# EDSON CRUSCA JUNIOR

Estudos das propriedades estruturais de análogos substituídos com Trp<sup>2, 7 ou 24</sup> do fragmento com 30 resíduos da região amino-terminal da Esticolisina II

> Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

> > Orientador: Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli

Araraquara 2006

### FICHA CATALOGRÁFICA

C957e	Crusca Junior, Edson Estudos das propriedades estruturais de análogos substituídos com Trp 2, 7 ou 24 do fragmento com 30 resíduos da região N-terminal da Esticolisina II / Edson Crusca Junior. – Araraquara : [s.n], 2006 99 f. : il.
	Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Eduardo Maffud Cilli
	1. Peptídeos – Síntese em fase sólida. 2. Fluorescência. 3. Dicroísmo circular. 4. Citolisina. I. Título.

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

### **EDSON CRUSCA JUNIOR**

"Estudos das propriedades estruturais de análogos substituídos com Trp<sup>2, 7 ou 24</sup> do fragmento com 30 resíduos da região amino-terminal da Esticolisina II"

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

## **BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli UNESP – Instituto de Química

Prof. Dr. Clovis Ryuichi Nakaie UNIFESP – Universidade Federal Paulista

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Hosana Maria Debonsi Navickiene USP – Universidade de São Paulo

"A você que renunciou muito dos seus sonhos para que

eu pudesse viver os meus..."

Em memória de Márcia Elizabeth de Souza Crusca.

Que, eternamente, terá minha admiração e respeito.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu Pai, Edson Crusca, a quem devo todo meu respeito, presente em todos os momentos da minha vida.

Minhas irmãs Juliana, Janaina e Jaqueline que sempre acreditaram em mim e me apoiaram em todas as escolhas da minha vida.

Ao meus cunhados Renato e Newtinho.

Aos meus sobrinhos Tati, Pedro Henrique, Talitinha e Maria Eduarda.

À Juquinha, que faz minha vida ser mais feliz a cada dia que passamos juntos.

Ao Luisão e Janaísa, que compartilhamos da mesma amizade.

Ao Fred, Alex, Brandão e Brunão, pela amizade mesmo com os caminhos diferentes.

Ao Sr. Luis Carlos e D. Luci pelo aconchego do lar e pela confiança depositada em mim.

Ao Saulo, Eliane, Lentilha e Simone presentes desde o primeiro dia, durante toda a realização deste projeto.

Aos meus amigos Arnóbio, Najeh, Rubiana e Fernando César que acompanharam e me ajudaram com companheirismo até aqui.

"...um discípulo nunca pode imitar os passos de seu guia, porque cada um tem uma maneira de ver a vida, de conviver com as dificuldades e com as conquistas.
Ensinar é mostrar que é possível, aprender
é tornar possível a si mesmo."

## Eduardo

Obrigado por acreditar em mim quando eu achei difícil acreditar em mim mesmo. Obrigado por dizer, algumas vezes, o que eu realmente precisava ouvir e por ter me mostrado um outro lado a considerar. Palavras são poucas próximas de atos. Seus atos muito me ajudaram. Muito obrigado por sua ajuda.

### RESUMO

Este trabalho descreve a síntese, a relação estrutura-função, a interação com membranas e a atividade biológica de um peptídeo proveniente da região amino-terminal da proteína Esticolisina II (St II). Esta proteína é uma citolisina pertencente à família das actinoporinas, obtida da anêmona marinha Stichodactvla heliantus. Estudos estruturais e biológicos da proteína nativa indicam que a região amino-terminal da St II participa do processo de formação de poros em membranas. Deste modo, visando compreender o comportamento e a importância dessa região para a atividade biológica da St II, 3 análogos contendo os 30 primeiros resíduos que compõem a extremidade amino-terminal da St II foram sintetizados e analisados. Os peptídeos foram obtidos mediante síntese em fase sólida modificando-se um resíduo de leucina ou isoleucina por triptofano nas posições 2, 7 ou 24. Os estudos conformacionais foram realizados através das técnicas de fluorescência e dicroísmo circular. Para avaliar o comportamento estrutural dos peptídeos em solução, foram realizados estudos de variação de pH, força iônica e titulação com um agente indutor de estrutura, o trifluoroetanol (TFE). Na interação com miméticos de membranas, os peptídeos foram titulados por três tipos de detergentes: dodecil-sulfato de sódio (SDS), HPS (N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amônio-1-propano-sulfonato) e LPC (1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3fosfocolina). Complementando o estudo acima, também foram realizados experimentos utilizando acrilamida como agente supressor de fluorescência. Os resultados obtidos demonstram que a estratégia de síntese de peptídeos em fase sólida através do protocolo Fmoc/tBu, utilizada na síntese dos peptídeos deste trabalho, foi viável. O processo de purificação dos peptídeos através de HPLC também se mostrou eficiente e viabilizou a obtenção do material com alto índice de pureza - acima de 95%. Os resultados obtidos nos experimentos de atividade hemolítica, onde os 3 peptídeos mostraram atividade hemolítica na faixa de uM, reforçam a idéia de que a região amino-terminal composta dos 30 primeiros resíduos, desenvolve um papel importante na formação do poro em membranas. Os estudos de variação da força iônica e de pH, através de fluorescência, sugerem que a região do peptídeo mais sujeita a agregação é a N-terminal, mais especificamente próxima a posição 7 da seqüência. Os experimentos com TFE indicaram que os peptídeos sofrem alterações estruturais quando expostos a este solvente, passando de uma estrutura ao acaso para uma com maior teor de  $\alpha$ -hélice, condizente com a proteína nativa e com os dados de predição estrutural. Os estudos em micelas mostraram que todos os peptídeos estudados interagem com membranas, independente do pH. A análise dos dados obtidos por supressão de fluorescência indicam que, a região 24 do peptídeo, está mais inserida que à região amino-terminal nas micelas de SDS e HPS, enquanto que em LPC a região com menor inserção na membrana foi à próxima do 7° aminoácido. Conseguimos com este projeto desenvolver novos peptídeos, biologicamente ativos, que podem servir como sistemas mais simples para o estudo da formação de poros da membrana. Acreditamos que essas informações ajudarão a entender melhor o modo operante da proteína nativa, permitindo a proposição de um modelo mais preciso da formação dos poros em membranas da Esticolisina II e de seus análogos.

