através do programa CLUSTALX (Thompson *et al.*, 1997), envolvendo os três modelos juntamente com a Miotoxina ACL (Apêndice A, Selistre-de-Araújo *et al.*, 1996). O resultado está representado na figura 4.1.1.1.

			10	20	30	40	50																																													
Miotoxin ACL	1		S	L	L	E	L	G	K	M	I	L	Q	E	T	G	K	N	A	I	T	S	Y	G	S	Y	G	C	N	C	G	W	G	H	R	G	Q	P	K	D	A	T	D	R	C	C	F	V	H	K	C	C
1PPA	1		S	V	L	E	L	G	K	M	I	L	Q	E	T	G	K	N	A	I	T	S	Y	G	S	Y	G	C	N	C	G	W	G	H	R	G	Q	P	K	D	A	T	D	R	C	C	F	V	H	K	C	C
1GOD	1		S	M	Y	Q	L	W	K	M	I	L	Q	E	T	G	K	N	A	V	P	S	Y	G	L	Y	G	C	N	C	G	V	G	S	R	G	K	P	K	D	A	T	D	R	C	C	F	V	H	K	C	C
1QLL	1		S	L	F	E	L	G	K	M	I	L	Q	E	T	G	K	N	P	A	K	S	Y	G	A	Y	G	C	N	C	G	V	L	G	R	G	K	P	K	D	A	T	D	R	C	C	F	V	H	K	C	C
			60	70	80	90	100																																													
Miotoxin ACL	51		Y	K	K	L	T	D	C	N	H	K	T	D	R	Y	S	Y	S	W	K	N	K	A	I	I	C	E	E	K	N	P	C	L	K	E	M	C	E	C	D	K	A	V	A	I	C	L	R	E	N	L
1PPA	51		Y	K	K	L	T	D	C	N	H	K	T	D	R	Y	S	Y	S	W	K	N	K	A	I	I	C	E	E	K	N	P	C	L	K	E	M	C	E	C	D	K	A	V	A	I	C	L	R	E	N	L
1GOD	51		Y	K	K	L	T	D	C	S	P	K	T	D	S	Y	S	Y	S	W	K	D	K	T	I	V	C	G	D	N	N	P	C	L	Q	E	M	C	E	C	D	K	A	V	A	I	C	L	R	E	N	L
1QLL	51		Y	K	K	L	T	G	C	N	P	K	D	R	Y	S	Y	S	W	K	D	K	T	I	V	C	G	E	N	N	P	C	L	K	E	L	C	E	C	D	K	A	V	A	I	C	L	R	E	N	L	
			110	120																																																
Miotoxin ACL	101		D	T	Y	N	K	K	Y	K	A	Y	F	K	F	K	C	K	P	E	T	C																														
1PPA	101		D	T	Y	N	K	K	Y	K	A	Y	F	K	L	K	C	K	P	D	T	C																														
1GOD	101		D	T	Y	N	K	N	Y	K	I	Y	P	K	P	L	C	K	K	A	D	A	C																													
1QLL	101		G	T	Y	N	K	K	Y	R	Y	H	L	K	P	F	C	K	K	A	D	K																														

Fig. 4.1.1.1: Alinhamento sequencial, num total de 121 resíduos, das Lys49-PLA2 da Miotoxina ACL, 1PPA, 1GOD e 1QLL. São destacados os resíduos conservados. A porcentagem de similaridade é referente à comparação das seqüências dos três modelos em relação a Miotoxina ACL. Em destaque, estão as lisinas conservadas na posição 49.

De acordo com o resultado do alinhamento, a estrutura escolhida para ser usada como modelo para a substituição molecular foi o monômero da 1PPA, que apresenta 97,52 % de identidade seqüencial em relação a ACL, o que representa apenas 3 resíduos diferentes em relação a 121 totais, enquanto que para as outras estruturas, identidades seqüenciais iguais a 76,0 %.

De posse da estrutura modelo e do arquivo de reflexões partiu-se então para a busca de uma solução para as funções de rotação e translação (Apêndice B). Essa busca foi feita utilizando-se todos os dados entre 10,0 e 3,0 Å de resolução.

Restava ainda uma dúvida com relação ao grupo espacial correto, $P4_12_12$ ou $P4_32_12$, devido ao fato de serem enantiomorfos, apresentando as mesmas extinções sistemáticas no arquivo de reflexões. A escolha correta das soluções da função de translação pôde ser feita através da análise do coeficiente de correlação

e do R_{factor} para os dois grupos. Essa questão não pode ser resolvida apenas com a função de rotação, pois esta faz uso apenas dos vetores de Patterson intramoleculares, sendo independente das relações de simetria dos grupos espaciais, o que pode ser observado analisando resultados gerados pelo MOLREP (tabela 4.1.1.1).

Tabela 4.1.1.1: Melhores soluções para as funções de rotação e translação na busca por uma cópia da molécula na unidade assimétrica, para a primeira forma cristalina da Miotoxina ACL, através do MOLREP. Valores idênticos obtidos para a função de rotação, para os grupos $P4_12_12$ e $P4_32_12$, ilustram o fato dessa busca envolver autovetores de Patterson. A escolha correta deve ser feita analisando-se as soluções para translação e os coeficientes de correlação.

GRUPO ESPACIAL	α	β	γ	x	y	z	R_{factor} (%)	CC (%)
$P4_12_12$	87,78	4,71	200,3	0,738	0,956	0,080	45,9	54,9
$P4_32_12$	87,78	4,71	200,3	0,240	0,455	0,082	53,8	35,9

Devido à maior correlação dos dados com o grupo $P4_12_12$ (CC = 54,9 %), este foi identificado como grupo espacial correto para a primeira forma cristalina da Miotoxina ACL.

4.1.2 - CONSTRUÇÃO E REFINAMENTO DO MODELO

A partir da determinação do grupo espacial correto e das soluções para a substituição molecular, um modelo aproximado para a estrutura da proteína pôde ser obtido, onde as características mais marcantes da arquitetura molecular tornaram-se aparentes.

No refinamento da primeira forma cristalina da Miotoxina ACL a 2,3 Å de resolução, 7960 reflexões independentes foram medidas, como mostrado no

capítulo anterior. Foram refinados três parâmetros posicionais (x, y e z), um fator de temperatura isotrópico (B), diretamente relacionado com a ocupação média de cada átomo dentro do cristal, para cada um dos quase 1100 átomos, resultando em aproximadamente 4400 parâmetros, o que dá um pobre resultado de apenas 1,9 parâmetros observados para cada parâmetro refinado. Essa é a principal razão para que ‘observações’ adicionais sejam incorporadas ao processo de refinamento (Drenth, 1994). Em primeiro lugar são inferidas restrições estereoquímicas para as estruturas moleculares. Os comprimentos e os ângulos das ligações já foram determinados com alta precisão no caso de aminoácidos e pequenos peptídeos, e podem ser aplicados a proteínas (Engh *et al.*, 1991). Outra observação adicional é que o conteúdo de solvente que preenche os canais entre as moléculas de proteína em seu arranjo cristalino está desordenado e deve aparecer como uma região lisa no mapa de densidade eletrônica. Finalmente a simetria não-cristalográfica, que, se detectada na substituição molecular, contribui de maneira importante no refinamento de uma estrutura de proteína por imposição de igualdade entre moléculas ou subunidades relacionadas não-cristalograficamente. Esta última restrição não pode ser aplicada à Miotoxina ACL, uma vez que há apenas uma molécula na unidade assimétrica.

O empacotamento cristalino das moléculas foi manualmente inspecionado e o modelo foi subsequenteiramente sujeito a refinamentos pelo algoritmo de máxima verossimilhança (*Maximum Likelihood*, Adams *et al.*, 1997) com fatores de estrutura isotrópicos utilizando-se o pacote de programas CNS (*Crystallographic & NMR System*, Brünger *et al.*, 2000) e o programa REFMAC (Collaborative Computational Project Number 4, 1994).

Ciclos de refinamento no espaço real, com modificações manuais do modelo, foram feitos através da inspeção dos mapas de densidade eletrônica $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$, α_{calc} , e Fourier diferença ($F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$, α_{calc}), usando o programa gráfico ‘O’ (Kleywegt, & Jones, 1994), alternados com cálculos intermediários (no espaço recíproco) para refinamento de posições atômicas, dinâmica molecular (*Simulated Annealing*, Brünger *et al.*, 1997), restrições geométricas e de contato, refinamento de fator de temperatura individual para todos os átomos, além de minimização de funções de energia. Fatores de estrutura calculados com base no modelo geralmente discordam dos fatores de estrutura observados. O índice de discrepância entre os módulos dos fatores de estrutura calculados e observados, é comumente representado por um índice residual, o R_{factor} (Apêndice B), sendo o parâmetro mais usado como referência durante o refinamento. O monitoramento do acordo do modelo no espaço recíproco, após cada ciclo no espaço real, foi conduzido através da análise da variação do R_{factor} , juntamente com o R_{free} (Validação Cruzada, Apêndice B; Brünger, 1998), como mostrado na figura 4.1.2.1. Foram usadas 7387 reflexões no conjunto de trabalho (para cálculo do R_{factor}) e 356 no conjunto de teste (aproximadamente 5% do conjunto total, para cálculo do R_{free}), compreendendo numa faixa de resolução de 20,0 até 2,3 Å. Os valores finais desses índices de discrepância ficaram em 20,4% (R_{factor}) e 26,1 % (R_{free}). A introdução de moléculas de água, nas primeiras camadas de solvatação, foi feita através de um protocolo iterativo de busca e refinamento, baseado no programa ARP (Lamzin, 1993).

Fig. 4.1.2.1: Evolução do refinamento da estrutura cristalográfica da primeira forma cristalina em função do numero de ciclos.

Durante o refinamento da estrutura contra os mapas de densidade eletrônica, foi observada uma forte densidade eletrônica, acima de 3σ , no mapa $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ (Fourier diferença), na região do sítio ativo, e como consequência da forma e da aparente geometria dessa densidade eletrônica, esta foi interpretada como um ácido graxo, também observado por Lee e colaboradores (Lee *et al.*, 2001), na estrutura cristalográfica da Piratoxina-II (PrTX-II). De acordo com o comprimento da densidade eletrônica, e o tamanho da cauda hidrofóbica modelada dentro desta, foi proposta uma molécula de ácido láurico (12:0), como mostrado nas figuras 4.1.2.2(a) e (b). O comprimento dessa cauda não pode ser determinado com exatidão, pois ao alcançar a superfície da molécula, em contato com o solvente, esta pode assumir grande flexibilidade, dificultando a determinação de uma posição média.

Fig. 4.1.2.2: Forte densidade eletrônica observada nos mapas Fourier diferença ($F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$, α_{calc}), contornado a 3σ (verde) em (a), e $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$, α_{calc} , contornado a 1σ (preto) em (b), dentro do sítio ativo. Este é mostrado através da superfície de van der Waals, onde a região azul representa os nitrogênios, os oxigênios estão em vermelho e em branco estão os carbonos. Ácido graxo (amarelo) do tipo láurico (12:0) modelado de acordo com a forma e a geometria da densidade. Os mapas ilustrados nessa figura foram calculados a partir de estrutura refinada.

Outra forte densidade eletrônica foi observada, nas proximidades do *loop* de ligação de cálcio, e interpretada de acordo com a forma, tamanho e coordenações químicas, como sendo procedente de um íon sulfato (figura 4.1.2.3). Esses íons estavam presentes no meio de cristalização e podem ter se co-cristalizado com a proteína.

Fig. 4.1.2.3: Íon sulfato, proveniente da condição de cristalização, localizado entre o *loop* de ligação de cálcio e o C-terminal, sendo coordenado pelos nitrogênios das cadeias laterais dos resíduos His33, Arg34 e Lys53. Densidade eletrônica mostrada através do mapa Fourier $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$, 1σ .

Foi modelada também uma molécula de glicerol, co-cristalizada com a proteína, com densidade eletrônica presente próxima à região de acesso ao sítio ativo (figura 4.1.2.4). Esse composto foi adicionado ao meio como agente crioprotetor, viabilizando a coleta dos dados à temperatura de 100 K.

Fig. 4.1.2.4: Densidade eletrônica, no mapa Fourier $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$, 1σ , resultante da presença de uma molécula de glicerol co-cristalizada, adicionada ao meio como agente crioprotetor.

Com relação à molécula protéica, todos os 121 resíduos de aminoácidos esperados para cada monômero foram modelados dentro de regiões interpretáveis

dentro de mapas de Fourier do tipo $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ (1σ), onde alguns exemplos se encontram nas figuras 4.1.2.5(a) e (b).

Fig. 4.1.2.5: (a) e (b) ilustram diferentes regiões da molécula interpretadas dentro de um mapa de densidade eletrônica de Fourier do tipo $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$, 1σ .

Apenas algumas cadeias laterais não foram localizadas, para resíduos polares e com cadeias laterais que contém mais de quatro átomos, como a lisina. Estes resíduos pertencem a regiões superficiais que fazem contato com o solvente e apresentam grande mobilidade conformacional dentro do empacotamento cristalino. Para esses átomos, que possuem fatores de temperatura altos e não interagem com nenhum outro grupo químico, as respectivas ocupações foram

igualadas a zero. Dois exemplos ilustrando essa situação se encontram nas figuras 4.1.2.6 (a) e (b).

Fig. 4.1.2.6: (a) e (b) ilustram exemplos de duas regiões próximas à superfície da molécula, onde, devido à alta mobilidade de resíduos como lisina, não foram encontradas densidades eletrônicas para suas cadeias laterais. Mapa Fourier $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$, 1σ .

O refinamento foi dado por encerrado quando não foi mais possível melhorar os índices R_{factor} e R_{free} . A estrutura cristalográfica da primeira forma cristalina da Miotoxina ACL, refinada a 2,3 Å no grupo espacial $P4_12_12$, e compreendida de um monômero de proteína, uma molécula de ácido láurico, um íon sulfato, uma molécula de glicerol e 74 moléculas de água na unidade assimétrica. O modelo cristalográfico não inclui átomos de hidrogênio.

4.1.3 - ANÁLISE DA QUALIDADE DO MODELO

A validação da estrutura, ou seja, a regularidade estereoquímica e a autoconsistência química do modelo, foi feita através dos programas PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993), junto com a análise comparativa deste em relação aos fatores de estrutura observados, feita pelo programa SFCHECK (Vaguine *et al.*, 1999).

Através da análise do diagrama de Ramachandram, gerado pelo PROCHECK, 90,8 % (99 resíduos) dos resíduos se encontram nas regiões mais favoráveis, 9,2 % (10 resíduos) estão em regiões adicionais permitidas, e nenhuma ocupação em regiões generosamente permitidas ou totalmente desfavoráveis, excluindo resíduos de glicina (7 no total), representados por triângulos, cuja cadeia lateral é um átomo de hidrogênio, de maneira que o C α não possui quiralidade (figura 4.1.3.1).

Fig. 4.1.3.1: A qualidade estereoquímica da molécula da miotoxina ACL na forma I, no estágio final do refinamento foi avaliada através do diagrama de Ramachandram, que relaciona as combinações dos ângulos torsionais diedrais (ϕ e ψ).