Palavra-chave: Síntese de peptídeo em fase sólida; Esticolisina II; fluorescência; dicroísmo circular

### ABSTRACT

In this study, we describe the synthesis, the relation function-structure, the interaction with membranes and the biological activity of the N-terminus region of the protein Sticholysin II (St II). This protein is a citolisin, which belongs to the family of the actinoporins, purified from the sea anemone Stichodactvla heliantus. According to biological and structural studies of the native protein, the N-terminus region of St II is involved on the pore formation process in membranes. In order to elucidate the function and the importance of this region to the biological activity of St II, three analogs containing the first 30 residues of the N-terminus region of St II were synthesized and analyzed. The peptides were obtained by solid phase synthesis and altered through the substitution of a leucine or isoleucine for a tryptophan on the positions 2, 7 and 24. Circular dichroism (CD) and tryptophan fluorescence studies have been carried out to investigate conformational properties of the peptides. In order to evaluate the structural modification on aqueous solution, studies were performed in order to evaluate the pH, ionic strength and addition of the secondary structural-inducing solvent TFE. The interaction studies with micelles were performed using three different surfactants: sodium dodecil-sulfate (SDS), N-hexadecyl-N,N-dimethyl-3-ammoniumpropanesulfonate (HPS) and lysophosphatidylcholine (LPC), and using acrylamide as a fluorescence suppression agent. We have demonstrated that on solid phase peptides synthesis using the Fmoc/tBu strategy is a success. The purification process of peptides through HPLC, has also revealed to be efficient, once the material was obtained with high purity level - above 95%. The experiments of hemolytic activity showed that the three peptides have activities in µM concentration, this results reinforce the idea that the 30 residues of the N-terminus region have an important role on pore formation in membranes. The studies of ionic strength and pH through fluorescence analysis suggest that the region of the peptide more susceptible for aggregation is the Nterminus, more specifically the 7<sup>th</sup> residue of the sequence. The experiments with increase of concentration TFE indicated that the peptides change conformational, with an increase of  $\alpha$ helices, as well as the native peptide and the predicted data. The studies with micelles showed that all peptides interact with membranes independently of pH. The analysis of the results obtained by fluorescence suppression indicate that the region 24 of the peptide is deeper than N-terminus region in SDS and HPS micelles. Besides, in LPC micelles the region lesser inserted in the membrane was near to 7<sup>th</sup> amino acid. With this project, it was possible to develop new biologically active peptides, which can be useful on studies of pore formation on membranes. Thus, a new interaction model of the peptide with the membrane was proposed to elucidate the mechanism of pore formation by the Sticholysin II and its analogs.

Key words: Peptide synthesis on solid phase, Esticolisina II, fluorescence, CD.

# LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Seqüência primária da proteína Esticolisina II	14
Figura 2. Seqüência primária das proteínas St I e St II	15
Figura 3. Representação da estrutura tridimensional da proteína St II.	16
Figura 4. Protocolo de síntese utilizado na obtenção dos peptídeos	
Figura 5. Diagrama de Jablonski. Modificado de Lakowicz, 1983.	
Figura 6. Estrutura química dos detergentes utilizados. SDS, HPS e LPC	
Figura 7. Espectros de CD característicos das estruturas secundárias.	
Figura 8. Perfil cromatográfico obtido, após purificação do peptídeo W2	
Figura 9. Perfil cromatográfico obtido, após purificação do peptídeo W7	
Figura 10. Perfil cromatográfico obtido, após purificação do peptídeo W24	
Figura 11. Espectro de massas obtido para os peptídeos puros W2, W7 e W24	
Figura 12. Cursos temporais da hemólise induzida pelos peptídeos W2, W7 e W24	
Figura 13. Espectros de fluorescência do peptídeo W2 em função do pH	
Figura 14. Espectros de fluorescência do peptídeo W7 em função do pH	
Figura 15. Espectros de fluorescência do peptídeo W24 em função do pH	
Figura 16. Variação do λmax de emissão para os peptídeos W2,W7 e W24, em função da variação do p	рН 45
Figura 17. Variação da intensidade de fluorescência para os peptídeos W2,W7 e W24, em função da v pH.	ariação do 46
Figura 18. Espectros de fluorescência do peptídeo W2 em função da concentração de NaCl.	
Figura 19. Espectros de fluorescência do peptídeo W7 em função da concentração de NaCl	46
Figura 20. Espectros de fluorescência do peptídeo W24 em função da concentração de NaCl.	
Figura 21. Variação do λmax de emissão para os peptídeos W2,W7 e W24, testados em função da co de NaCl	ncentração 49
Figura 22. Variação da intensidade de fluorescência para os peptídeos W2,W7 e W24, testados em concentração de NaCl	função da 49
Figura 23. Propensão dos peptídeos W2, W7 e W24 em formar α-hélice.	51
Figura 24. Diagrama de roda helicoidal para St II	
Figura 25. Espectros de fluorescência do peptídeo W2 em função da concentração de TFE	
Figura 26. Espectros de fluorescência do peptídeo W7 em função da concentração de TFE	
Figura 27. Espectros de fluorescência do peptídeo W24 em função da concentração de TFE	
Figura 28. Variação do λmax de emissão para os peptídeos W2,W7 e W24, em função da concentração	) de TFE. 54
Figura 29. Variação da intensidade de fluorescência para os peptídeos W2,W7 e W24, em concentração de TFE.	função da 54
Figura 30. Espectros de CD dos peptídeos estudados em solução aquosa em pH 4,0 de TFE	
Figura 31. Espectros de CD dos peptídeos estudados em solução de 60% de TFE	
Figura 32. Espectros de fluorescência do peptídeo W2, obtidos na titulação de SDS em pH 7,0	
Figura 33. Espectros de fluorescência do peptídeo W7, obtidos na titulação de SDS em pH 7,0	