Outras análises feitas pelo PROCHECK abordam parâmetros estereoquímicos da cadeia principal e mostram como a estrutura (representada por um quadrado preto) se comporta quando comparada com outras resolvidas na mesma resolução. A região hachurada nesses gráficos representa a faixa de resultados dessas estruturas, a linha central é o ajuste mínimo quadrático para a inclinação média em função da resolução, enquanto que a largura da banda corresponde à variação de um desvio padrão sobre a média. Em alguns casos a inclinação é dependente da resolução e em outros não. A qualidade do diagrama de Ramachandram (figura 4.1.3.2(a)) é medida pela porcentagem de resíduos que estão na região mais favorável do diagrama. Contudo, conforme a resolução diminui, essa porcentagem decresce. A região hachurada corresponde a esse decréscimo com a piora na resolução. A qualidade da planaridade da ligação peptídica (figura 4.1.3.2 (b)) é medida calculando-se o desvio padrão para os ângulos ω das diversas estruturas. Quanto menor o valor, mais próximo de 180° (o que representa uma ligação peptídica planar perfeita). A distorção tetraédrica dos carbonos- α (figura 4.1.3.2 (c)): é medida calculando-se o desvio no ângulo ζ , imaginário, definido átomos N, $C\alpha$, $C\beta$ e C para um dado resíduo, estabelecendo a tetraedralidade dos $C\alpha$. E por último o G_{factor} total (figura 4.1.3.2 (d)), que é uma medida da normalidade estereoquímica da estrutura como um todo. Representa uma média para os G_{factor} de cada resíduo na estrutura.

Fig. 4.1.3.2: Estatísticas geradas pelo programa PROCHECK, sobre alguns parâmetros estereoquímicos da forma I da Miotoxina ACL (representada pelo quadrado preto), quando comparada com outras estruturas resolvidas à mesma resolução.

Observa-se acima que a estrutura está melhor em termos estereoquímicos do que a média das estruturas à mesma resolução. O fator G é significativamente melhor, indicando que foi possível se alcançar valores aceitáveis de R_{factor} e R_{free} mantendo uma estereoquímica excelente.

A comparação entre o modelo e os dados experimentais é feita através da análise da correlação entre o resíduo modelado dentro de sua respectiva densidade eletrônica, tanto para a cadeia principal como para as cadeias laterais. Essa análise é feita pelo programa SFCHECK, e os resultados estão mostrados na figura 4.1.3.3.

Fig. 4.1.3.3: Avaliação do acordo entre o modelo e a densidade eletrônica para a Miotoxina ACL na primeira forma cristalina. Dois critérios são mostrados para cada resíduo da macromolécula, bem como para cada heterogrupo e molécula de água: a correlação com a densidade eletrônica (*density correlation*), e o fator de temperatura (*B-factor*).

A correlação dos átomos do modelo com a densidade eletrônica (*density correlation*) está excelente para quase toda a molécula, em ambas as cadeias, exceto para os resíduos A38 (lisina), A43 (arginina), A78 (lisina), A129 (lisina), localizados em regiões de contato com o solvente, com altos valores para o fator de temperatura, apresentando uma pobre correlação tanto para a cadeia principal como para as cadeias laterais. Regiões próximas a esses resíduos apresentam altos fatores de temperatura (*B-factor*), tanto para a cadeia principal como para as cadeias laterais.

As moléculas de água (identificadas por W) também são avaliadas. Apesar de não haver uma avaliação para a correlação das águas com a densidade eletrônica, a análise visual destas, mostra índices de densidade aceitáveis no mapa de densidade eletrônica, mesmo para aquelas que apresentam altos valores para o fator de temperatura ($> 50 \text{ \AA}^2$).

Os valores dos desvios quadráticos médios para os comprimentos de ligações e distâncias refinadas foram de $0,009 \text{ \AA}$ e $1,214^\circ$, respectivamente e o fator de temperatura médio do modelo final ficou em $47,48 \text{ \AA}^2$.

4.2 - SEGUNDA FORMA CRISTALINA

4.2.1 - OBTENÇÃO DAS FASES INICIAIS

Fases iniciais para a construção de um modelo para a forma II da Miotoxina ACL foram também obtidas por substituição molecular, agora utilizando como molécula de busca a estrutura parcialmente refinada da primeira forma cristalina.

Novamente tornou-se necessária a escolha do grupo espacial correto, entre $P4_12_12$ e $P4_32_12$, através da análise das soluções da função de translação e dos coeficientes de correlação (CC) encontradas pelo programa MOLREP. Dessa maneira, com uma correlação de 56,1 %, o grupo $P4_12_12$ foi o escolhido, uma vez que a correlação para o seu enantiomorfo foi de 39,3%.

4.2.2 - CONSTRUÇÃO E REFINAMENTO DO MODELO

Ciclos alternados de refinamento nos espaços real e recíproco foram conduzidos seguindo a mesma metodologia para a primeira forma, com inspeção dos mapas de densidade eletrônica de Fourier do tipo $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}} (1\sigma)$ e $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$

(3σ), e monitoramento da variação dos índices de discordância, com valores finais de R_{factor} e R_{free} respectivamente iguais a 17,1 % e 22,4 %. A introdução de moléculas de solvente no modelo foi feita com o programa ARP. Nenhuma densidade eletrônica de natureza não-protéica foi encontrada dentro do sítio ativo, a menos de um íon sulfato, novamente próximo ao *loop* de ligação de cálcio (figura 4.2.2.1). Suspeita-se que esse íon, como na forma anterior, tenha se co-cristalizado com a proteína, pois está presente em uma concentração de 2,0 M na condição de cristalização.

Fig. 4.2.2.1: Íon sulfato, na forma II, proveniente da condição de cristalização, ocupando uma posição mais próxima ao *loop* de ligação de cálcio, sendo coordenado pelos nitrogênios das cadeias laterais dos resíduos Lys49, Lys53 e Arg34.

A estrutura final consiste em um monômero da molécula protéica, com 152 moléculas de água nas primeiras camadas de solvatação, além de 1 íon sulfato. Aqui também todos os 121 resíduos esperados para a estrutura monomérica foram modelados coerentemente dentro de regiões interpretáveis no mapa do tipo Fourier $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ (1σ), mas assim como no primeiro modelo descrito, as densidades eletrônicas para algumas cadeias laterais não foram encontradas, novamente em sua maioria resíduos de lisina e para esses átomos

foram atribuídos valores nulos de ocupação. O modelo cristalográfico não inclui átomos de hidrogênio.

4.2.3 - ANÁLISE DA QUALIDADE DO MODELO

A validação do modelo final novamente foi feita através dos programas PROCHECK e SFCHECK. Nas estatísticas referentes ao diagrama de Ramachandram, temos que 92,7% dos resíduos não glicina se encontram nas regiões mais favoráveis, 7,3% estão em regiões adicionais permitidas, sem ocupação em regiões generosamente permitidas ou totalmente desfavoráveis (figura 4.2.3.1).

Fig. 4.2.3.1: Qualidade estereoquímica da segunda forma cristalina da miotoxina ACL após o término do refinamento, avaliada através do diagrama de Ramachandram.

Quando comparada com outras estruturas resolvidas à mesma resolução, a segunda forma cristalina da Miotoxina ACL apresenta ótima qualidade

estereoquímica e um alto índice de concordância com os dados experimentais. Essa comparação novamente foi feita pelo PROCHECK, em termos de qualidade do diagrama de Ramachandram (figura 4.3.2.2(a)), planaridade da ligação peptídica (figura 4.3.2.2(b)), distorção tetraédrica dos carbonos- α (figura 4.3.2.2(c)) e G_{factor} total (figura 4.3.2.2(d)).

Fig. 4.2.3.2: Estatísticas geradas pelo programa PROCHECK, sobre alguns parâmetros estereoquímicos da forma II da Miotoxina ACL (representada pelo quadrado preto), quando comparada com outras estruturas resolvidas à mesma resolução.

A comparação entre o modelo e os dados experimentais é feita através da análise da correlação entre o resíduo modelado dentro de sua respectiva densidade eletrônica. Este resultado está mostrado na figura 4.2.3.3, junto com os respectivos fatores de temperatura (B) para cada resíduo. Novamente toda a

estrutura apresenta uma ótima correlação com um a densidade eletrônica para a cadeia principal, e apenas a cadeia lateral do resíduo Glu94 (um resíduo exposto ao solvente) se mostra com problemas.

Fig. 4.2.3.3: Avaliação do acordo entre o modelo e a densidade eletrônica para a Miotoxina ACL na segunda forma cristalina.

No final do refinamento, os desvios quadráticos médios para as distâncias e ângulos refinados foram de 0,018 Å e 1,783°, respectivamente. O valor do fator de temperatura médio do modelo foi de 25,57 Å².

4.3 - TERCEIRA FORMA CRISTALINA

4.3.1 - OBTENÇÃO DAS FASES INICIAIS

Uma metodologia diferente foi usada na obtenção das fases iniciais para a forma III da Miotoxina ACL. Devido à ótima qualidade dos dados coletados, decidiu-se utilizar informações de espalhamento anômalo dos átomos de enxofre previstos na sequência de aminoácidos (16 átomos em 121 resíduos).

A tentativa de obtenção das posições dos átomos foi feita utilizando-se o programa SHELXD (Ulson, 1999), através de Métodos diretos e mapas de Diferença Anômala de Patterson. Ao invés de 16 sítios, foram encontrados 18, onde no final da construção do modelo verificou-se a presença do outro íon sulfato, novamente nas proximidades do *loop* de ligação de cálcio, proveniente da condição de cristalização e a presença de uma conformação alternativa para a cadeia lateral do resíduo Met95 (aproximadamente 30 %).

4.3.2 - CONSTRUÇÃO E REFINAMENTO DO MODELO

Uma vez obtidas as posições dos enxofres, o faseamento foi realizado com o programa SHARP (referencia), com figura de mérito das fases a baixa resolução de 68 %. A construção automática do modelo foi feita com o programa ARP/wARP (Perrakis, 1999), após modificação da densidade eletrônica com achatamento do solvente, com conteúdo de solvente estimado de 47 %. Dos 121

resíduos esperados, 108 foram construídos. Uma ilustração do modelo construído pelo ARP/wARP, indicando os 18 sítios encontrados para os átomos de enxofre, através do mapa diferença anômala de Patterson, encontra-se na figura 4.3.2.1.

Fig. 4.3.2.1: Modelo construído pelo programa ARP/wARP, após faseamento realizado pelo SHARP, indicando os sítios dos enxofres (em verde), através do mapa diferença anômala de Fourier ($4,5\sigma$) usando as posições encontradas pelo programa SHELXD.

A figura 4.3.2.2 ilustra a ótima qualidade do mapa experimental, após modificação da densidade eletrônica por achatamento do solvente, e o modelo obtido no primeiro ciclo de construção automática. Foi possível se observar furos de densidade eletrônica em resíduos cujas cadeias laterais possuíam anéis aromáticos, mesmo sem o modelo ser construído e refinado.

Fig. 4.3.2.2: Parte representativa do mapa de densidade eletrônica após modificação da densidade através de achatamento do solvente e construção automática do modelo.

O restante da molécula foi construído manualmente e todos os processos, tanto de refinamento como análise manual do modelo, seguiram a mesma metodologia descrita para as duas formas anteriores. Foram usadas 18361 reflexões para o conjunto de trabalho (26,0 a 1,61 Å de resolução) e 991 reflexões (5,1 %) para validação cruzada. O refinamento foi encerrado com valores para R_{factor} e R_{free} de 17,9 % e 19,8 %, respectivamente.

4.3.3 - ANÁLISE DA QUALIDADE DO MODELO

Todo o processo de validação estereoquímica e análise do acordo entre o modelo obtido e os dados experimentais foi novamente feito com o uso dos programas PROCHECK e SFCHECK. A análise do diagrama de Ramachandram indica a presença de 103 resíduos na região mais favorecida (94,5 %), 6 na região adicionalmente permitida (5,5 %) e nenhum nas regiões generosamente permitidas e proibidas (figura 4.3.3.1).

Fig. 4.3.3.1: Qualidade estereoquímica da molécula da miotoxina ACL na forma III, avaliada através do diagrama de Ramachandram.

A avaliação dos principais parâmetros esteroquímicos indica uma ótima qualidade do modelo, quando comparado com outras estruturas resolvidas à mesma resolução (figura 4.3.3.2).

Fig. 4.3.3.2: Estatísticas sobre alguns parâmetros estereoquímicos da forma III da Miotoxina ACL, geradas pelo programa PROCHECK.

O acordo entre o modelo final e os dados experimentais é mostrado na figura 4.3.3.3, onde pode se observar ótima correlação com a densidade eletrônica para toda a molécula, inclusive para os heteroátomos, até mesmo para regiões que apresentam relativamente altos fatores de temperatura. Devido grande flexibilidade do C-terminal, este apresenta uma pior correlação, com fatores de temperatura um pouco mais altos em relação ao restante da molécula.

O valor do fator de temperatura médio do modelo, ao final do refinamento, foi de $14,94 \text{ \AA}^2$, e os desvios quadráticos médios para as distâncias e ângulos refinados foram, respectivamente, de $0,014 \text{ \AA}$ e $1,565^\circ$.

Fig. 4.3.3.3: Avaliação do acordo entre o modelo e a densidade eletrônica para a Miotoxina ACL na terceira forma cristalina, através do programa SFCHECK.

Até o presente momento, apenas outras duas estruturas foram descritas como resolvidas utilizando-se sinal anômalo do enxofre (Hendrickson *et al.*, 1981; Lemke *et al.*, 2002), medido a uma comprimento de onda da ordem da radiação K α do cobre em âodos rotatórios.

As três formas cristalinas já foram depositadas no PDB, com os respectivos identificadores 1N8D, 1N8G e 1N8H, estão em fase final de avaliação, aguardando a publicação do artigo para terem as coordenadas liberadas.

4.4 - REFERÊNCIAS

- Adams, P.D., Pannu, N.S., Read, R.J. and Brünger, A.T. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 5018-5023
- Arni, R.K., Fontes, M.R.M., Barberato, C., Gutiérrez, J.M., Díaz, C. and Ward, R.J. (1999) *Arch. Biochem. Biophys.* **366**, 177-182
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N. and Bourne, P.E. (2000) *Nucleic Acids Research* **28**, 235-242
- Brünger, A., Adams, P., Clore, M., Gros, P., Nilges, M. and Read, R. (1998) *Acta Cryst.* **D54**, 905-921
- Brünger, A.T. (1997) *Methods in Enzymology* **277**, 366-396
- Brünger, A.T. and Rice, L.M. (1997) *Methods in Enzymology* **277**, 243-269
- Collaborative Computational Project Number 4 (1994) *Acta Cryst.* **D50**, 760-763
- Drenth, J. (1999) *Principles of X-ray Crystallography*, 2nd ed. Heidelberg: Springer
- Engh, R. and Huber, R. (1991) *Acta Cryst.* **A47**, 392-400
- Hauptman, H.A. (1997) *Methods in Enzymology* **276**, 3-13
- Helliwell, J.R. (1992) *Macromolecular crystallography with synchrotron radiation*, Cambridge University Press.
- Hendrickson, W.A. (1985) *Trans. Am. Cryst. Assoc.* **21**, 11
- Hendrickson, W.A. and Teeter, M.M. (1981) *NATURE (London)*, 103-113
- Holland, D.R., Clancy, L.L., Muchmore, S.W., Ryde, T.J., Einspahr, H.M., Finzel, B.C., Heinrickson, R.L. and Watenpaugh, K.D. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 17649-17656
- Green, D.W., Ingram, V.M. and Perutz, M.F. (1958) *Proc. R. Soc. London Ser.* **225**, 287-307
- Kleywegt, G.J. & T.A. Jones (1996) *Structure* **4**, 1395-1400
- Lamzin, V., Wilson, K.S. (1993) *Acta Cryst.* **D49**, 129-147
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S. and Thornton, J.M. (1993) *J. Appl. Cryst.* **26**, 283-291
- Lee, W-H., da Silva Giotto, M.T., Marangoni, S., Toyama, M.H., Polikarpov, I. and Garratt, R. C. (2001) *Biochemistry* **40**, 28-36
- Lemke, C.T., Smith, G.D. and Howell, P.L. (2002) *Acta Cryst.* **D58**, 2096-2101
- Perrakis, A., Morris, R. and Lamzin, V. (1999) *Nature Structural Biology* **6**, 458-463

- Rossmann, M.G. and Bol, D.M. (1962) *Acta Cryst.* **15**, 24-31
- Selistre-de-Araujo, H.S., White, S.P. and Ownby, C.L. (1996) *Arch. Biochem. Biophys.* **326**, 21-30
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. (1997) *Nucleic Acids Research* **24**: 4876-4882
- Uson, I. and Sheldrick, G.M. (1999) *Curr. Op. Struct. Biol.* **9**, 643-648
- Vaguine, A.A., Richelle, J. and Wodak, S.J. (1999) *Acta Cryst.* **D55**, 191-205

ANÁLISES ESTRUTURAIS E DISCUSSÕES

Pela primeira vez, são observadas três diferentes formas cristalinas para uma Lys49-PLA₂, a partir de amostras de proteínas oriundas do mesmo lote de purificação. Apesar de duas das três formas terem sido cristalizadas exatamente sob as mesmas condições, estruturalmente as três apresentam diferenças marcantes, que podem auxiliar no entendimento de duas das questões mais pertinentes sobre esta classe de enzimas: a relação estrutura-função e a dependência ou não do efeito farmacológico com a atividade catalítica.

Inicialmente, neste capítulo, são descritos os modelos cristalográficos para cada uma dessas formas, com destaque para a descrição de regiões que são ditas estruturalmente importantes, e que principalmente são diferentes entre as formas. É então realizada uma comparação entre estas através de sobreposição estrutural, seguida de uma discussão sobre as diferenças mais marcantes, inferindo suposições sobre origens e efeitos das mesmas.

Através de comparações com Lys49-PLA₂ de outros organismos, por alinhamento seqüencial e novamente sobreposição estrutural, é feita uma discussão sobre o estado de oligomerização destas, analisando os diversos fatores que podem interferir nesta organização. E finalmente, é inferida uma correlação entre as mudanças conformacionais observadas em todas as estruturas, atividade

catalítica e efeitos farmacológicos para estas enzimas, reunindo diversas evidências experimentais, com uma proposta de um mecanismo em comum.

5.1 - DESCRIÇÃO DOS MODELOS CRISTALOGRAFICOS

5.1.1 - PRIMEIRA FORMA CRISTALINA

A estrutura cristalográfica da primeira forma cristalina da Miotoxina ACL é apresentada nas figuras 5.1.1.1 (a) (representação atômica) e 5.1.1.1 (b) (elementos de estrutura secundária). O monômero presente na unidade assimétrica possui o enovelamento clássico das fosfolipases A_2 (figura 1.2.2). Os principais elementos estruturais são a α -hélice N-terminal ($\alpha 1$), duas longas hélices antiparalelas ($\alpha 2$ e $\alpha 3$), a asa- β , o *loop* de ligação de cálcio (em azul) e o *loop* C-terminal (em verde escuro). No modelo cristalográfico final são encontrados uma molécula de ácido graxo, uma molécula de glicerol, um íon sulfato e 76 moléculas de água (figura 5.1.1.1) em complexo com a molécula protéica.

Fig. 5.1.1.1: Estrutura cristalográfica da primeira forma cristalina da Miotoxina ACL, em representações de átomos (a) e estruturas secundárias (b), com seus respectivos ligantes, indicando uma conservação das características estruturais mais importantes das Lys49-PLA₂. São indicados em azul o *loop* de ligação de cálcio e em verde-escuro o *loop* C-terminal.

A sequência de aminoácidos prevista para a Miotoxina ACL (figura 4.1.1.1) indica a presença de quatorze resíduos de cisteínas dentre os 121 totais. De fato, na estrutura protéica estes resíduos se arranjam em sete pontes dissulfeto, conferindo uma estabilidade muito grande para a enzima, formando uma estrutura compacta e, como esperado para fosfolipases A₂ classe II (quando comparada com a classe I), uma dessas pontes é formada entre as cisteínas 50 e 133 (figura 5.1.1.2).

Fig. 5.1.1.2: Padrão de pontes dissulfeto características das PLA₂, com destaque para a ponte entre Cys50 e Cys133, específica da classe II.

Como observado em outras estruturas de Lys49-PLA₂ (Holland *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 2001), o grupo ϵ -amino (N ζ) da lisina 49 ocupa a posição do íon cálcio, presente nas ativas Asp49-PLA₂. Este é coordenado por três pontes de hidrogênio com as carbonilas da cadeia principal dos resíduos Asn28 (2,77 Å), Gly30 (2,74 Å) e Gly32 (3,41 Å) e com uma molécula de água, W1 (2,92 Å), como mostrado na figura 5.1.1.3. A presença de uma molécula de água nesta mesma posição já foi observada na estrutura cristalográfica da PrTX-II (referencia), fazendo parte da mesma interação. As coordenações do N ζ da Lys49 com a cadeia principal são as mesmas para o íon Ca²⁺ nas Asp49-PLA₂.

Fig. 5.1.1.3: Coordenações da Lys49 na primeira forma cristalina da Miotoxina ACL. As interações deste resíduo com a cadeia principal são as mesmas observadas para o íon Ca²⁺ nas Asp49-PLA₂.

A característica mais marcante dessa forma cristalina é a presença de uma molécula de ácido graxo livre, modelada dentro do sítio ativo durante o refinamento da estrutura, de acordo com a geometria de uma densidade eletrônica de características não protéicas (figura 4.1.2.2). Em nenhum momento durante o processo de purificação e cristalização da proteína tal composto foi adicionado, sendo este indiscutivelmente proveniente do organismo fonte.

No modelo final, ambos oxigênios do grupo carboxílico interagem com uma molécula de água, W69 (figura 5.1.1.4), através de pontes de hidrogênio de comprimentos 2,93 Å (O1) e 2,62 Å (O2). O oxigênio O2 está fortemente ligado ao grupo amida da cadeia principal do resíduo Gly30 (2,80 Å) e ainda interage fracamente com o enxofre S γ da cistina 45 (3,15 Å). O outro oxigênio da cabeça polar também interage com o oxigênio O2 de uma molécula de glicerol (3,12 Å), oriunda da solução crioprotetora. A água que participa da coordenação com o ácido graxo é fortemente conservada tanto nas outras Lys49-PLA₂, como também nas Asp49-PLA₂, fazendo parte da chamada tríade catalítica, composta ainda pelos também conservados His48 e Asp99 (figuras 5.1.1.4 e 4.1.1.1). A molécula de glicerol presente na região de acesso ao canal faz contatos com o oxigênio O2 do ácido graxo, como descrito acima, e ainda interage com o oxigênio da carbonila da Gly30 (3,09 Å). Como consequência destas interações, o O2 do glicerol se encontra a uma distância de 3,12 Å do carbono δ 2 da Leu5 (fig. 5.1.1.4). Nesta mesma região, a estrutura da Piratoxina-II (PrTX-II, PDBID 1QLL, Lee *et al.*, 2001) possui uma grande quantidade de moléculas de água.

A cauda de hidrocarbonetos do ácido graxo se estende através de todo canal hidrofóbico até a superfície da proteína. Foi modelada uma cauda hidrofóbica com 12 carbonos, embora uma fraca densidade eletrônica seja

observada nas proximidades da entrada do canal hidrofóbico, sugerindo a presença de uma cauda ainda maior, com grande flexibilidade em sua extremidade, provavelmente por falta de contatos com a molécula protéica. De acordo com o tamanho da cauda hidrofóbica e da aparente ausência de ligações insaturadas ao longo desta, o ligante modelado foi caracterizado como um ácido láurico (12:0), também conhecido como ácido dodecanóico. Duas outras estruturas cristalográficas de Lys49-PLA₂ já foram determinadas com ácidos graxos complexados. Na estrutura Piratoxina-II, Lee e colaboradores identificaram este como sendo uma molécula de ácido mirístico (14:0) e no caso da enzima extraída da serpente *Bothrops nummifer* (de Azevedo *et al.*, 1999), foi identificado uma molécula de ácido palmítico (16:0).

A porção apolar do ácido graxo faz contatos hidrofóbicos com os resíduos Leu2, Leu5 (característica das Lys49), Gly6, Ile9, Ala18, Ile19 e Tyr22. Estes contatos também estão presentes na estrutura da PrTX-II (com exceção da Leu2 e Ile19) e são consistentes com outros já observados para a posição *sn*-2 de fosfolipídios, em estruturas cristalinas de complexos com análogos do substrato e do estado de transição (Lee *et al.*, 2001; White *et al.*, 1990; Scott *et al.*, 1990; Scott *et al.*, 1991; Thunnissen *et al.*, 1990).

Fig. 5.1.1.4: Ilustração das moléculas de ácido graxo e glicerol, presentes na primeira forma cristalina da Miotoxina ACL, e suas respectivas coordenações.

Outra forte densidade eletrônica foi observada, nas proximidades do *loop* de ligação de cálcio, e interpretada de acordo com a forma e tamanho como sendo uma contribuição de um íon sulfato, presente no meio de cristalização e provavelmente co-cristalizado junto com a proteína (figura 5.1.1.5). Este se encontra coordenado através de ligações de hidrogênio com as cadeias laterais dos resíduos His33, Arg34 e Lys53. A falta de resolução do conjunto de dados impossibilitou a determinação da orientação correta dos oxigênios, sendo então modelados de maneira a se maximizar o número de contatos com a molécula protéica.

No modelo proposto, o oxigênio O1 do íon faz ligação de hidrogênio com o N δ 1 da His33 (2,85 Å), o oxigênio O2 interage com o N ζ da Lys53 (2,37 Å) e com os N η 2 e N ϵ do grupo guanidínico da Arg34 (3,09 Å e 3,24 Å, respectivamente), o oxigênio O3 é coordenado pelo grupo amida da Arg34 (3,42 Å) e o oxigênio O4 faz ponte com o N ϵ da Arg34 (3,26 Å), como ilustrado na figura 5.1.1.5. Ambos os resíduos Lys53 e Arg34, foram identificados como presentes e totalmente conservados apenas em Lys49-PLA₂, segundo Ward e colaboradores (Ward *et al.*, 1998).

Fig. 5.1.1.5: Íon sulfato, proveniente da condição de cristalização, localizado próximo ao *loop* de ligação de cálcio, sendo coordenado pelos nitrogênios das cadeias laterais dos resíduos His33, Arg34 e Lys53.

A molécula usada como modelo na substituição molecular para esta forma cristalina da Miotoxina ACL, a Lys49-PLA₂ da serpente *A. p. piscivorus* (PDBID 1PPA, Holland *et al.*, 1990) não apresenta tais ligantes (ácido graxo, íon sulfato e glicerol) em sua estrutura cristalográfica, assumindo uma conformação alternativa para os *loops* de ligação de cálcio e C-terminal. Estas regiões são espacialmente próximas (figura 5.1.1.6) e merecem uma descrição mais completa, pois outras conformações têm sido observadas em outras estruturas cristalográficas, favorecendo ou não a presença de ligantes (Holland *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 2001).

Na primeira forma cristalina da Miotoxina ACL, mesmo com a limitada qualidade do conjunto de dados, foi possível, de maneira não ambígua, se identificar todo o traçado da cadeia principal, bem como para a maioria das cadeias laterais nestas duas regiões, que são basicamente constituídas por resíduos polares. A análise dos contatos entre estas indica a presença de quatro pontes de hidrogênio, além de duas pontes dissulfeto características. Essas ligações estão indicadas na figura 5.1.1.6, começando com a ponte de hidrogênio entre o nitrogênio N η 1 da Arg34 com o oxigênio O da carbonila da Glu131 (2,84 Å).

Também fazem contatos o nitrogênio do grupo amida da Gln36 com o oxigênio da cadeia principal da Lys128 (3,09 Å), o oxigênio O da Tyr120 com o nitrogênio N da Lys122 (2,99 Å), e por último o nitrogênio N ζ da cadeia lateral ainda da Lys122 com o oxigênio O da carbonila da Gly29 (2,83 Å). As duas pontes dissulfeto são feitas entre os resíduos Cys27 e Cys126 e entre as Cys50 e Cys133 (figura 5.1.1.6).

Fig. 5.1.1.6: Contatos entre C-terminal e loop de ligação de Ca^{2+} , para a forma I da Miotoxina ACL. São observadas quatro pontes de hidrogênio (pontilhados em amarelo) entre essas regiões, limitando a flexibilidade do C-terminal.

Comparações entre diversas PLA_2 , tanto ativas como “inativas”, têm sugerido a Lys122 como responsável pelo aumento da afinidade das Lys49- PLA_2 por ácidos graxos (Lee *et al.*, 2001). Sua interação como a carbonila da cadeia principal do resíduo Cys29 através de uma ponte de hidrogênio, como mostrado acima, é dita como responsável pela hiperpolarização da ligação peptídica entre os resíduos 29 e 30, expondo o nitrogênio dessa ligação ao sítio ativo e aumentando a afinidade pela porção carboxílica do ácido graxo, impedindo sua soltura. Dessa maneira a forte ligação com o ácido graxo poderá servir como âncora para segurar a toxina presa a membrana, facilitando assim a ação patológica. Essa sequência de

coordenações, primeiramente descritas para a PrTX-II (Lee *et al.*, 2001), também é observada na estrutura da forma I da Miotoxina ACL. Como consequência desse arranjo, as cadeias laterais das fenilalaninas 121 e 124 (que fazem parte do loop C-terminal) ficam expostas ao solvente, criando uma superfície altamente hidrofóbica (denominado aqui de “calo” hidrofóbico) em contato com o solvente no C-terminal, como mostrado através da superfície de van der Waals para esta região, na figura 5.1.1.7. Na estrutura da PrTX-II também ocorre esta exposição de resíduos hidrofóbicos, envolvendo uma fenilalanina, uma leucina e uma prolina. A exposição de uma região hidrofóbica na superfície de uma proteína solúvel é incomum, sugerindo que esta deve estar interagindo com a membrana durante o ataque pela enzima, como discutindo posteriormente. Observa-se também uma grande quantidade de cargas ao redor do “calo”, tanto positivas como negativas.

Fig. 5.1.1.7: Exposição de resíduos hidrofóbicos, mostrada através da superfície de van der Waals, em contato com o solvente, devido à interação da Lys122 com o *loop* de ligação de cálcio. Observa-se ao redor deste “calo” hidrofóbico uma grande quantidade de cargas positivas e negativas. A região azul representa contribuição dos nitrogênios, os oxigênios estão em vermelho e em branco estão os carbonos.

5.1.2 - SEGUNDA FORMA CRISTALINA

Basicamente, o modelo cristalográfico para a forma II da Miotoxina ACL apresenta as mesmas características presentes na primeira forma cristalina, quando

analisadas apenas regiões de estrutura secundária (que são naturalmente muito conservadas nas PLA₂) e suas cadeias laterais, assim como é mantido o padrão de pontes dissulfeto. Já a análise de regiões mais flexíveis, como as proximidades do sítio ativo (*loops* de ligação de cálcio e C-terminal), mostra conformação ligeiramente diferente para a cadeia principal, mas com grandes variações em suas cadeias laterais.