Figura 34. Espectros de fluorescência do peptídeo W24, obtidos na titulação de SDS em pH 7,0	. 59
Figura 35. Variação do λmax de emissão para os peptídeos W2,W7 e W24, em função da concentração de SD em pH 7,0.	S . 60
Figura 36. Variação da intensidade de fluorescência para os peptídeos W2,W7 e W24, em função concentração de SDS em pH 7,0.	da . 60
Figura 37. Espectros de fluorescência do peptídeo W2, obtidos na titulação de SDS em pH 4,0	. 62
Figura 38. Espectros de fluorescência do peptídeo W7, obtidos na titulação de SDS em pH 4,0	. 62
Figura 39. Espectros de fluorescência do peptídeo W24, obtidos na titulação de SDS em pH 4,0	. 63
Figura 40. Variação do λmax de emissão para os peptídeos W2,W7 e W24, em função da concentração de S em pH 4,0.	DS . 63
Figura 41. Variação da intensidade de fluorescência para os peptídeos W2,W7 e W24, em função concentração de SDS em pH 4,0.	da . 64
Figura 42. Espectros de fluorescência do peptídeo W2, obtidos na titulação de SDS em pH 9,0	. 64
Figura 43. Espectros de fluorescência do peptídeo W7, obtidos na titulação de SDS em pH 9,0	. 65
Figura 44. Espectros de fluorescência do peptídeo W24, obtidos na titulação de SDS em pH 9,0	. 65
Figura 45. Variação do λmax de emissão para os peptídeos W2,W7 e W24, em função da concentração de S em pH 9 ,0.	DS . 66
Figura 46. Variação da intensidade de fluorescência para os peptídeos W2,W7 e W24, em função concentração de SDS em pH 9,0.	da . 66
Figura 47. Espectros de fluorescência do peptídeo W2, obtidos na titulação de HPS em pH 7,0	. 67
Figura 48. Espectros de fluorescência do peptídeo W7, obtidos na titulação de HPS em pH 7,0	. 68
Figura 49. Espectros de fluorescência do peptídeo W24, obtidos na titulação de HPS em pH 7,0	. 68
Figura 50. Variação do λmax de emissão para os peptídeos W2,W7 e W24, em função da concentração de F em pH 7,0.	IPS . 69
Figura 51. Variação da intensidade de fluorescência para os peptídeos W2,W7 e W24, em função concentração de HPS em pH 7,0.	da . 69
Figura 52. Espectros de fluorescência do peptídeo W2, obtidos na titulação de HPS em pH 4,0	. 70
Figura 53. Espectros de fluorescência do peptídeo W7, obtidos na titulação de HPS em pH 4,0	. 70
Figura 54. Espectros de fluorescência do peptídeo W24, obtidos na titulação de HPS em pH 4,0	.71
Figura 55. Variação do $\lambda$ max de emissão para os peptídeos W2,W7 e W24, em função da concentração de F em pH 4,0.	IPS . 71
Figura 56. Variação da intensidade de fluorescência para os peptídeos W2,W7 e W24, em função concentração de HPS em pH 4,0.	da . 72
Figura 57. Espectros de fluorescência do peptídeo W2, obtidos na titulação de HPS em pH 9,0	. 72
Figura 58. Espectros de fluorescência do peptídeo W7, obtidos na titulação de HPS em pH 9,0	. 73
Figura 59. Espectros de fluorescência do peptídeo W24, obtidos na titulação de HPS em pH 9,0	. 73
Figura 60. Variação do λmax de emissão para os peptídeos W2,W7 e W24, em função da concentração de F em pH 9,0.	IPS . 74
Figura 61. Variação da intensidade de fluorescência para os peptídeos W2,W7 e W24, em função concentração de HPS em pH 9,0.	da . 74
Figura 62. Espectros de fluorescência do peptídeo W2, obtidos na titulação de LPC em pH 7,0	. 76
Figura 63. Espectros de fluorescência do peptídeo W7, obtidos na titulação de LPC em pH 7,0	. 76
Figura 64. Espectros de fluorescência do peptídeo W24, obtidos na titulação de LPC em pH 7,0	. 77

Figura 65. Variação do λmax de emissão para os peptídeos W2,W7 e W24, em função da concentração de LPC em pH 7,0
Figura 66. Variação da intensidade de fluorescência para os peptídeos W2,W7 e W24, em função da concentração de LPC em pH 7,0
Figura 67. Espectros de fluorescência do peptídeo W2, obtidos na titulação de LPC em pH 4,078
Figura 68. Espectros de fluorescência do peptídeo W7, obtidos na titulação de LPC em pH 4,079
Figura 69. Espectros de fluorescência do peptídeo W24, obtidos na titulação de LPC em pH 4,079
Figura 70. Variação do λmax de emissão para os peptídeos W2,W7 e W24, em função da concentração de LPC em pH 4,0
Figura 71. Variação da intensidade de fluorescência para os peptídeos W2,W7 e W24, em função da concentração de LPC em pH 4,0
Figura 72. Espectros de fluorescência do peptídeo W2, obtidos na titulação de LPC em pH 9,081
Figura 73. Espectros de fluorescência do peptídeo W7, obtidos na titulação de LPC em pH 9,081
Figura 74. Espectros de fluorescência do peptídeo W24, obtidos na titulação de LPC em pH 9,082
Figura 75. Variação do λmax de emissão para os peptídeos W2,W7 e W24, em função da concentração de LPC em pH 9,0
Figura 76. Variação da intensidade de fluorescência para os peptídeos W2,W7 e W24, em função da concentração de LPC em pH 9,0
Figura 77. Espectros de fluorescência do peptídeo W2, obtidos na titulação de acrilamida em solução pH 7,086
Figura 78. Espectros de fluorescência do peptídeo W7, obtidos na titulação de acrilamida em solução pH 7,086
Figura 79. Espectros de fluorescência do peptídeo W24, obtidos na titulação de acrilamida em solução pH 7,0.87
Figura 80. Os gráficos a supressão de fluorescência pela acrilamida dos peptídeos W2,W7 e W24, em solução aquosa pH 7,0, onde $(F_0)$ é a fluorescência inicial e (F) fluorescência obtida
Figura 81. Os gráficos a supressão de fluorescência pela acrilamida dos peptídeos W2,W7 e W24, em solução pH 7,0 de SDS, onde ( $F_0$ ) é a fluorescência inicial e (F) fluorescência obtida
Figura 82. Os gráficos a supressão de fluorescência pela acrilamida dos peptídeos W2,W7 e W24, em solução pH 7,0 de HPS, onde ( $F_0$ ) é a fluorescência inicial e (F) fluorescência obtida
Figura 84. Os gráficos a supressão de fluorescência pela acrilamida dos peptídeos W2,W7 e W24, em solução pH 7,0 de LPC, onde ( $F_0$ ) é a fluorescência inicial e (F) fluorescência obtida
Figura 85. Mecanismo de ação proposto para a ação dos peptídeos estudados