Na estrutura final da segunda forma não se observa a presença de ligantes, como o ácido graxo e o glicerol, presentes na forma I, a menos de um íon sulfato, novamente dito como proveniente do ambiente de cristalização, mas agora fazendo outras interações, ocupando nova posição, além de 152 moléculas de água. A interação deste íon com a proteína agora se dá, em parte, com a Lys49, que por sua vez também sofre mudanças em suas coordenações, mas mantém a mesma conformação.

A molécula de água, W1, mostrada na figura 5.1.1.3, como interagindo com a Lys49 não é mais observada nesta forma, cuja posição agora é ocupada pelo grupo imidazólico da His33. A ponte de hidrogênio do N ϵ com o oxigênio da carbonila da Gly32 é substituída pela carbonila da His33 (3,01 Å). Duas novas coordenações são observadas com o íon sulfato, que agora ocupa uma posição mais próxima da região de acesso do sítio ativo, não mais interagindo com o N δ 1 da His33, mas sim com o N ϵ da Arg34 (através do O4, a 3,23 Å). O oxigênio O1 do íon está ligado à hidroxila da Tyr52 (3,03 Å), enquanto o O2 se encontra livre. Na posição O3, existem coordenações com o N da cadeia principal da Gly32 (2,63 Å) e com o N ϵ da Lys49 (3,19 Å). E além da Arg34, o oxigênio na posição 4 faz pontes com N ϵ da Lys49 (2,62 Å) e com o N ϵ da Lys53 (3,20 Å). Como consequência desta conformação, o oxigênio O1 do íon faz contato com o C ϵ da

Lys53 (3,13 Å) e o O4 faz contato com o também Cε da Lys49 (3,06 Å). Todos os contatos descritos acima são mostrados na figura 5.1.2.1.

Fig. 5.1.2. 1: Região próxima ao *loop* de ligação de cálcio, mostrando a localização da Lys49 e o íon sulfato, com suas coordenações. Nesta conformação, a His33 impede a presença da água que faz parte da coordenação da Lys49, como observado na forma I.

Quando comparadas as posições dos íons nas formas I e II, observa-se um deslocamento de aproximadamente 6 Å, estando agora, na forma II, mais próximo do sítio ativo. Além do mais, a mudança drástica na His33 faz com que a região de ligação do íon na forma I não esteja mais disponível na segunda forma. Além do mais o anel imidazólico dessa mesma histidina impede agora que a Lys122 faça coordenação com a Cys29. Nesta forma, o Trp31 fecha a entrada do sítio ativo, de maneira que não seria possível de se encontrar o ácido graxo dentro do canal.

Ao contrario da primeira forma cristalina, houve uma certa dificuldade na construção da região C-terminal da forma II, mesmo com uma melhora significativa na resolução dos dados (1,8 Å). Apesar de uma razoável correlação do modelo com a densidade eletrônica na cadeia principal, fracas densidades estavam presentes para a maioria das cadeias laterais dos resíduos de lisina nesta região. Isto pode ser consequência da alta mobilidade do C-terminal, devido ao número reduzido de interações com o *loop* de ligação de cálcio. A análise das

interações indica a presença de apenas uma ponte de hidrogênio realizada entre estas regiões, mais precisamente entre o O da carbonila da Lys128 com o nitrogênio do grupo amida da Gln36 (3,05 Å). Outra ponte realizada nesta região é formada por dois resíduos do C-terminal, a Tyr120 (O) e a Phe124 (N), que estão a 2,97 Å de distância (figura 5.1.2.2), formando uma volta- β do tipo I. Como esperado as pontes dissulfeto características são conservadas.

Neste modelo, a cadeia lateral da Lys122 se encontra voltada para o solvente, não havendo polarização da ligação peptídica Cys29-Gly30, diminuindo a afinidade pela cabeça polar do ácido graxo, ausente nesta estrutura. Neste modelo, as conformações destas regiões são equivalentes às encontradas na estrutura da Lys49-PLA₂ da serpente *A. p. piscivorus* (1PPA), cujo modelo cristalográfico não apresenta ácido graxo ligado ao sítio ativo.

Fig. 5.1.2.2: Interações entre *loop* de ligação de cálcio e C-terminal na segunda forma cristalina da Miotoxina ACL. Observa-se apenas uma ponte de hidrogênio (Gln36 e Lys128) entre essas regiões, uma volta- β (Tyr120 e Phe124) além das pontes dissulfeto características.

A porção hidrofóbica em contato com o solvente presente na primeira forma cristalina (“calo” hidrofóbico, formado pelas Phe121 e Phe124) agora não é observada, com a Lys122 ocupando o lugar da Phe124 e atribuindo um caráter

polar nessa região (figura 5.1.2.3). Esta fenilalanina por sua vez, esta voltada para o interior da proteína.

Fig. 5.1.2.3: Superfície de van der Waals mostrando a ausência do “calo” hidrofóbico para a forma II, cuja posição da Phe124 agora é ocupada pela Lys122. A região azul representa contribuição dos nitrogênios, os oxigênios estão em vermelho e em branco estão os carbonos. Esta orientação do “calo” é a mesma da figura 5.1.1.7.

5.1.3 - TERCEIRA FORMA CRISTALINA

As diferentes conformações assumidas pelas regiões mais flexíveis da Miotoxina ACL na forma III, quando comparadas com as formas I e II, novamente desfavorecem a presença de ácido graxo no sítio ativo, devido à grande distância entre o *loop* de ligação de cálcio e o C-terminal, resultando em poucas e fracas interações entre estes. É a primeira que um padrão de conformações como este é observado para a mesma Lys49-PLA₂.

Nesta forma é encontrado novamente apenas um íon sulfato coordenando com a proteína, em região equivalente à forma II, fazendo contatos com a Lys49. As coordenações que seguram este íon são descritas a seguir, juntamente com o ambiente que cerca a Lys49 e estão apresentadas na figura 5.1.3.1. Novamente o anel imidazólico da His33 ocupa a posição da W1, mostrada na figura 5.1.3.1. O padrão de ligações de hidrogênio da Lys49 com a cadeia principal do *loop* de ligação de cálcio é mantido em relação à forma II. As distâncias do N ϵ da dessa

lisina com os carbonos da cadeia principal dos resíduos Gln28, Gly30 e His33, são respectivamente 3,03 Å, 2,56 Å e 2,95 Å. Esse nitrogênio ainda interage com os oxigênios O2 e O4 do íon sulfato, a distâncias de 2,91 Å e 3,10 Å, nessa ordem. O íon por sua vez, além dos contatos com a cadeia lateral da lisina, por ocupar uma posição equivalente à forma II, faz preso também por contatos através do O2 com o N ϵ da Lys53 (2,88 Å) e o N ϵ da Arg34 (3,12 Å). O oxigênio O3 está ligado também a este último nitrogênio (a 2,99 Å) e ao N ϵ ainda da Arg34 (3,19 Å). Há ainda mais uma interação, do O4 com o N do grupo amida da Gly32 a uma distância de 2,87 Å. O oxigênio O1 do íon se encontra livre, como na forma II (onde o O2 do íon se encontra livre, mas isso é apenas uma questão de nomenclatura). Novamente, como descrito para a forma II, a His33 impede a ocupação da água que coordena com a Lys49 na forma I, e também impede a coordenação da Lys122 com o *loop* de ligação de Ca²⁺.

Fig. 5.1.3.1: Coordenações da Lys49 e do íon sulfato para a terceira forma cristalina da Miotoxina ACL. São conservados os mesmos contatos observados na forma II.

Com relação aos contatos realizados entre o C-terminal e o *loop* de ligação de cálcio, esta forma apresenta mais uma diferença em relação às anteriores. Nas formas I e II, a Lys118, através do oxigênio da carbonila faz ponte de hidrogênio

com o O γ da Ser24 (a 2,63 Å e 2,70 Å, respectivamente) e o oxigênio da carbonila desta serina faz ponte com N da Tyr120 (3,02 Å na forma I e 3,21 Å na forma II). Na terceira forma cristalina, o O γ da Ser24 interage com a His33, do *loop* de ligação de cálcio, através do Ne2, a uma distancia de 2,93 Å. Dessa maneira, o O γ da Ser24 se apresenta apontando para o lado oposto em relação às duas primeiras formas e a ponte entre a cadeia principal desta serina com a Tyr120 não é satisfeita. Nesta forma cristalina, o oxigênio O da carbonila da Ala119 por sua vez, interage com o nitrogênio N da Lys122 (3,03 Å), formando uma nova volta- β do tipo I. Nesta forma não é mais observada esta volta entre os resíduos Tyr120 e Phe124, como na forma II. Novamente observa-se a presença da ponte de hidrogênio entre O da carbonila da Lys128 com o nitrogênio do grupo amida da Gln36 (3,11 Å).

Fig. 5.1.3.2: Contatos entre C-terminal e o *loop* de ligação de cálcio para a forma III da Miotoxina ACL. Assim como na forma II é encontrada apenas uma ponte de hidrogênio entre essas duas regiões (Gln36 e Lys128). Ocorre também a formação de uma volta- β entre os resíduos Ala119 e Lys122.

Por esses motivos, o anel aromático da Phe124 nesta última forma ocupa equivalente à posição do anel da Tyr120 nas formas I e II, mudando novamente o caráter do observado “calo” hidrofóbico, formado pelas fenilalaninas 121 e 124 na forma I e perdido na forma II pela substituição da Phe124 pela Lys122. Nesta

última forma esse “calo” é formado pela Tyr120 e Phe121, como mostrado na figura 5.1.3.3. A importância da exposição desta porção hidrofóbica será discutida em seção posterior.

Fig. 5.1.3.3: Superfície de van der Waals da região onde deveria se encontrar o “calo” hidrofóbico, mas na forma III a Phe124 dá lugar à Tyr120, desfazendo o caráter apolar dessa região. A região azul representa contribuição dos nitrogênicos, os oxigênicos estão em vermelho, em branco estão os carbonos e a área laranjada é contribuição do enxofre. A orientação da figura é mantida em relação às figuras 5.1.1.7 e 5.1.2.3.

Em todas as três formas descritas até aqui, as diferenças estruturais só vão até o resíduo na posição 126, ocupada por uma cisteína, que por sua vez faz ponte dissulfeto com a Cys27. Esta ponte deve ser conservada em todas as Lys49-PLA₂ e limita a flexibilidade da região posterior, pois apenas cinco resíduos à frente, se encontra a Cys133, novamente prendendo a cadeia, realizando ponte dissulfeto com a Cys50. Ou seja, a conformação da região entre a Cys126 e a Cys133 é bastante conservada nas três formas.

5.2 - ANÁLISE CONJUNTA DAS VARIAÇÕES ESTRUTURAIS

As diferenças conformacionais entre as três formas ficam evidentes quando estas são comparadas através da sobreposição estrutural. A análise dos desvios médios quadráticos por resíduo (r.m.s.), obtidos pelo programa O

(Kleywegt *et al.*, 1996), quando as formas II e III são comparadas com a forma I, indicam grandes mudanças nas regiões do *loop* de ligação de cálcio e no C-terminal.

Fig. 5.2.1: Desvio quadrático médio dos Ca por resíduo, resultante da sobreposição estrutural das formas II e III em relação à forma I da Miotoxina ACL. Em destaque estão as regiões do *loop* de ligação e do C-terminal, onde são encontradas as diferenças estruturais mais marcantes.

As conformações descritas para as formas I e II já haviam sido observadas anteriormente em outras Lys49-PLA₂, tanto para estruturas complexadas com ácido graxo (Lee *et al.*, 2001) como para estruturas “livres” (Holland *et al.*, 1990). Já a terceira forma cristalina apresenta uma conformação alternativa, mais aberta, com relação às distancias entre o *loop* de ligação de cálcio e C-terminal (com grandes valores de desvio entre posições de átomo equivalentes), como mostrado nas figuras 5.2.2 (traçado de carbonos Cα) e 5.2.3 (modelo de átomos).

Fig. 5.2.2: Sobreposição estrutural entre os Ca das três forma da Miotoxina ACL ilustrando as principais diferenças estruturais nas regiões dos *loops* de ligação de cálcio e C-terminal (circundadas em verde). Nota-se também uma grande conservação para todo o restante das moléculas.

Fig. 5.2.3: Sobreposição equivalente à mostrada na figura anterior, agora ilustrando a enorme variação conformacional também das cadeias laterais para os *loops* C-terminal e de ligação de cálcio. Um aspecto importante e que pode ser visualizado acima é a grande variação na posição de cadeia lateral do Trp31 (destaque em verde escuro), ora facilitando a entrada ao sítio ativo (em branco na forma I e em azul na forma III), ora entupindo a entrada do mesmo (em salmão na forma II). Nesta figura são mostradas também as posições dos ligantes nas três formas, como por exemplo, a molécula de ácido graxo (em verde claro) e de glicerol (em amarelo).

A presença dos íons sulfatos em posições equivalentes nas formas II e III sugere uma posição preferencial para a ligação do grupo fosfato da molécula de fosfolipídio, uma vez que estes são grupos quimicamente equivalentes. A sobreposição estrutural destas duas formas, juntamente com um modelo de Asp49-PLA₂ em complexo com o análogo do estado de transição (PDBID 1POB, White *et al.*, 1990) reforça esta hipótese (figura 5.2.4), uma vez que os sulfatos ocupam posições equivalentes ao grupo fosfato do análogo. Próximo a esses íons são observadas mudanças nas conformações dos resíduos Tyr52, Lys53 e His68 (como será mostrado adiante). Estas podem ser relacionadas com a posição do íon, coordenado na forma I pela Lys53 em posição diferente das formas II e III, que afeta as orientações das cadeias laterais da Tyr52 e His68.

Fig. 5.2.4: Sobreposição estrutural entre as formas II e III da Miotoxina ACL, com a estrutura de uma Asp49-PLA₂ em complexo com o análogo do estado de transição (PDBID 1POB), indicando as equivalências entre as posições dos íons sulfato na Miotoxina ACL e do grupo fosfato do fosfolipídio.

Já a presença do íon sulfato na forma I é atribuída como consequência da indução de um ambiente químico favorável, com fortes cargas positivas (figura 5.1.1.5), devido às mudanças conformacionais causadas pela presença do ácido graxo no sítio ativo, ou seja, esta posição não deve ser relevante ao processo catalítico.

5.3 - COMPARAÇÃO ESTRUTURAL COM OUTRAS Lys49-PLA₂

Até a data de realização deste trabalho, apenas cinco estruturas de Lys49-PLA₂ determinadas por difração de raios X estavam disponíveis no banco de dados PDB (Berman *et al.*, 2000). Estas são apresentadas de acordo com o seu código identificador dentro deste, e com seus sinônimos, quando existentes. São elas: 1PPA (*Agkistrodon piscivorus piscivorus*, Holland *et al.*, 1990), 1CLP ou Miotoxina II (*Bothrops asper*, Ward *et al.*, 1998), 1GOD ou GodMT-II (*Bothrops (Cerrophidion) godmani*, Arni *et al.*, 1999), 1QLL ou Piratoxina-II ou PrTX-II (*Bothrops pirajai*, Lee *et al.*, 2001) e 1MG6 (*Deinagkistrodon acutus*, Huang *et al.*, não publicado). Foram usadas também duas estruturas cristalográficas da BthTX-I (*Bothrops jararacussu*, da Silva Giotto *et al.*, 1998), não depositadas no banco de dados, mas gentilmente cedidas pela Dra. Maria Teresa da Silva Giotto (aqui, chamada de BthTX-IA) e pelo Prof. Dr. Raghuvir K. Arni (chamada de BthTX-IB). Existem também referências de enzimas dessa classe que foram resolvidas e não depositadas, como é o caso das Lys49-PLA₂ extraídas das serpentes *Bothrops nummifer* (que ainda possui um ácido graxo preso no sítio ativo, de Azevedo *et al.*, 1999) e da Piratoxina-I (de Azevedo Jr. *et al.*, 1998). No caso da Lys49-PLA₂ extraída da serpente *Bothrops neuwied pauloensis* (BnSP-7, Soares *et al.*, 2000), apenas a sequência primária se encontra disponível no banco de dados NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), mas estudos estruturais e funcionais com essa enzima, equivalentes aos abordados nessa dissertação, foram realizados (Soares *et al.*, 2000). Quatro das estruturas citadas acima apresentam um dímero na unidade assimétrica (1CLP, 1QLL, BthTX-IA e BthTX-IB) e as restantes se empacotam como monômeros.