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Seqüência primária dos peptídeos W2, W7 e W24 substituições......37

### LISTA DE ABREVIATURAS

- λmax comprimento de onda de máxima emissão
- ACN Acetonitrila
- A.H. Atividade hemolítica
- A.U. Unidade arbitrária
- Boc t-butiloxicarbonila
- CD Dicroísmo circular
- DCM Diclorometano
- Dic N,N'-diisopropilcarbodiimida
- DIEA N-Etildiisopropilamina
- DMF N,N Dimetilformamida
- EDT 1, 2-Etanoditiol
- Fmoc 9-fluorenilmetiloxcarbonil
- HATU hexafluorofosfato de 2-(1-H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio
- HOBt N-Hidroxibenzotriazol
- HPLC High performace liquid chromatography
- HPS N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amônio-1-propano-sulfonato
- Ksv Constante de Stern-Volmer
- LPC 1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina
- *m/z* Relação massa-carga
- NMP N-metil-pirrolidona
- SDS Dodecil-sulfato de sódio
- TBTU tetrafluoroborato de 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio
- TFA Ácido trifluoroacético
- TFE Trifluoroetanol
- St II 1-30 ALAGTIIAGASLTFQVLDKVLEELGKVSRK
- W2 AWAGTIIAGASLTFQVLDKVLEELGKVSRK
- W7 ALAGTIWAGASLTFQVLDKVLEELGKVSRK
- W24 ALAGTIIAGASLTFQVLDKVLEEWGKVSRK

# ÍNDICE

Resumo	VI	
Abstract	VII	
Índice de Figuras	VIII	
Índice de Tabelas	XI	
Índice de Abreviaturas	XII	
1. Introdução		
2. Objetivos		
3. Materiais e Métodos		
3.1. Síntese de peptídeos em fase sólida		
3.2. Purificação dos peptídeos		
3.3. Análise de aminoácidos		
3.4. Espectrometria de massas		
3.5. Atividade Biológica		
3.6. Fluorescência e UV		
3.6.1. Variação de pH		
3.6.2. Estudo de Força Iônica		
3.6.3. Estudo com Trifluoretanol (TFE)		
3.6.4. Estudo em Micelas		
3.6.5. Supressão por acrilamida		
3.6.6. Dicroísmo Circular		
4. Resultados e Discussões		
4.1. Síntese dos peptídeos		
4.2. Atividade Biológica		
4.3. Fluorescência e UV		
4.3.1. Variação do pH		
4.3.2. Força Iônica		
4.3.3. TFE		
4.3.4. Estudo em Micelas		
4.3.4.1. Micelas de SDS		
4.3.4.2. Micelas de HPS		
4.3.4.3. Micelas de LPC		
4.3.5. Estudo de Supressão de Fluorescência		
5. Conclusões		
6. Referências Bibliográficas		

### 1. INTRODUÇÃO

**O** recente progresso da indústria farmacêutica, relacionado com a descoberta e a produção de novos agentes antimicrobianos, não vem alcançando o sucesso desejado na contenção da mutagênese de resistência desenvolvida pelas bactérias. Enquanto os mecanismos de resistência criados por muitos desses micróbios vêm-se tornando cada dia mais eficazes, as drogas conhecidas mostram-se cada vez menos eficientes (YEAMAN; YOUNT, 2003).

Uma fonte de novas drogas são as toxinas secretadas por organismos vertebrados (como por exemplo algumas espécies de anuros e serpentes) e invertebrados (por exemplo, espécies de anêmonas e de escorpiões). A elucidação da estrutura química e seu mecanismo de ação é muito importante, não somente para o entendimento da base molecular do seu funcionamento e para o desenvolvimento de novas moléculas ativas, mas também no desenvolvimento de medidas preventivas, tais como, detecção, determinação e métodos terapêuticos (MYGIND et al., 2005).

As actinoporinas constituem um grupo de proteínas citolíticas (citolisinas), de massa molecular entre 18-20 kDa, que se inserem espontaneamente em membranas (PARKER; FEIL, 2005). Ao contrário das proteínas regulares de membrana, as actinoporinas são convertidas de uma forma solúvel em proteínas integrais de membrana, sem a ajuda de chaperonas e translocóns (HINDS et al., 2002), formando poros que causam o desequilíbrio osmótico da célula-alvo, resultando no rompimento de sua membrana plasmática. As actinoporinas apresentam importantes diferenças em relação às proteínas bacterianas que formam poros em membranas, como por exemplo, as famílias de  $\alpha$ -toxinas e leucocidinas estafilocóccicas, as aerolisinas e toxinas relacionadas de *Aeromonas*, colicinas e citolisinas colesterol-dependentes (HONG et al., 2002; KRISTAN et al., 2004). Elas são mais potentes, o poro formado é de menor tamanho e não apresenta estrutura estável, são extremamente resistentes à degradação proteolítica e ao contrário das toxinas formadoras de poros bacterianas, há pouca informação sobre o mecanismo destas citolisinas (HINDS et al., 2002).

A Esticolisina II (St II) (figura 1), pertencente à família das actinoporinas, é uma citolisina purificada da anêmona marinha *Stichodactyla heliantus*. Esta proteína foi isolada através da cromatografía de filtração em gel e de troca iônica e algumas de suas propriedades moleculares e funcionais têm sido estudadas desde então (TEJUCA et al., 1999).

Esta espécie de celenterado produz muitas toxinas polipeptídicas, que são secretadas através de células especializadas chamadas de nematócistos, presentes nos tentáculos das anêmonas. Essas substâncias desempenham um papel importante na defesa contra predadores, bem como a de imobilizar suas presas. Há alguns anos, esses polipeptídios despertaram o interesse de alguns autores em descobrir sua toxicidade (DEVLIN, 1974). Entre elas, já foram identificadas algumas neurotoxinas que afetam o canal de sódio-potássio, fosfolipases e fatores hemolíticos (BLUMENTHAL; KEM, 1983; KEM; DUNN, 1989; MARTINEZ et al., 2002).

# 1 ALAGTIIAGA SLTFQVLDKV LEELGKVSRK IAVGIDNESG GTWTALNAYF RSGTTDVILP 61 EFVPNTKALL YSGRKDTGPV ATGAVAAFAY YMSSGNTLGV MFSVPFDYNW YSNWWDVKIY 121 SGKRRADQGM YEDLYYGNPY RGDNG WHEKN LGYGLRMKGI MTSAGEAKMQ IKISR

Figura 1. Sequência primária da proteína Esticolisina II. Os quadrantes vermelho e azul, indicam respectivamente, a região amino-terminal e carboxi-terminal da proteína.

A St II é uma proteína de cadeia única, sem resíduos de cisteína, que se oligomeriza na superfície da membrana antes de perfurar a bicamada fosfolipídica. A análise de homologia com uma outra actinoporina, Esticolisina I (St I), indica 93% de similaridade, o que as classifica como isoformas de uma mesma citolisina (HUERTA et al., 2001). Em sua estrutura primária são observadas três substituições não-conservativas e nove conservativas - semiconservativas. Apesar da alta homologia de cadeia (figura 2), a St II apresenta atividade hemolítica (AH) consideravelmente maior que a de St I, tanto em termos de saída de K<sup>+</sup> interno de eritrócitos quanto da cinética de hemólise (MARTINEZ et al., 2001). Embora estas duas proteínas formem um poro de 1,0 nm de raio hidrodinâmico, o formado pela St II é ligeiramente maior (TEJUCA et al., 2001).

Esta capacidade diferente de formação de poros entre as esticolisinas tem sido explicada pela diferença de cargas na região amino-terminal, o que reduziria a velocidade de inserção de St I, diminuindo assim, sua capacidade hemolítica. Estas diferenças são: o ácido glutâmico na posição 2 e o ácido aspártico na posição 9 em St I substituídos por alanina; o ácido glutâmico 16 por glutamina, e a glicina 23 por ácido glutâmico; além disso, a St I exibe um resíduo de serina extra localizada na extremidade N-terminal (HUERTA et al., 2001).

StISELAGTIIDGASLTFEVLDKVLGELGKVSRKIAVGIDNESGGTWTALNAYF-StIIALAGTIIAGASLTFQVLDKVLEELGKVSRKIAVGIDNESGGTWTALNAYF-StIRSGTTDVILPEVVPNTKALLYSGRKSSGPVATGAVAAFAYYMSNGNTLGV-StIIMFSVPFDYNWYSNWWDVKIYPGKRRADQGMYEDMYYGNPYRGDNGWYQKNStIIMFSVPFDYNWYSNWWDVKIYPGKRRADQGMYEDMYYGNPYRGDNGWYQKNStIIMFSVPFDYNWYSNWWDVKIYSGKRRADQGMYEDLYYGNPYRGDNGWHEKN

Figura 2. Seqüência primária das proteínas St I e St II. Destacado em vermelho os aminoácidos que diferem de ambas as estruturas.

Espectros de dicroísmo circular (CD) de ambas as Esticolisinas (HUERTA et al., 2001; MANCHENO et al., 2001; MARTINEZ et al., 2001) demonstram que elas apresentam predominância da estrutura em folha  $\beta$ , com pequeno conteúdo de  $\alpha$ -hélice. A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), confirma essa posição de predominância de folha  $\beta$  (MENESTRINA; CABIAUX; TEJUCA, 1999). A maioria dos dados de fluorescência apresentados para St I e St II indicam que St II possui estrutura terciária ligeiramente mais aberta em pH neutro. Entretanto, as medidas espectroscópicas, análises de espectros CD e experimentos de estabilidade demonstram uma similaridade estrutural muito próxima.

Estudos recentes de cristalografia de raios-X demonstram que St II é uma proteína globular de dimensões 45 x 32 x 27 Å, constituída de um  $\beta$ -sanduíche, com dez estruturas em  $\beta$ -conformação ladeadas por duas seqüências em  $\alpha$ -hélice (figura 3) (MANCHENO et al., 2002).



Figura 3. Representação da estrutura tridimensional da proteína St II. Em destaque a extremidade amino-terminal (N) e a região carboxi-terminal (C) (MANCHENO et al., 2002).

Outros estudos conformacionais de St II demonstram que uma parte de sua estrutura (mais de 90%) se insere em membranas modelo em estado de bicamada ou não (LANIO et al., 2001; MARTINEZ et al., 2002). Mudanças da fluorescência intrínseca (do anel indol do triptofano) e nos espectros de CD em UV próximo na presença de vesículas de dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC): esfingomielina (SP) em temperaturas superiores e inferiores à temperatura de transição de fase comprovam a existência de, no mínimo, dois estados conformacionais da proteína ligada à membrana (LANIO et al., 2001; MARTINEZ et al., 2002). Foi demonstrado também que a esfingomielina é um receptor de baixa afinidade para ambas as proteínas, agindo no mecanismo de ligação entre a proteína e a membrana-alvo (MANCHENO et al., 2003; MARTINEZ et al., 2001; TEJUCA et al., 1996).

Das regiões da St II com maior potencial de estudo, a região amino-terminal mostra-se parte importante da proteína a ser analisada, dado o fato de: (1) ser a região mais variável de citolisinas de anêmonas (ANDERLUH; MACEK, 2002; ANDERLUH et al., 1997). Nesta extremidade, as substituições não-conservativas encontradas em St II em relação a St I encontram-se todas na face polar da  $\alpha$ -hélice anfipática amino-terminal; (2) experimentos de N-truncamento em uma citolisina relacionada (63% de identidade), Equinatoxina II (Eqt II), isolada da anêmona *Actinia equina*, sugerem que esta região fica inserida na membrana lipídica (ANDERLUH et al., 1997; HONG et al., 2002), hipótese corroborada pela determinação de sua estrutura tridimensional (MANCHENO et al., 2003) e (3) peptídeos contendo os 30 primeiros resíduos da região amino-terminal tem demonstrado AH, apesar de bem menor que a proteína nativa (CASALLANOVO et al., 2006). Fato este atribuído a ausência do "cluster" aromático, responsável pela interação do peptídeo com a membrana, especificamente com a esfingomielina.