Uma primeira análise foi feita a partir da identidade sequencial entre estas. Para isto um alinhamento foi realizado através do programa CLUSTALX (Thompson *et al.*, 1994). O resultado se encontra na figura a seguir (fig. 5.3.1).

		1	10	21	30	40	50
							
Miotoxina ACL	1	SLLELGKMILOETGKN	AITSYG	SYGCNCGW	GHGQPK	DATDRCCFVHKCC	
1PPA	1	SVLELGKMILOETGKN	AITSYG	SYGCNCGW	GHGQPK	DATDRCCFVHKCC	
1CLP	1	SLFELGKMILOETGKN	PAKSYG	AYGCNCGV	LGRGPK	DATDRCCYVHKCC	
1QLL	1	SLFELGKMILOETGKN	PAKSYG	AYGCNCGV	LGRGPK	DATDRCCYVHKCC	
Piratoxina-I	1	SLFELGKMILOETGKN	PAKSYG	AYGCNCGV	LGRGPK	DATDRCCYVHKCC	
1GOD	1	SMYQLWKMILOETGKN	AVPSYGL	YGCNCGV	SRGKPK	DATDRCCFVHKCC	
BthTX-I	1	SLFELGKMILOETGKN	PAKSYG	AYGCNCGV	LGRGPK	DATDRCCYVHKCC	
BnSP-7	1	--FELGKMILOETGKN	PAKSYG	AYGCNCGV	LGRGQPK	DATDRCCYVHKCC	
1MG6	1	SLFELGKMIWQETGKN	PVKNYGL	YGCNCGV	GRGEPL	DATDRCCFVHKCC	
		61	70	80	90	100	110
							
Miotoxina ACL		YKKLTDCNHKTDRYS	YSWKNKAI	ICEEKNPCL	KEMCECDK	AVAI	CLREN
1PPA		YKKLTDCNHKTDRYS	YSWKNKAI	ICEEKNPCL	KEMCECDK	AVAI	CLREN
1CLP		YKKLTGCNPKKDRYS	YSWKDKTIV	CGENNSCL	KELCECDK	AVAI	CLREN
1QLL		YKKLTGCNPKKDRYS	YSWKDKTIV	CGENNPCL	KELCECDK	AVAI	CLREN
Piratoxina-I		YKKLTGCNPKKDRYS	YSWKDKTIV	CGENNPCL	KELCECDK	AVAI	CLREN
1GOD		YKKLTDCSPKTDYS	YSWKDKTIV	CGDNNPCL	QEMCECDK	AVAI	CLREN
BthTX-I		YKKLTGCNPKKDRYS	YSWKDKTIV	CGENNPCL	KELCECDK	AVAI	CLREN
BnSP-7		YKKLTGCDPKKDRYS	YSWKDKTIV	CGENNPCL	XELCECDK	AVAI	CLREN
1MG6		YKKLTDCDSKKDRYS	YKWNKAIV	CGKNQPC	MQEMCECDK	AFAI	CLREN
		120	130				
							
Miotoxina ACL		DTYNKKYKAYF	PFCKK	-PETC			
1PPA		DTYNKKYKAYF	PLCKK	-PDTC			
1CLP		NTYNKKYRYYL	PLCKK	-ADAC			
1QLL		GTYNKKYRYHL	PFCKK	-ADKC			
Piratoxina-I		GTYNKLYRYHL	PFCKK	-ADDC			
1GOD		DTYNKNYKIYP	PLCKK	-ADAC			
BthTX-I		GTYNKKYRYHL	PFCKK	-ADPC			
BnSP-7		GTYNKKYRYHL	PFCKK	-ADPC			
1MG6		DTYNKSFRYHL	PSCKKT	SEQC			

Fig. 5.3.1: Alinhamento sequencial entre as Lys49-PLA2 envolvidas na discussão deste trabalho. Em cinza estão destacados os resíduos totalmente conservados, em verde estão os resíduos envolvidos na dimerização, em rosa estão dois resíduos que junto com uma molécula de água formam a tríade catalítica e em vermelho estão as Lys49 e Lys122.

Observa-se pelo alinhamento acima, que existe uma grande identidade entre essas enzimas, onde são conservados todos os resíduos descritos como estruturalmente importantes como a Lys49 (destaque em amarelo), a His48 e o Asp99 (em magenta), a Lys122 (em vermelho) e os resíduos envolvidos na

organização da estrutura quaternária das Lys49-PLA₂, como será descrito adiante (em verde).

Quando são comparadas as estruturas disponíveis destas enzimas, nota-se que há uma distribuição entre dois estados, referentes a conformações no C-terminal e no *loop* de ligação de cálcio, equivalentes aos encontrados nas formas I e II da Miotoxina ACL. Nesta comparação, moléculas equivalentes por operações de simetria não-cristalográfica, como no caso dos dímeros da Piratoxina-II, BthTX-IA e BthTX-IB, são tratadas como formas independentes, apresentando em alguns casos, conformações. Dessa maneira, são sobrepostas 14 estruturas de Lys49-PLA₂, como mostrado na figura 5.3.2, onde são sobrepostos os Ca.

Fig. 5.3.2: Sobreposição de todas as estruturas de Lys49-PLA₂ disponíveis, indicando variações conformacionais dos *loops* de ligação de Ca²⁺ e C-terminal. Três dentre as quatorze estruturas sobrepostas apresentam ácido graxo dentro do sítio ativo e conformação equivalente à mostrada em vermelho. As outras conformações observadas são características de moléculas livres de ácido graxo, o que confere flexibilidade aos *loops*.

Além da forma I, mais oito estruturas apresentam o mesmo traçado da cadeia principal (em vermelho, na figura 5.3.2), e também uma grande equivalência em posições de cadeias laterais, com destaque para a Lys122, apontando para o *loop* do cálcio (as cadeias A e B da Miotoxina II, Piratoxina-II e

BthTX-IB, os monômeros da 1MG6 e da forma I da Miotoxina ACL e a cadeia A da BthTX-IA), como mostrado na figura 5.1.1.6, para a primeira forma cristalina da Miotoxina ACL. Apesar disso, apenas esta última, mais as cadeias A e B da Piratoxina-II apresentam uma molécula de ácido graxo presente no sítio ativo. Nas outras, este mesmo se encontra vazio. Dentro do canal hidrofóbico, na estrutura da 1MG6, existe uma fenilalanina substituindo a conservada Val102, onde o anel aromático ocupa uma posição quase equivalente á uma suposta cabeça polar do ácido graxo, quando comparada com a forma I (menos que 1,60 Å), provavelmente inviabilizando a presença do ácido graxo por impedimento estereoquímico. Os contatos entre o C-terminal e o *loop* de ligação de cálcio são os mesmo em todas estas moléculas.

Ainda na mesma figura, todos em conformações diferentes, são mostrados os traçados dos Ca para as estruturas da forma II da Miotoxina ACL e da 1PPA (em branco), para a GodMT-II (em azul), para a cadeia B da BthTX-IA (em amarelo) e para a forma III da Miotoxina ACL (em verde). Todas essas apresentam o sítio ativo livre, com diferentes conformações para a Lys122 (sempre voltada para o solvente).

A quantidade de dados disponíveis não permite suposições sobre uma sequência de estados conformacionais, mas o fato de se observar cinco conformações bem distintas para estruturas livres, e apenas uma para o complexo ácido graxo:proteína, sugere que não deva existir uma conformação preferencial quando o sítio se encontra vazio. Mas, para o produto da catálise ser mantido preso no sítio ativo, um arranjo igual ao da forma I é aparentemente exigido. Essa suposição é reforçada pela fraca presença de densidade eletrônica observada nos dados cristalográficos durante a construção dos dois últimos modelos (de fato,

faltam mais átomos no modelo final das formas II e III para a região C-terminal, quando comparados com a primeira forma). A forma I apresenta uma estrutura mais rígida (mesmo com altos fatores de temperatura, devido à qualidade do cristal) graças à forte interação entre a Lys122 (C-terminal) e a ligação peptídica Cys29-Gly30 (Ca^{2+} loop), responsável pela prisão do ácido graxo, assim como às outras interações entre essas regiões, descritas no início do capítulo.

Outra característica observada na sobreposição estrutural é a formação do “calo” hidrofóbico em todas as formas que apresentam a conformação destacada em vermelho. De fato, ocorre a conservação total de resíduos hidrofóbicos nas posições 121 e 124 em todas as seqüências analisadas. Esse padrão (juntamente com a conservação de resíduos carregados positivamente no C-terminal) foi observado e descrito pela primeira vez por Francis e colaboradores (Francis *et al.*, 1991).

Outras comparações locais sugerem que as mudanças conformacionais observadas na Lys53 entre as formas I, II e III da Miotoxina ACL, podem ser atribuídas à posição do íon sulfato, como proposto anteriormente, onde uma vez comparado com todas as outras estruturas, este resíduo assume a mesma conformação que na forma I, do restante da molécula. Nas formas II e III, a conformação alternativa é assumida, ajudando a coordenar o íon na região proposta com sítio de ligação do grupo fosfato do fosfolípido (figura 5.2.4). Este fato reforça a suposição da presença casual do íon na primeira forma. Como consequência desta conformação alternativa, o grupo aromático da Tyr52 assume um outro rotâmero, empurrando a cadeia lateral da His68 (presente apenas na Miotoxina ACL e 1PPA), ilustrado na figura 5.3.3.

Fig. 5.3.3: Mudanças conformacionais observadas nas formas II e III da Miotoxina ACL (em verde), devido à presença dos íons sulfato, com relação à outras estruturas que se encontram livres desse íon.

5.4 - DÍMERO VERSUS MONÔMERO

A questão envolvendo a estrutura quaternária das Lys49-PLA₂ e a sua relevância biológica ainda é bastante discutida, onde tentativas de se propor uma correlação são dificultadas por divergências de resultados tanto em estudos cristalográficos como em solução. A unidade assimétrica da primeira estrutura cristalina de uma enzima dessa classe, a 1PPA, indicava a presença de apenas uma molécula. Subseqüentemente, Ward e colaboradores (Ward *et al.*, 1998) propuseram um modelo de dimerização a partir da estrutura da Miotoxina II (1CLP, figura 5.4.1(a)), para duas moléculas relacionadas por um eixo de simetria não-cristalográfico de ordem dois, onde a interface de dimerização seria formada pelos resíduos Gln11, Glu12, Trp77 e Lys80, a partir da interação entre asas- β . Este empacotamento, assim como as respectivas interações, através de pontes salinas e de hidrogênio, são ilustrados nas figura 5.4.1 (a) e (b).

Fig. 5.4.1: Modelo de dimerização proposto por Ward e colaboradores, envolvendo interações entre as asas- β dos dois monômeros, como observado para a estrutura da Miotoxina II (a). Em (b) são mostrados os contatos entre os resíduos da interface de dimerização (Gln11, Glu12, Trp77 e Lys80).

As estruturas da BthTX-I e a Piratoxina-II apresentam exatamente os mesmos tipos de contato descritos acima. Esta última ainda tem presente em seu sítio ativo uma molécula de ácido graxo, descrita como produto de uma catálise interrompida. Interessantemente dados recentes sugerem que danos a membranas causados pela miotoxina BthTx-I são consequência da organização dimérica da enzima por Oliveira e colaboradores (de Oliveira *et al.*, 2001).

No referido trabalho, através de uma combinação de técnicas de fluorescência e *cross-linking*, foi examinado o efeito do pH sobre o equilíbrio monômero-dímero da BthTX-I (da Silva Giotto *et al.*, 1998), que contém em sua sequência um único resíduo de triptofano (Trp77), localizado na interface dimérica e sua relevância na atividade catalítica. Usando este triptofano como

marcador, sob diversas condições de pH, foram observados resultados consistentes com uma dissociação do dímero, com conseqüente exposição do Trp77 ao solvente aquoso, para valores de pH próximos de 5,0. Além do mais, na presença de lipossomas contendo fluoróforos e supressores, a atividade de ataque à membrana somente era observada sob condições de pH mais elevado, nas quais a forma dimérica da enzima era favorecida. Com estes resultados, os autores sugerem que esse estado de oligomerização da proteína seria essencial para a iniciação de atividade tóxica independente do cofator cálcio. De fato, cristais das estruturas da BthTX-I e a Piratoxina-II (ambas diméricas) foram crescidos em pHs 7,5 e 8,5, respectivamente. Reforçando estes resultados, têm-se os cristais das estruturas monoméricas da GodMT-II (1GOD), que foram obtidos em pH 4,6, e da Lys49-PLA₂ da serpente *Deinagkistrodon acutus* (1MG6), obtidos em pH 5,6.

Já os resultados estruturais da primeira forma cristalina da Miotoxina ACL, cristalizada em pH 6,5, divergem dos propostos acima, pois esta se mostra monomérica tanto na forma cristalina, como em ensaios de espalhamento de luz dinâmico (resultados não mostrados, DLS, Berne *et al.*, 1976), em condições equivalentes às de cristalização. Ainda mais, a presença da molécula de ácido graxo presa dentro do sítio ativo também é sugerida como resultado de um ciclo catalítico interrompido, sem a soltura de um dos produtos (no caso, o próprio ácido graxo). Também, nas formas II e III, cujos cristais foram crescidos em pH 8,5, são encontrados monômeros cristalográficos, com canal hidrofóbico vazio. Mas, essas três formas da Miotoxina ACL apresentam em comum o fato de terem sido cristalizadas sob alta força iônica (0,2 M (NH₄)₂SO₄ na forma I e 2 M (NH₄)₂SO₄ nas formas II e III) e certamente essas condições poderiam enfraquecer as pontes salinas entre os monômeros. Para resolver esta questão, seriam

necessárias medidas em força iônica baixa, sob diversas condições de pH, usando DLS, espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS, Svergun *et al.*, 1991) e filtração em gel.

Algumas moléculas do empacotamento cristalino da primeira forma da Miotoxina ACL foram geradas e são mostradas na figura 5.4.2, ilustrando as posições relativas das asas- β .

Fig. 5.4.2: Disposição desfavorável das asas- β para formação do dímero proposto por Ward e colaboradores, observada na estrutura cristalina da forma I da Miotoxina ACL.

Uma análise mais detalhada dos resíduos envolvidos na interface da dimerização, que são conservados em todos os organismos, indica a presença de interações e conformações muito semelhantes às encontradas na forma dimerica em todas as estruturas monoméricas disponíveis, com exceção de pequenas mudanças em cadeias laterais no caso da GodMT-II, como mostrado na figura 5.4.3. Portanto, em princípio, não há razão para acreditar que não seria possível a formação de dímeros para todas as miotoxinas, tanto é que dados de espalhamento da GodMT-II demonstraram a presença de dímeros em condições de pH mais elevados (Arni *et al.*, 1999).

Fig. 5.4.3: Sobreposição estrutural entre a estrutura da Miotoxina II (dimérica, em verde) com as estruturas das Lys49-PLA₂ monoméricas (em branco), ilustrando a conservação das conformações dos resíduos envolvidos na dimerização. Pequenas mudanças conformacionais são observadas na estrutura da GodMT-II.

Todos os resultados acima sugerem uma explicação em comum. A presença de monômeros e a ausência de atividade contra membranas para as Lys49-PLA₂ em condições de pH ácidos sugere uma relação da causa e efeito para estes dois fenômenos. De fato, a protonação de resíduos em pH baixo, como o Glu12 poderia enfraquecer a ponte salina com a Lys80, desestabilizando a forma dimérica.

Porém a falta de atividade em condições de baixo pH também poderia ser devido a protonação de outros grupos ácidos não envolvidos na interface de dimerização e portanto a possibilidade do monômero ser a espécie ativa não pode ser descartada. Por exemplo, pode ocorrer a protonação da His48, fazendo com que essa agora seja o doador de próton na ponte de hidrogênio com a água catalítica, diminuindo a nucleofilicidade desta e desfavorecendo o ataque nucleofílico à ligação éster na posição *sn*-2 do fosfolipídio. Porém esta possibilidade depende de um vínculo entre uma eventual atividade residual catalítica e os efeitos farmacológicos. Alternativamente, se a presença do ácido graxo ligado ao sítio ativo estiver relacionado com estas atividades

farmacológicas, é para se esperar uma redução dos efeitos em pH mais baixo devido a protonação do próprio ácido graxo, liberando-o do canal. Em suma, parece que a questão da necessidade de formar dímeros para haver atividade farmacológica, ainda está em aberto.

5.5 - CORRELAÇÃO ENTRE ATIVIDADE CATALÍTICA, EFEITO CITOTÓXICO E ESTRUTURA

É comumente atribuído às fosfolipases A_2 extraídas de venenos de serpentes uma grande variedade de atividades farmacológicas, como neurotoxicidade, miotoxicidade, efeitos anticoagulantes e inflamatórios (Rosenberg, 1990). Embora os efeitos tóxicos tenham sido *a priori* concebidos como consequência da atividade enzimática, um grande número de evidências indica que estes são independentes da ação fosfolipolítica (Rosenberg, 1990; Rosenberg, 1986; Ward *et al.*, 2002). No caso de PLA_2 miotóxicas, exemplos da falta de necessidade de um mecanismo catalítico para indução de necrose muscular e efeitos anticoagulantes têm sido apresentados (Gutiérrez *et al.*, 1986; Homs-Brandeburgo *et al.*, 1988; Lomonte *et al.*, 1989; Chwetzoff *et al.*, 1989; Krizaj *et al.*, 1991; Kihara *et al.*, 1992). Apesar disso, o sítio molecular responsável pela atividade tóxica das $Lys49-PLA_2$ permanece elusivo.

Em 1994, Lomonte e colaboradores (Lomonte *et al.*, 1994a) mostraram que heparinas se ligam a essa classe de enzimas inibindo *in vivo* sua atividade miotóxica. O mesmo grupo sintetizou vários peptídeos equivalentes a diferentes regiões da Miotoxina II, e em experimentos *in vitro*, mostrou que essas heparinas se ligam à enzima em um sítio de caráter fortemente catiônico na região dos resíduos 115 a 129 (KKYRYYLKPLCKK), com uma possível contribuição das

lisinas 36 e 38, realizando dessa maneira a primeira identificação da possível região miotóxica em Lys49-PLA₂ (Lomonte *et al.*, 1994b). Esta mesma região é sugerida de acordo com resultados de caracterização imunoquímica, que demonstram a neutralização do efeito miotóxico na Miotoxina-II, através de anticorpos monoclonais contra a região do C-terminal (Calderon *et al.*, 1998) e resultados de indução de danos à membranas e miotoxicidade *in vivo* (Lomonte *et al.*, 1999).

Recentemente, Ward e colaboradores (Ward *et al.*, 2002) demonstraram através de mutações sítio-dirigidas na estrutura recombinante da BthTX-I (His⁴⁸Gln, Lys⁴⁹Asp e Lys¹²²Ala), a ocorrência de variações nos níveis de miotoxicidade, dano à membrana Ca²⁺-independente e atividade catalítica destas, quando estas eram comparadas com a estrutura nativa da mesma enzima.

Observaram, mais especificamente que a mutação da Lys¹²²Ala reduzia os níveis de miotoxicidade e danos à membrana, enquanto que as outras mutações (His⁴⁸Gln, Lys⁴⁹Asp) conservavam níveis equivalentes para essas funções. De fato, a análise das estruturas cristalográficas sugere que a presença da Lys¹²² favorece a conformação onde esta está voltada para o *loop* de ligação de cálcio, principalmente na presença de ácido graxo dentro do sítio ativo, e como consequência ocorre a exposição do “calo” hidrofóbico. Dessa maneira, sugerimos que esta conformação (e mais especificamente a exposição do “calo”) esteja envolvida com o efeito miotóxico. No caso do mutante Lys¹²²Ala, devido à flexibilidade inerente ao *loop* C-terminal é bem provável que este possa assumir a conformação onde o “calo” é exposto, mas de maneira muito mais instável, explicando a diminuição do efeito tóxico.

A hipótese de Lee e colaboradores (Lee *et al.*, 2001), sugere que a Lys122 seja responsável pela falta de atividade catalítica medida *in vitro*, devido ao seu papel em segurar o ácido graxo no canal hidrofóbico, interrompendo assim o ciclo catalítico. Portanto, poderia se esperar que o mutante Lys¹²²Ala teria uma atividade catalítica mensurável *in vitro*, por não ser capaz de ancorar o produto da catálise. Porém, Ward e colaboradores (Ward *et al.*, 2002) demonstram que não há atividade catalítica mensurável para este mutante. Sugerimos então, que a Lys122 seja essencial tanto para atividade catalítica (através da estabilização do intermediário tetraédrico), quanto para ancorar o produto. Esta modificação à hipótese do Lee e colaboradores explicaria os dados cinéticos descritos por Ward e colaboradores.

Os resultados de Ward e colaboradores favorecem ainda a hipótese de que as atividades miotóxicas e de dano a membranas sejam independentes de qualquer atividade catalítica residual, caso esta última exista. Porém, os dados da literatura são ainda conflitantes neste sentido. Por exemplo, dados de Soares e colaboradores (Soares *et al.*, 2000) e Toyama e colaboradores (Toyama *et al.*, 1998), mostram que modificações químicas da His48 nas estruturas da BnSP-7 e Piratoxina-I, com o composto 4-bromofenilacil brometo (BPB) reduzem tanto os efeitos miotóxicos, quanto os de danos às membranas, sugerindo que alteração do sítio ativo afetaria o sítio responsável pela miotoxicidade. É pouco provável que este resultado seja devido a uma grande mudança conformacional na molécula, pois a estrutura cristalográfica do complexo entre a Asp49-PLA₂ de *Agkistrodon halys pallas* (PDBID 1BK9, Zhao *et al.*, 1998) e BPB não apresenta nenhuma mudança significativa na enzima. Uma provável explicação para este fato é que este composto impossibilite a ligação da His48 com a molécula de água parte da

triade catalítica, impossibilitando assim o ataque nucleofílico desta na posição *sn*-2 do substrato, além de entupir o canal hidrofóbico. Seria portanto impossível encontrar um ácido graxo ligado a um complexo deste tipo.

5.6 - UMA PROPOSTA CONSENSO

Abaixo tentaremos compatibilizar o máximo possível os dados provenientes das três estruturas aqui resolvidas junto com os da literatura anterior.

Observamos nas três estruturas da Miotoxina ACL diferentes conformações para o *loop* de ligação de cálcio e principalmente para o C-terminal. Duas dessas, apesar de cristalizarem sob as mesmas condições, e assim como a primeira forma, serem originárias do mesmo lote de purificação, apresentam-se livres de ácido graxo dentro do sítio ativo. Estas apresentam marcantes diferenças estruturais, atribuídas principalmente a uma grande flexibilidade do *loop* C-terminal, uma vez que estes dados são compatíveis com os já observados em outras estruturas de Lys49-PLA₂ resolvidas por cristalografia de raios X, onde se encontram grandes variações do C-terminal para estruturas livres de ácido graxo (pelo menos cinco diferentes conformações), mas sempre o mesmo estado na presença do ácido graxo (pelo menos nas três estruturas disponíveis).

Sugerimos então, que a presença do ácido graxo seja responsável por travar o C-terminal nesta determinada conformação, que apresenta alguns aspectos estruturais peculiares, principalmente com interações mais fortes entre este e o *loop* de ligação de cálcio e a exposição do “calo” hidrofóbico, com a Lys122 apresentando um papel fundamental na estabilização destes.

Nota-se também que entre as estruturas livres de ácido graxo muitas vezes (~ 50 %), o C-terminal se encontra na conformação descrita acima, com a Lys122

interagindo com a ligação Cys29-Gly30, expondo sempre o “calo” hidrofóbico. Em todas estas exposições do “calo”, este se encontra cercado de cargas positivas, como contribuição da grande quantidade de resíduos de lisina (e em alguns casos, argininas e histidinas).

Com base nestas observações, sugerimos que na ausência do ácido graxo, o C-terminal seja altamente flexível, assumindo conformações diversas (podendo se comportar como os peptídeos livres citados acima), inclusive a configuração vista na presença do ácido graxo.

Cremos que esta última conformação seja farmacologicamente relevante, responsável pelas atividades miotóxicas e de danos à membrana. Esta hipótese é compatível com as seguintes informações:

- dados da literatura mostram a importância dos resíduos do C-terminal na ativação do efeito farmacológico;
- atividade tóxica presente em mutantes que seriam em princípio incapazes de exercer a catálise, pois para os mesmos, na ausência do ácido graxo a conformação “ativa” poderia ser assumida. Neste aspecto, o C-terminal, em ser bastante flexível, poderia se comportar de maneira parecida com os peptídeos ativos;
- o fato de entre os mutantes da Ward e colaboradores (Ward *et al.*, 2002), se observar uma diminuição considerável dos efeitos miotóxicos e de danos à membranas quando na presença da mutação Lys¹²²Ala, indicando o papel fundamental deste resíduo. Este fato se deve a forte interação que a Lys122 faz na conformação dita como farmacologicamente relevante.

Sugerimos também que, apesar de não ser essencial para a atividade farmacológica, a presença do ácido graxo no sítio ativo estabilizaria a forma C-

terminal toxicamente ativa, justificando o fato de que ainda não foi observada outra conformação estrutural para esta região na presença do ácido graxo, apesar da necessidade de mais evidências experimentais.

Um mecanismo plausível é que ao encontrar a membrana, a Lys49-PLA₂ realiza um ciclo de catálise, que é interrompido pela falha do ácido graxo em sair do canal, devido à ligação peptídica fortemente polarizada pela Lys122. Dessa maneira, o ácido graxo poderia servir como uma âncora na membrana, além de estabilizar a conformação farmacologicamente ativa do C-terminal, onde deve residir o sítio miotóxico, ocorrendo a exposição do “calo” hidrofóbico, que supomos ser essencial para desencadear os efeitos tóxicos e de danos à membrana.

Este fato também explicaria a conservação dos resíduos do sítio catalítico e a rede de ligações de hidrogênio incluindo os resíduos Tyr52 e Tyr73, pois haveria sim uma interdependência entre a atividade catalítica no sítio ativo e a miotoxicidade no C-terminal. Um desenho esquemático desse mecanismo correlacionando, através da Lys122, a atividade catalítica (no *loop* de ligação de Ca²⁺) com os efeitos miotóxicos e de danos à membranas (no C-terminal), é mostrado na figura 5.6.1, adaptada da hipótese de Lee e colaboradores (Lee *et al.*, 2001).

Fig. 5.6.1: Desenho esquemático da correlação entre a atividade catalítica e os efeitos miotóxicos e de danos à membrana. A comunicação entre as regiões é feita por intermédio da Lys122. As fenilalaninas 121 e 124 compõem o “calo” hidrofóbico descrito no texto, onde em outras estruturas, estas podem se encontrar substituídas por outros resíduos hidrofóbicos.

Não podemos eliminar, é claro, a possibilidade de que as Lys49-PLA₂ sejam também simples proteínas que ligam ácidos graxos livres no meio, não possuindo atividade catalítica, visto que esse fato também poderia justificar a existência das estruturas cristalográficas de algumas Lys49-PLA₂ em complexo com o ácido graxo.

5.7 - REFERÊNCIAS

- Arni, R.K, Fontes, M.R.M., Barberato, C., Gutierrez, J.M., Diaz-Oreiro, C. and Ward, R.J. (1999) *Arch. Biochem. Biophys.* **366** (2), 177-199
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N. and Bourne, P.E. (2000) *Nucleic Acids Research* **28**, 235-242
- Berne, B.J. and Pecora, R. (1976) *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics*, Wiley & Sons, New York, 1976
- Calderon, L. and Lomonte, B. (1998) *Arch. Biochem. Biophys.* **358**, 343-350
- Chwetzoff, S., Courdec, J., Franchon, P. and Menez, A. (1989) *FEBS Lett.* **248**, 1-4
- da Silva Giotto, M.T., Garratt, R.C., Oliva, G., Mascarenhas, Y.P., Giglio, J.R., Cintra, A.C., de Azevedo, W.F. Jr., Arni, R.K. and Ward, R.J. (1998) *Proteins* **30**, 442-454

- de Azevedo Jr., W.F., Ward, R.J., Canduri, F., Soares, A., Giglio, J.R. and Arni, R.K. (1998) *Toxicon* **36** (10), 1395-1406
- de Azevedo Jr., W.F., Ward, R.J., Gutierrez, J.M. and Arni, R.K. (1999) *Toxicon* **37** (2), 371-384
- de Oliveira, A.H.C., Giglio, J.R., Andrião-Escarso, S.H., Ito, A.S. and Ward, R.J. (2001) *Biochemistry* **40**, 6912-6920
- Francis, B., Gutiérrez, J.M., Lomonte, B. and Kaiser, I.I. (1991) *Arch. Biochem. Biophys.* **284**, 352-359
- Gutiérrez, J.M., Lomonte, B. and Cerdas, L. (1986) *Toxicon* **24**, 885-894
- Holland, D.R., Clancy, L.L., Muchmore, S.W., Ryde, T.J., Einspahr, H.M., Finzel, B.C., Heinrickson, R.L. and Watenpaugh, K.D. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 17649-17656
- Homsi-Brandeburgo, M.I., Queiroz, L.S., Santo-Neto, H., Rodrigues-Simioni, L. and Giglio, J.M. (1988) *Toxicon* **26**, 615-627
- Kihara, H., Uchikawa, R., Hattori, S. and Ohno, M. (1992) *Biochem. Int.* **28**, 895-903
- Kleywegt, G.J. & T.A. Jones (1996) *Structure* **4**, 1395-1400
- Krizaj, I., Bieber, A.L., Ritonja, A. and Gubenöck, F. (1991) *Eur. J. Biochem.* **202**, 1165-1168
- Lee, W-H., da Silva Giotto, M.T., Marangoni, S., Toyama, M.H., Polikarpov, I. and Garratt, R. C. (2001) *Biochemistry* **40**, 28-36
- Lomonte, B. and Gutiérrez, J.M. (1989) *Toxicon* **27**, 725-733
- Lomonte, B., Tarkowski, A., Bagge, U. and Hanson, L.Å. (1994a) *Biochem. Pharmacol.* **47**, 1509-11518
- Lomonte, B., Moreno, E., Tarkowski, A., Hanson, L. Å. and Maccarana, M. (1994b) *Journ. Biol. Chem.* **47**, 29867-29873
- Lomonte, B., Pizzaro-Cerda, J., Angulo, Y., Gorvel, J.P. and Moreno, E. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1461**, 19-26
- Rosenberg, P. (1986) em *Natural Toxins* (Harris, J.B., eds.) Clarendon Press, Oxford
- Rosenberg, P. (1990) em *Handbook of Toxinology* (Shier, W.T. and Mebs, D., eds.) Marcel Dekker, Inc. New York, 67-277
- Scott, D.L., Otwinowski, Z., Gelb, M.H. and Sigler, P.B. (1990) *Science* **250**, 1563-1566
- Scott, D.L., White, S.P., Browning, J.L., Rosa, J.J. Gelb, M.H. and Sigler, P.B. (1991) *Science* **254**, 1007-1010
- 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. e Giglio J.R. (2000) *Arch. Biochem. Biophys.* **378**, 210-219
- Svergun, D.I. and Stuhmann, H.B. (1991) *Acta Cryst.* **A47**, 736-744
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) *Nucleic. Acids Res.* **22**, 4673-4680