Somando a isto, o conhecimento de que determinados segmentos de uma proteína são responsáveis por diferentes estágios da formação do poro, tais como afinidade com a

membrana, oligomerização, inserção e manutenção do poro, bem como de que parte desta proteína pode manter-se em contato com o meio aquoso enquanto outra parte permanece inserida na membrana, é de grande interesse acadêmico. Neste tipo de estudo a obtenção de segmentos da proteína através da síntese química é uma ferramenta importante. Além de ser indispensável para a descoberta de novas drogas, a química de peptídeos tem demonstrado grande utilidade para a pesquisa básica de proteínas, pois estes compostos podem ser utilizados para estudos correlacionando a estrutura e as funções biológicas de proteínas. Desta forma, a síntese de peptídeos de regiões chave da estrutura protéica é importante para compreensão de seu modo de ação. Essa técnica, juntamente com experimentos de mutação sítio-dirigida, constitui uma etapa crucial para uma compreensão mais completa da relação estrutura-função da proteína.

Estas descobertas geraram um enorme interesse por esta classe de compostos e por metodologias para seu isolamento, análise, purificação, identificação e quantificação, as quais passaram a ser sistematicamente estudadas e aprimoradas. Em paralelo, deparou-se com a necessidade de sintetizar estas moléculas e análogos (derivados com modificações pontuais) em escalas variadas, pois somente de posse dos sintéticos poder-se-ia realizar os estudos físiológicos, químicos, físicos, farmacológicos, bioquímicos e clínicos de grande parte dos peptídeos conhecidos.

Atualmente, três são os passíveis de serem empregados para a preparação destes compostos em número e escala variados: síntese química, síntese enzimática (ou biocatalisada) e síntese via DNA recombinante.

A síntese química é assim denominada porque utiliza um reagente químico para ativar o ácido carboxílico de um  $N^{a}$ -acil-aminoácido ou  $N^{a}$ -acil-fragmento peptídico (RCOOH, componente carboxílico, doador de acila ou agente acilante), o qual sofre o ataque nucleofílico do grupo a-amino de outro aminoácido ou fragmento peptídico  $C^{a}$ -bloqueados (H<sub>2</sub>N-R<sup>1</sup>, componente amínico, receptor de acila ou agente nucleofílico) resultando na formação da ligação peptídica entre eles (RCONHR<sup>1</sup>). Neste caso, os grupos funcionais reativos que não estão diretamente envolvidos na formação da ligação peptídica devem ser previamente protegidos ou bloqueados. Assim, a síntese torna-se mais controlada em relação à possível formação de subprodutos.

A síntese química pode ocorrer em duas modalidades: em solução (síntese clássica) ou na presença de um suporte polimérico (síntese de peptídeos em fase sólida; SPFS). Na primeira, geralmente a  $\alpha$ -carboxila do receptor de acila é esterificada ou amidada. Na SPFS, este grupo liga-se covalentemente ao suporte polimérico ou resina. A síntese clássica pode ocorrer na direção N $\rightarrow$ C-terminal ou vice-versa, enquanto que a SPFS geralmente ocorre na direção do C $\rightarrow$ N-terminal.

Em síntese de peptídeos, a formação de ligação amida entre dois aminoácidos ou fragmentos peptídicos é chamada de acoplamento. Uma maneira de promover esta reação é através do uso de um agente acilante que é gerado no meio reacional em presença do componente amínico, pela adição de um reagente ativador ou acoplador. Estes acopladores incluem etoxiacetileno, as carbodiimidas [DIC: *N,N*'-diisopropilcarbodiimida] ou sais de urônio [TBTU: tetrafluoroborato de 2-(1-*H*-benzotriazol-1-*il*)-1,1,3,3-tetrametilurônio] ou [HATU: hexafluorofosfato de 2-(1-*H*-7-azabenzotriazol-1-*il*)-1,1,3,3-tetrametilurônio] por exemplo.

Independentemente da modalidade, estratégia química ou do fato de a síntese ser feita individual ou paralelamente, a etapa final do processo sintético via método químico refere-se à desproteção total da seqüência em meio ácido (remoção de todos os grupos protetores) para a produção do peptídeo bruto livre que deverá ser devidamente analisado, purificado e caracterizado quimicamente. No caso da SPFS, esta etapa ocorre simultaneamente à clivagem do peptídeo do suporte polimérico funcionalizado (BODANSZKY, 1993), o que faz dessa técnica, ser mais atraente que o modelo clássico de síntese.

A obtenção de peptídeos através de métodos enzimáticos (biocatálise), se restringe no fato de não existir uma enzima universal, fazendo com que a metodologia não seja geral ou aplicável a qualquer seqüência peptídica. Já a técnica de DNA recombinante, apresenta estudos que relatam que a síntese destes compostos são trabalhosas, e que as metodologias empregadas não são igualmente eficientes para todas as seqüências. Assim, novas alternativas metodológicas têm sido buscadas para ambas técnicas.

Em razão dos motivos descritos acima e visando determinar o modo operante de ação das citolisinas, o presente trabalho apresenta a síntese através da fase sólida e a interação com membranas, de peptídeos oriundos da região amino-terminal da St II.

Os peptídeos sintetizados possuem os 30 primeiros resíduos da proteína, com modificações pontuais nas posições 2, 7 ou 24. Nas posições 2 e 24 os resíduos de leucina foram substituídos pelo triptofano (Trp); sendo que na posição 7 foi o resíduo de isoleucina. Esta modificação foi realizada para permitir o estudo das características estruturais e propriedades dinâmicas dos peptídeos através da técnica de fluorescência. A presença do Trp em diferentes localizações na estrutura do peptídeo permite determinar qual a região desta seqüência que interage mais profundamente com o modelo de membrana, resultando na obtenção de detalhes sobre o mecanismo de funcionamento de formação de poro. Estas posições foram avaliadas como parte de um estudo realizado em nosso laboratório para mapear todo o peptídeo, já analisados nas posições 12, 17 e 21 (SOUZA, 2006).

### 2. OBJETIVOS

**O** projeto de pesquisa desenvolvido durante o Mestrado abordou os aspectos estruturais do fragmento constituído pelos 30 primeiros resíduos da porção amino-terminal da Esticolisina II. Logo, o objetivo central do projeto foi obter informações, através de análises realizadas por fluorescência e CD, do mecanismo de formação de poros em membranas da proteína Esticolisina II.

Assim, para alcançar nossos objetivos, foram realizadas as seguintes etapas:

1) Síntese dos peptídeos W2, W7 e W24 através da síntese de peptídeos em fase sólida:

W2 - AWAGTIIAGASLTFQVLDKVLEELGKVSRK
W7 - ALAGTIWAGASLTFQVLDKVLEELGKVSRK
W24 - ALAGTIIAGASLTFQVLDKVLEEWGKVSRK

- Purificação e caracterização dos materiais obtidos acima através da cromatografia de alta eficiência, análise de aminoácidos e espectrometria de massas;
- 3) A avaliação da atividade hemolítica dos análogos obtidos;
- 4) Estudos da influência da variação do pH e da força iônica na estrutura desses fragmentos;
- 5) Estudos de CD em solução aquosa e na presença do indutor de estrutura TFE (pH 4,0).
- 6) Estudos de titulação com micelas e solventes indutores de estrutura em pH ácido (pH 4,0), neutro (pH 7,0) e alcalino (pH 9,0);
- 7) Estudos de supressão de fluorescência em solução e na presença de micelas;

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1.** SÍNTESE DE PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA

**A** síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) é baseada no crescimento da cadeia peptídica, um resíduo por vez, a partir de sua região amino-terminal (MERRIFIELD, 1963). A região carboxi-terminal, por sua vez, encontra-se ligada covalentemente a uma resina. Este tipo de síntese de peptídeos foi publicada em diversas revisões (ALBERICIO, 2000; ATHERTON et al., 1980; SARIN et al., 1980; STEWART, 1980).

Entre os protocolos utilizados na SPFS, o escolhido foi o método que utiliza o grupo 9-fluorenilmetoxicarbonila (Fmoc) para a proteção do grupo amino e os grupos terc-butila (tBu) para os aminoácidos serina, treonina, glutamato e asparartato; tritil (Trt) para glutamina; *terc*-butiloxicarbonila (Boc) para lisina e 2,2,5,7,8-pentametil-cromano-6-sulfonila (Pmc) para arginina, como protetores de cadeias laterais dos resíduos trifuncionais. O Fmoc tem a vantagem de ser base-lábil, o que significa que para a desproteção do grupo amino, a resina ligada ao peptídeo protegido é tratada com uma solução básica. Além disso, a ligação peptídeo-resina é passível de clivagem em condições ácidas mais fracas do que o segundo protocolo, isto é, a estratégia *t*-Butiloxicarbonila (Boc). Neste outro protocolo, o grupo  $\alpha$ amino é protegido pelo protetor Boc (ácido-lábil), e a clivagem para a liberação do peptídeo é realizada com o ácido fluorídrico, manipulação mais complicada (por ser um gás, armazenado liquefeito sob vácuo) além de ser altamente nocivo a saúde, capaz até de corroer materiais de vidro.

A resina utilizada como base para a síntese foi Rink-amida. O protocolo de síntese química utilizado consistiu de passos cíclicos seriados de acoplamento e desproteção do amino-grupo terminal (figura 4). O acoplamento foi realizado pela ativação dos grupos carboxila com DIC/HOBt ou TBTU/HOBt/DIEA ou HATU/HOBt/DIEA, durante duas horas sob agitação moderada. A desproteção do grupo Fmoc foi realizada pelo tratamento da resina com uma solução de *piperidina: DMF (2:8)* durante 20 minutos. Entre cada etapa da síntese, foram efetuadas lavagens da resina com os solventes orgânicos DMF (armazenado com peneira molecular) e DCM.

Após cada passo do processo de síntese - acoplamento e desproteção - a resina foi submetida ao teste de ninidrina. A ninidrina, em altas temperaturas, reage com grupos amino livres, liberando um composto de cor azul. Este teste é, portanto, adequado para indicar a presença de grupos amino livres e, por sua vez, indica a eficácia dos passos de desproteção e acoplamento.

A clivagem do peptídeo da resina foi realizada pelo tratamento com um coquetel (10 mL/g de peptidil-resina) contendo 5% de água *Milliq*, 2,5% de fenol, 2,5% de EDT e 5% de tioanisol (V/V) em 82,5% de TFA (KING et al., 1990), durante duas horas. Após esse período, os peptídeos foram precipitados com éter etílico gelado e tratados com mais duas porções de éter. Em uma segunda etapa de extração, o material, precipitado na placa porosa, foi solubilizado através do uso de uma solução de ácido acético 10%, para separá-lo da resina. Após esta etapa, a solução ácida obtida foi concentrada e liofilizada obtendo-se um pó branco que foi denominado como peptídeo bruto.



Figura 4. Protocolo de síntese utilizado na obtenção dos peptídeos.

#### 3.2. PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS

A purificação do material bruto foi realizada em modo semi-preparativo utilizando um HPLC System Gold BECKMAN, com coluna de fase reversa C18 Ultrasphere BECKMAN de dimensão 10 mm x 25 cm. O grau de pureza das frações foi determinado em um HPLC Prostar 400/Dynamax System VARIAN, com coluna 4,6 mm x 25 cm de fase reversa C18 Ultraspehere BECKMAN.

As condições cromatográficas foram:

#### **Modo Preparativo**

Solventes: A: 0,045% TFA . H<sub>2</sub>O

B: 0,036% TFA . ACN

Gradiente: 40% a 70% de solvente B em 90 minutos

Fluxo: 5 mL/min

Comprimento de onda de detecção: 220 nm.