- Thunnissen, M.M.G.M., AB, E., Kalk, K.H., Drenth, J., Dijkstra, B.W., Kuipers, P., Dijkman, R., de Haas, G.H. and Verheij, H.M. (1990) *NATURE* **689**, 689-691
- Toyama, M.H., Soares, A.M., Vieira, C.A., Novello, J.C., Oliveira, B., Giglio, J.R. and Marangoni, S. (1998) *J. Protein Chem.* **17**, 713-718
- Ward, R.J., Alves, A.R., Netto, J.R., Arni, R.K. and Casari, C. (1998) *Protein Engineering* **11** (4), 285-294
- Ward, R.J., Chioato, L., Oliveira, A.H.C., Ruller, R. and Sá, J.M. (2002) *Biochem. J.* **362**, 89-96
- Ward, R.J., de Azevedo Jr., W.F and Arni, R.K. (1998) *Toxicon* **36** (11), 1623-1635
- White, S.P., Scott, D.L., Otwinowski, Z., Gelb, M.H. and Sigler, P.B. (1990) *Science* **250**, 1560-1563
- Zhao, H., Tang, L., Wang, X., Zhou, Y. and Lin, Z. (1998) *Toxicon* **36**, 875

- CAPÍTULO 6 -

ANÁLISE DA INTERAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS COM A MIOTOXINA ACL POR ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^{13}C

Pela cristalografia de raios X geralmente consegue-se observar a presença ou não de ligantes na molécula protéica, determinando sua conformação e os tipos de interações realizadas. No caso de ácidos graxos, por exemplo, devido ao longo comprimento da cadeia carbônica hidrofóbica, quando esta alcança a porção ocupada pelo solvente entre moléculas da rede cristalina, assume um alto grau de desordem dificultando a interpretação de posições atômicas. Outro fator limitante nesse caso é a resolução máxima dos conjuntos de dados experimentais, que dificulta a detecção da presença de insaturações e contatos contidos nessa cadeia. Portanto, é difícil saber a natureza exata do ácido graxo ligado em complexos obtidos diretamente do veneno e dessa maneira, não é possível saber se há seletividade quanto ao comprimento e tipo de insaturação do ligante.

Uma técnica espectroscópica que hoje é complementar à cristalografia possibilitando a avaliação dessas características de maneira segura é a

Ressonância Magnética Nuclear, RMN, onde são analisados núcleos atômicos que possuam um momento magnético (Carrington, 1967).

Os espectros de RMN habituais são gráficos da probabilidade de absorção de energia em função da frequência ν , do campo magnético aplicado, importando a posição, a intensidade e a forma dos sinais. Esta informação depende da natureza dos núcleos magnéticos, e o que é mais interessante do ponto de vista químico, das características do ambiente eletrônico onde os núcleos se encontram imersos e das relações de posição entre núcleos da mesma molécula. Observando seus comportamentos pela variação das posições dos picos de absorção, os núcleos magnéticos funcionam como sondas informativas da estrutura molecular.

Pode-se mostrar que essas transições do *spin* nuclear (ressonância) ocorrem quando a frequência da radiação eletromagnética absorvida é igual à frequência de precessão do núcleo estudado. E uma das maneiras de se observar essas transições é através da determinação do deslocamento químico δ . Este parâmetro, em termos absolutos é definido pela frequência da ressonância expressa com referência a um composto padrão, sendo δ definido como $\delta = [(\nu - \nu_{\text{referência}}) \cdot 10^6] / \nu_{\text{referência}}$, em unidades de partes por milhão (ppm). Em RMN, esse padrão é geralmente feito utilizando-se TMS (tetrametilsilano, $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$). No presente trabalho utilizou-se o DMSO (Dimetilsulfóxido, $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$) como marcador externo, colocado dentro de um capilar posicionado dentro do tubo de 5 mm. Portanto este solvente não ficou em contato com a proteína e pôde ser usado como referência uma vez que seu pico central, em $\delta = 39,5$, fica fora da região que foi utilizada nas presentes análises.

Devido à dependência direta da frequência de ressonância com a frequência no momento magnético nuclear, informações podem ser obtidas através do deslocamento químico. Se o deslocamento ocorre para maiores valores de ppm, significa que o núcleo deve estar menos blindado, com relação à nuvem eletrônica, e, portanto há maior possibilidade de estar carregado, passível a interações eletrostáticas. Enquanto que deslocamentos para menores valores de δ , implicando em maior blindagem dos núcleos indicando a presença de meios mais hidrofóbicos.

Dessa maneira, foi utilizada a espectroscopia de RMN para o ^{13}C , explorando a sensibilidade do deslocamento químico do carbono da carboxila enriquecido (posição 1) dos ácidos graxos, em relação ao ambiente, para se investigar as interações entre diversos tipos de ácidos graxos e a Miotoxina ACL, utilizando amostras da proteína pura nativa não delipidada e ligantes seletivamente enriquecidos com o isótopo ^{13}C , observando se há favorecimento de sua forma ionizada ou protonada. De fato, a espectroscopia do ^{13}C por RMN, explorando a sensibilidade do deslocamento químico do carbono carboxílico em relação ao ambiente químico e ao estado de ionização tem se mostrado uma excelente técnica em estudos variados, como determinação do número de sítios de ligação de uma proteína, análise quantitativa das interações, acessibilidade da cabeça polar ao solvente e estabilidade do complexo proteína:ligante (Cistola *et al.*, 1987; Cistola *et al.*, 1988; Cistola *et al.*, 1989; Beringhelli *et al.*, 2001).

Ácidos graxos saturados enriquecidos com ^{13}C na posição C_1 , dos tipos ácido palmítico (AP, 16:0) e ácido esteárico (AE, 18:0), foram importados da Cambridge Isotope Laboratories Inc.. Já o ácido graxo insaturado, do tipo ácido oléico (AO, 18:1:9) foi fornecido pelos colaboradores no projeto, Dra. Lucimara

Aparecida Forato e Prof. Dr. Luis Alberto Colnago, responsáveis pelas medidas de ressonância, nas instalações da EMBRAPA Instrumentação Agropecuária de São Carlos.

Como os ácidos graxos são insolúveis em TRIS, foram realizados testes iniciais de deposição de ácidos graxos nos tubos de ressonância, de acordo com Beringhelli e colaboradores (Beringhelli *et al*, 2001), variando-se o ambiente químico, para se determinar as melhores condições de realização dos experimentos. Condições de pH e concentração de soluções tamponantes equivalentes às que foram obtidos cristais (0,1 M ácido cacodílico, pH6,5 e 0,1 M TRIS-HCl pH8,5), foram inicialmente testadas, mas estas se mostraram inadequadas, dificultando a migração do ácido graxo da parede do tubo para a solução. Variações destas condições foram testadas e a que se mais mostrou adequada foi 10 mM TRIS-HCl, pH 7,3, com adição de 20 % de água deuterada (D_2O , usada para corrigir a frequência do espectrômetro).

As amostras foram preparadas diluindo-se inicialmente os ácidos graxos em solvente éter destilado, sendo então transferida para o tubo de RMN de 5mm, sendo o volume final da solução 500 μL , e a deposição ocorrendo por evaporação lenta do éter, com o uso de bomba de vácuo, de maneira que as moléculas de ácido graxo ficassem grudadas na parede do tubo. Em seguida foi feita a adição da solução tampão em um volume final de 500 μL . Essa solução era sempre mantida em repouso por pelo menos 12 horas para permitir a migração do ácido graxo para a solução, em forma de lipossomas, micelas, etc... Em medidas de complexos com a proteína, esta era primeiramente diluída na solução e em seguida adicionada ao tubo.

As amostras foram analisadas a 27 °C durante 8 a 10 horas em um espectrômetro Varian, modelo Inova 400, campo de 9,4 Tesla. Para os espectros de ^{13}C , foram obtidos 20000 transientes com pulso de $\pi/2$, desacoplamento Waltz, tempo de repetição de 2,5 segundos, 8096 pontos, tempo de aquisição de 1,2 segundos e janela espectral de 25 KHz. Em todos os experimentos foi usado DMSO como referência externa.

As medidas foram feitas com os três tipos de ácidos graxos (oléico (AO), palmítico (AP) e esteárico (AE)), variando-se a proporção destes em relação à proteína.

6.1 - RESULTADOS EXPERIMENTAIS

6.1.1 - COMPLEXO ÁCIDO OLÉICO:PROTEÍNA

Uma vez estabelecidas as condições de experimentos com o ácido graxo (AG), foram iniciadas as medidas deste na presença da Miotoxina ACL. Diferentes razões molares de AG:proteína (ácido graxo livre, 2:1 e 3:1) foram utilizadas para possibilitar uma análise quantitativa dos sítios de ligação.

As primeiras medidas foram feitas utilizando-se o ácido oléico (18:1:9). Estas foram realizadas utilizando o mesmo procedimento de deposição do ácido graxo no tubo através de evaporação lenta do solvente seguida da adição da solução protéica. Cada solução permaneceu incubada em cada um dos equivalentes por volta de 12 horas antes das medidas. Os resultados encontram ilustrados na figura 6.1.1.

Fig. 6.1.1: Espectros de RMN de ^{13}C para a Miotoxina ACL, após interações com 2 e 3 equivalentes de ácido oléico (1:2 em vermelho, 1:3 em azul), ilustrando um deslocamento na posição e na largura dos picos, quando comparados com o padrão do ácido oléico (preto). Espectro obtido com pulso de $\pi/2$, tempo de aquisição de 1,2 s e tempo de espera de 2,5 s.

A figura 6.1.1 mostra os espectros obtidos a partir do $^{13}\text{C}_1$ do ácido oléico, na ausência e presença da Miotoxina ACL, na região de 180 ppm. Os picos situados em menor deslocamento químico (em torno de 60 ppm) representam a ressonância dos ^{13}C em abundância natural (aproximadamente 1%) nas moléculas de TRIS, resultante do carbono assimétrico, C^* , e dos grupos CH_2 . Já os picos na região de 39 ppm, mais especificamente sete picos, são oriundos do padrão DMSO. Os sinais em torno de 172 ppm são contribuições de carbonilas, tanto de grupos peptídicos como cadeias laterais. Na faixa de 100 a 140 ppm estão os sinais de resíduos aromáticos, e em torno de 40 a 70 ppm, têm-se os sinais de cadeias laterais alifáticas.

Expandindo a região das carboxilas, dos picos específicos da interação AG:proteína, é possível ter uma noção mais exata do deslocamento químico do $^{13}\text{C}_1$, antes e depois da adição da proteína (figura 6.1.2).

Fig. 6.1.2: Espectro de RMN de ^{13}C para o ácido oléico livre em solução (preto) e em complexo a proteína (1 mM), nas proporções de 2:1 (vermelho) e 3:1 (azul). O espectro foi obtido com pulso de $\pi/2$, tempo de aquisição de 1,2 s e tempo de espera de 2,5 s.

Na figura 6.1.2 nota-se um pico correspondente ao deslocamento químico do ácido graxo na ausência da proteína, em 180,19 ppm (em preto). Quando da adição desta na solução com o ácido graxo, na proporção AG:proteína de 2:1, é observado um deslocamento do padrão para maiores valores de ppm, agora na posição de 181,51 ppm. Aumentando ainda mais a concentração de ácido graxo na amostra, agora na proporção de 3:1, a posição do pico é praticamente conservada

($\delta = 181,27$ ppm). Ainda em relação a figura 6.1.2, pode-se observar variações em dois parâmetros, intensidade e largura dos picos. Devido à maior intensidade dos picos com o aumento da proporção de AG:proteína, pode-se inferir que complexos de AG:proteína são formados e que grande parte do ácido graxo foi se ligou com a Miotoxina. O alargamento nas bandas é explicado pelo fato de, no complexo, o ácido graxo assumir o tempo de correlação da proteína, e por consequência um aumento em ν . Como dito acima, o deslocamento ocorreu para maiores valores de δ , indicando assim interações do tipo eletrostáticas entre a carboxila do AG e da miotoxina, ou seja, nesta situação a carboxila do AG deve estar na forma ionizada (COO^-).

6.1.2 - COMPLEXOS ÁCIDO PALMÍTICO:PROTEÍNA E ÁCIDO ESTEÁRICO:PROTEÍNA

As tentativas de se medir a posição de ressonância do ácido palmítico (16:0) em solução não foram bem sucedidas, pois mesmo variando-se a concentração do ácido, este quando se desprendia do tubo, formava grandes aglomerados, levando a tempos de tombamento elevados e portanto a um alargamento da linha. Já, quando a proteína foi adicionada (proporção AG:proteína 5:1) e a solução medida, rapidamente apareceu um sinal bastante intenso, na posição de $\delta = 181,29$ ppm. Isto evidencia a alta afinidade deste ácido graxo com a proteína, pois aparentemente a presença proteína faz com que o ácido graxo seja dissolvido dos agregados formando complexos com a proteína. Este fato é coerente com observação de que a solução, inicialmente turva, se torna gradualmente transparente quando se adiciona a proteína. Observa-se que novamente a posição sinal está acima do esperado para ácidos palmíticos puros

(Beringhelli *et al*, 2001), indicando o favorecimento da forma ionizada da carboxila do AP, na presença da miotoxina.

Fig. 6.2.1: Espectro de RMN de ^{13}C para o ácido palmítico 5 mM em solução com a proteína (1 mM), na proporção de 5:1. Não foi possível a medida do ácido livre em solução devido à formação de aglomerados. O espectro foi obtido com pulso de $\pi/2$, tempo de aquisição de 1,2 s e tempo de espera de 2,5 s.

As mesmas observações são feitas quando os experimentos são realizados com o ácido esteárico (18:0). Novamente não foi possível a medida deste livre em solução devido à formação de agregados. Mas na adição da proteína (proporção AG:proteína 5:1), rapidamente se observou um grande pico, na posição de 181,21 ppm, equivalente ao observado no experimento com ácido palmítico.

Fig. 6.2.2: Espectro de RMN de ^{13}C para o ácido esteárico 5 mM em solução com a proteína (1 mM), na proporção de 5:1 (em laranja). Não foi possível a medida do ácido livre (preto) em solução devido à formação de aglomerados. O espectro foi obtido com pulso de $\pi/2$, tempo de aquisição de 1,2 s e tempo de espera de 2,5 s.

6.2 - ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os experimentos descritos acima parecem demonstrar de maneira geral que a Miotoxina ACL, e provavelmente todas as Lys49-PLA₂, possuem maior afinidade por ácidos graxos saturados, ligando estes de maneira mais efetiva dentro do canal hidrofóbico. Esta observação poderia reforçar a suposição de que nas estruturas cristalográficas que se encontram em complexo com ácidos graxos, estes possuem, como realmente modelados, caráter saturado (na estrutura Piratoxina-II, Lee e colaboradores (Lee *et al.*, 2001) identificaram este como sendo uma molécula de ácido mirístico (14:0) e no caso da enzima extraída da

serpente *Bothrops nummifer* (de Azevedo *et al.*, 1999), foi identificado uma molécula de ácido palmítico (16:0) e no caso da forma I da Miotoxina ACL, uma molécula de ácido láurico (12:0)).

A afinidade de Lys49-PLA₂ por ácidos graxos saturados também foi demonstrada em experimentos realizados por Pedersen e colaboradores (Pedersen *et al.*, 1995) em estudos de ressonância paramagnética eletrônica usando ácidos graxos com marcadores de spin covalentemente ligados.

Outro fato observado é o caráter eletrostático da interação entre o ácido graxo e a proteína, de acordo com os resultados cristalográficos, mostrando a interação da cabeça polar do ácido com o nitrogênio do grupo amida da Gly30, para todas as estruturas resolvidas do complexo (citadas acima).

Essa provável seletividade poderia também explicar o fato da atividade catalítica residual para as Lys49-PLA₂ ser medida apenas contra fosfolipídios contendo ácido aracdônico na posição *sn*-2 (20:4:5,8,11,14; Shimohigashi *et al.*, 1995; Yamaguchi *et al.*, 1997), pois este é muito insaturado e provavelmente sai do canal hidrofóbico mais rapidamente que ácidos graxos saturados. Curiosamente, a presença do ácido aracdônico em membranas de células (inclusive musculares) de mamíferos é predominante em relação a outros tipos, principalmente na posição *sn*-2 (Nelson *et al.*, 2000), assim como os ácidos oléicos (18:1:9) e linoléico (18:2:9,12). Talvez essa observação explique a importância fisiológica desta seleção.

Estes resultados também implicam na confirmação da afinidade das Lys49-PLA₂ por ácidos graxos livres em solução, não podendo se descartar a dessa origem para as moléculas observadas nos complexos cristalográficos.

6.3 - REFERÊNCIAS

- Beringhelli, T., Goldoni, L., Capaldi, S., Bossi, A., Perduca, M. and Monaco, H. L. (2001) *Biochemistry*, **40** (42), 12605-12610
- Carrington, A. and McLachlan, A.D. (1967) *Introduction to Magnetic Resonance*, Chapman and Hall, London
- Cistola, D.P., Sacchettini, J.C., Banaszak, L.J., Walsh, M.T. and Gordon, J.I. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 2700-2710
- Cistola, D.P., Small, D.M. and Hamilton, J.A. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 10971-10979
- Cistola, D.P., Walsh, M.T., Corey, R.P., Hamilton, J.A. and Brecher, P. (1988) *Biochemistry* 27, 711-717
- Nelson, D.L. and Cox, M.M. (2000) *Lehninger Principles of Biochemistry* 3rd. edition, Worth Publishers, New York
- Pedersen, J.Z., Lomonte, B., Massoud, R., Gubensek, F., Gutierrez, J.M. and Rufini, S. (1995) *Biochemistry* **34**, 4670-4675
- Shimohigashi, Y., Tani, A., Matsumoto, H., Nakashima, K., Yamaguchi, Y., Oda, N., Takano, Y., Kamiya, H., Kishino, J., Arita, H. and Ohno, M. (1995) *J. Biochem.* **118**, 1037-1044
- Yamaguchi, Y., Shimohigashi, Y., Chiwata, T., Tani, A., Chijiwa, T., Lomonte, B. and Ohno, M. (1997) *Biolchem. Mol. Biol. Int.* **43**, 19-26

CONCLUSÕES

Nesta dissertação foram descritos todos os procedimentos experimentais que levaram à determinação de três estruturas cristalográficas da Miotoxina ACL, uma Lys49-PLA₂ extraída do veneno da serpente *Agkistrodon contortrix laticinctus*.

As análises das diferenças estruturais encontradas nestas três formas, juntamente com outras já observadas em várias estruturas dessas enzimas, permitiram a descrição de um mecanismo que tente correlacionar a eventual atividade catalítica residual destas (relacionada ao *loop* de ligação de cálcio) com efeitos de danos a membranas e miotóxico (atribuídos ao C-terminal), através da presença da Lys122. Mas, apesar de não ser essencial para a atividade farmacológica, a presença do ácido graxo no sítio ativo estabilizaria a forma C-terminal toxicamente ativa (com a exposição do “calo” hidrofóbico), justificando o fato de que ainda não foi observada outra conformação estrutural para esta região na presença do ácido graxo. Mesmo assim há uma necessidade de mais evidências experimentais (inclusive um maior número de estruturas cristalográficas de Lys49-PLA₂ resolvidas na presença de ácido graxo) para testar nossa conjectura.

Em suma, no mecanismo proposto, ao encontrar a membrana, a Lys49-PLA₂ realizaria um ciclo de catálise, interrompido pela falha do ácido graxo em sair do canal, devido à ligação peptídica fortemente polarizada pela Lys122. Dessa maneira, o ácido graxo poderia servir como uma âncora na membrana, além de estabilizar a conformação farmacologicamente ativa do C-terminal, onde deve residir o sítio miotóxico, conseqüentemente favorecendo a exposição do “calo” hidrofóbico, que supomos ser essencial para desencadear os efeitos farmacológicos (miotoxicidade e danos a membranas). Este mecanismo também explicaria a conservação dos resíduos do sítio catalítico.

A questão envolvendo o arranjo oligomérico das Lys49-PLA₂ também foi analisada e de acordo com resultados da literatura, sugerimos que as formas monoméricas, no caso da Miotoxina ACL, sejam consequência do ambiente químico em que se encontram (particularmente pH e força iônica), e que a relevância deste estado para ativação dos efeitos de danos à membranas e miotóxico ainda parece elusiva.

Para ajudar a resolver esta questão, seriam necessários estudos do estado de oligomerização da Miotoxina ACL em força iônica baixa, sob diversas condições de pH, usando DLS, espalhamento de raios X a baixo ângulo, filtração em gel etc.

Os experimentos de RMN, analisando o complexo ácido graxo:proteína, parecem sugerir uma maior afinidade da Miotoxina ACL por ácidos graxos saturados, ligando estes de maneira mais efetiva dentro do canal hidrofóbico. Esta observação ainda preliminar poderia reforçar a suposição de que nas estruturas cristalográficas que se encontram em complexo com ácidos graxos, estes possuam, como realmente modelados, caráter saturado.

Essa provável seletividade poderia também explicar o fato da atividade catalítica residual para as Lys49-PLA₂ ser medida apenas em complexo com o ácido aracdônico, dando pistas de uma razão fisiológica para esta seleção, já que este último é bastante abundante em membranas de células de mamíferos, assim como vários outros ácidos graxos insaturados, principalmente na posição *sn*-2. As medidas de RMN de ¹³C₁ também demonstraram uma interação ácido graxo-proteína dominada por forças eletrostáticas. Este resultado é compatível com o papel dominante da interação da cabeça polar do ácido graxo com o nitrogênio do grupo amida da Gly30, que participa da ligação peptídica polarizada pela Lys122, destacando a importância deste resíduo.

Finalmente deve-se comentar que os resultados apresentados aqui são compatíveis com uma hipótese alternativa, a de que as Lys49-PLA₂ de fato, não possuam atividade catalítica, mas são apenas proteínas de ligação de ácidos graxos. Seja qual foi o mecanismo pelo qual o ácido graxo se encontra complexado ao sítio ativo (um ciclo catalítico interrompido ou seqüestro de ácidos graxos livres), o conjunto de estruturas cristalográficas atualmente disponível indica que o mesmo estabiliza uma conformação para o *loop* de ligação de Ca²⁺ e por consequência o C-terminal. Sugerimos aqui que esta conformação seja necessária para desencadear os efeitos tóxicos da miotoxina.

- APÊNDICE A -

MIOTOXINA ACL

Classificação

- **E.C.3.1.1.4**, definida pela *Enzyme Nomenclature*, NC-IUBMB, Academic Press, New York, (1992)

- Classe II Lys49-Fosfolipase A₂ extraída do veneno da serpente *Agkistrodon contortrix laticinctus*

Características Físico-Químicas

(Protparam: <http://us.expasy.org/cgi-bin/protparam>)

Número de aminoácidos: 121 Peso Molecular: 14023.2 Da PI teórico: 8.89

Composição atômica: C₆₀₉H₉₅₇N₁₆₉O₁₇₉S₁₆ (total de 1930 átomos)

Seqüência de aminoácidos

SLLELGKMIL QETGKNAITS YGSYGCNCGW GHRGQPKDAT DRCCFVHKCC YKKLTDCNHK
TDRYSYSWKN KAIICEEKNP CLKEMCECDK AVAICLRENL DTYNKKYKAY FKFKCKKPET
C

AMINOÁCIDO	QUANTIDADE	PORCENTAGEM (%)
Alanina (Ala ou A)	6	5,0
Arginina (Arg ou R)	4	3,3
Asparagina (Asn ou N)	7	5,8
Ácido Aspártico (Asp ou D)	6	5,0
Cisteína (Cys ou C)	14	11,6
Glutamina (Gln ou Q)	2	1,7
Ácido Glutâmico (Glu ou E)	8	6,6
Glicina (Gly ou G)	7	5,8
Histidina (His ou H)	3	2,5
Isoleucina (Ile ou I)	5	4,1
Leucina (Leu ou L)	8	6,6
Lisina (Lys ou K)	19	15,7
Metionina (Met ou M)	2	1,7
Fenilalanina (Phe ou F)	3	2,5
Prolina (Pro ou P)	3	2,5
Serina (Ser ou S)	5	4,1
Treonina (Thr ou T)	7	5,8
Triptofano (Trp ou W)	2	1,7
Tirosina (Tyr ou Y)	8	6,6
Valina (Val ou V)	2	1,7

- APÊNDICE B -

ALGUMAS DEFINIÇÕES IMPORTANTES EM CRISTALOGRAFIA, UTILIZADAS NESTE TRABALHO

INTENSIDADE, $I(hkl)$:

$$I(hkl) = \frac{e^4}{m^2 c^4 r^2} I_o \lambda^3 L P A \frac{V_x}{V_{cela}^2} |F(hkl)|^2$$

onde:

V_x - Volume do cristal atingido pela radiação, V_{cela} - Volume da cela unitária, I_o - Intensidade do feixe incidente, L - Fator de Lorentz, P - Fator de Polarização, A - Fator de Absorção, $F(hkl)$ - Fator de estrutura, λ - Comprimento de onda da radiação incidente, e - Carga do elétron, m - Massa do elétron, c - Velocidade da luz, r - Distância cristal-detector.

FATOR DE ESTRUTURA, $F(hkl)$:

$$F(hkl) = \sum_{j=1}^N f_j \exp[2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)] \exp[-B \sin^2 \frac{\theta}{\lambda^2}] = |F(hkl)|^2 [\exp i\alpha(hkl)]$$

onde:

N - Número de átomos na cela unitária, f - Fator de espalhamento atômico, xyz - Coordenadas fracionárias no espaço real, hkl - Índices de Miller (espaço recíproco), B - Fator de temperatura atômico, θ - Ângulo de Bragg, λ - Comprimento de onda da radiação incidente, $\alpha(hkl)$ - Fase do Fator de estrutura.

WILSON PLOT:

$$\ln \left[\frac{|F_{obs}(hkl)|^2}{\sum_{j=1}^N (f_j^o)^2} \right] = \ln K - 2B \sin^2 \frac{\theta}{\lambda^2}$$

onde:

N - Número de átomos na cela unitária, f^o - Fator de espalhamento atômico não-anômalo, $F_{obs}(hkl)$ - Fator de estrutura observado, K - Fator de escala, B - Fator de temperatura, θ - Ângulo de Bragg, λ - Comprimento de onda da radiação incidente.

FUNÇÃO DE PATTERSON, $P(uvw)$:

$$P(uvw) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |F(hkl)|^2 \exp[-2\pi i(hu + kv + lw)]$$

onde:

V - Volume da cela unitária, xyz - Coordenadas no espaço (cela) real, uvw - Coordenadas no espaço (cela) de Patterson, hkl - Índices de Miller (espaço recíproco), F(hkl) - Fator de estrutura.

FATOR DE ESTRUTURA CALCULADO A PARTIR DO MODELO, $F_{\text{calc}}(hkl)$:

$$F_{\text{calc}}(hkl) = \sum_{j=1}^N f_j^o \exp[2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)] \exp[-B \sin^2 \frac{\theta}{\lambda^2}]$$

onde:

N - Número de átomos na cela unitária, f^o - Fator de espalhamento atômico não-anômalo, xyz - Coordenadas fracionárias no espaço real, hkl - Índices de Miller (espaço recíproco), B - Fator de temperatura atômico, θ - Ângulo de Bragg, λ - Comprimento de onda da radiação incidente.

FUNÇÃO DE ROTAÇÃO, $\Re(uvw)$:

$$\Re(\theta_1 \theta_2 \theta_3) = \int_{\Omega} P_o(uvw) P_c(R_{(\theta_1 \theta_2 \theta_3)} u' v' w') du dv dw$$

onde:

uvw - Coordenadas no espaço (cela) de Patterson, $P_o(uvw)$ - Função de Patterson observada, $P_c(uvw)$ - Função de Patterson calculada, $R_{(\theta_1 \theta_2 \theta_3)}$ - Rotação aplicada sobre rθφ do modelo.

FUNÇÃO DE TRANSLAÇÃO, $T(uvw)$:

$$T(t_1 t_2 t_3) = \int_{\Omega} P_o(uvw) P_c(T_{(t_1 t_2 t_3)} u' v' w') du dv dw$$

onde:

uvw - Coordenadas no espaço (cela) de Patterson, $P_o(uvw)$ - Função de Patterson observada, $P_c(uvw)$ - Função de Patterson calculada, $T_{(t_1 t_2 t_3)}$ - Translação aplicada sobre uvw do modelo.

VOLUME DE MATTHEWS, V_M :

$$V_M = \frac{V_{\text{cela}}}{PM \times N_{\text{ua}} \times m}$$

onde:

V_{cela} - Volume da cela unitária, PM - Peso molecular da proteína, N_{ua} - Número de unidades assimétricas, m - Número de moléculas na unidade assimétrica.

DENSIDADE ELETRÔNICA, $\rho(\text{xyz})$:

$$\rho(\text{xyz}) = \frac{1}{V} \sum_{\text{hkl}} |F(\text{hkl})| \exp[-2\pi i(\text{hx} + \text{ky} + \text{lz}) + i\alpha(\text{hkl})]$$

onde:

V - Volume da cela unitária, F(hkl) - Fator de estrutura, xyz - Coordenadas fracionárias no espaço real, hkl - Índices de Miller (espaço recíproco), $\alpha(\text{hkl})$ - Fase do Fator de estrutura.

R-FACTOR (R):

$$R = \frac{\sum_{\text{hkl}} \left| |F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}| \right|}{\sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}}|}$$

onde:

F_{obs} - Fator de estrutura observado, F_{calc} - Fator de estrutura calculado.

FREE R-FACTOR (R_{free}):

$$R_T^{\text{free}} = \frac{\sum_{\text{hkl} \subset T} \left| |F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}| \right|}{\sum_{\text{hkl} \subset T} |F_{\text{obs}}|}$$

onde:

F_{obs} - Fator de estrutura observado, F_{calc} - Fator de estrutura calculado, $\text{hkl} \subset T$ representa todas as reflexões únicas pertencentes ao conjunto de teste T.