#### **Modo Analítico**

Solventes: A: 0,045% TFA . H<sub>2</sub>O

B: 0,036% TFA . ACN

Gradiente: 5% a 95% de solvente B em 30 minutos

Fluxo: 1,5 mL/min

Comprimento de onda de detecção: 220 nm.

A confirmação do sucesso da síntese e purificação foi realizada através de análise de aminoácidos e por espectrometria de massas.

#### **3.3.** ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS

As análises de aminoácidos foram efetuadas pelo método da derivatização pós-coluna por *orto*-phtalaldeído (OPA) em um analisador automático Shimadzu LC-10A/C-47A. O sistema é periodicamente calibrado com uma mistura padrão de aminoácidos, obtendo-se um valor para o tempo de saída de cada aminoácido e um fator de conversão entre a área de cada pico e a concentração de aminoácidos da amostra.

Os peptídeos (0,2 - 1 mg) foram hidrolisados em 1mL de HCl 6 M, na presença de 0,08 mL de fenol a 5% em H<sub>2</sub>O, a 110°C por 72 horas em atmosfera de N<sub>2</sub>. Após a hidrólise, o material foi concentrado à vácuo, dissolvido em tampão de diluição NaS, pH 2,2 e filtrado em unidade filtrante GV Millex - Millipore antes de ser injetado no aparelho. As peptidil-resinas foram hidrolisadas em uma mistura de HCl (12 N)/ácido propiônico (1:1), a 130°C, por um período de aproximadamente 72 horas. Para o cálculo da proporção relativa dos aminoácidos da amostra, determinou-se a relação entre as suas concentrações unitárias e a média.

#### **3.4. ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Os espectros de massas foram obtidos em um sistema LC-MS Waters, constituído por um módulo de separação Alliance modelo 2690, detector "Photodiode Array" modelo 996, injetor automático com capacidade de 120 amostras acoplado à um espectrômetro de massas Micromass modelo ZMD controlado por uma workstation Compaq modelo AP200.

As condições experimentais foram:

Coluna Waters Nova-Pak C<sub>18</sub> (2,1 x 150 mm), 60 Å, 3.5 μm

**Solventes:** A: 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O

B: 75% ACN + 0,09% TFA/H<sub>2</sub>O

Eluição: 5% a 95% de B em 20 minutos

Fluxo: 0,4 mL/min

#### Comprimento de onda: 190-300 nm.

A técnica baseia-se em um analisador de massa quadrupolo que apresenta como resultado final à razão massa carga (m/z).

As medidas de espectrometria de massas foram realizadas na Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Biofísica, junto aos Prof. Dr. Clovis R. Nakaie e Prof. Dr. Antonio de Miranda.

Análises diretas das massas dos peptídeos, também foram realizadas por injeção direta em um aparelho Fisom Plataform – ESI com bomba Shimadzu LC – 10AD. Este equipamento está localizado no Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Departamento de Química Orgânica.

#### **3.5. ATIVIDADE BIOLÓGICA**

Os eritrócitos humanos foram preparados a partir da mistura do sangue total obtido de vários doadores voluntários, através de lavagem e ressuspensão em solução salina fisiológica tamponada (TBS: 145 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,4). A concentração da solução eritrocitária padrão foi ajustada com TBS até obter-se absorbância de 0,1 a 600 nm. As amostras de peptídeos foram diluídas duas vezes de maneira seriada, em microplacas de 96 poços de fundo plano. A quantidade de peptídeos variou entre 2 e 200 µM em um volume final de 200 µL. A reação hemolítica se iniciou pela adição da suspensão de eritrócitos.

A atividade hemolítica (AH) foi medida pela diminuição da turbidez da suspensão a 600 nm a 25  $\pm$  2°C por 60 minutos, utilizando um leitor de microplacas com agitação Multiscan EX (Labsystems, Finlândia).

Esta etapa foi realizada pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Carlos Álvares do Departamento de Bioquímica da Universidade de Havana – Cuba, no qual retêm o documento ético que trata as devidas considerações do processo de doação das amostras biológicas.

#### 3.6. FLUORESCÊNCIA E UV

Uma das metodologias experimentais mais utilizadas para estudar alterações conformacionais em proteínas e peptídeos é a espectroscopia de fluorescência (LAKOWICZ, 1983). Essa técnica se baseia na propriedade que alguns grupos, chamados cromóforos, possuem de emitir luz. Essa emissão de radiação eletromagnética é devida a transições eletrônicas entre estados eletrônicos excitados e estado fundamental. Mais especificamente, quando o estado excitado singleto ( $S_1$ ) decai para o estado singleto fundamental ( $S_0$ ) (CANTOR, 1980).

Além da fluorescência, ocorrem simultaneamente outros tipos de decaimento, como a conversão interna, a fosforescência e o cruzamento intersistemas. Estes processos, mostrados na figura 5, competem com a fluorescência, fazendo com que a intensidade da luz emitida dependa de sua ocorrência.

A fluorescência de peptídeos se origina dos resíduos aromáticos de triptofano e tirosina. A fenilalanina também apresenta fluorescência, mas possui um rendimento quântico muito baixo e, por isso, a emissão deste resíduo raramente é observada. Experimentos de fluorescência de peptídeos são feitos excitando-se no comprimento de onda do máximo de absorção, em torno de 280 nm, onde o espectro de emissão se deve à contribuição tanto de Tyr como de Trp. Contudo, é possível excitar-se seletivamente o Trp entre 295 e 305 nm. Devido ao fato desses peptídeos não possuírem resíduos de Tirosina e Fenilalanina a fluorescência foi devida somente ao resíduo de Triptofano.

Como os fluoróforos são sensíveis ao ambiente que os circunda, a interação destas moléculas com o meio pode alterar a energia do estado excitado e, conseqüentemente, a freqüência de emissão. Assim, propriedades como comprimento de onda de máxima emissão ( $\lambda$ max de emissão), rendimento quântico ( $\phi_F$ ), tempo de vida do fluoróforo ( $\tau_F$ ), e propriedades de polarização podem ser utilizadas para avaliar as propriedades estruturais dos peptídeos. Desta maneira, o Trp desempenha o papel de um fluoróforo para estudar o ambiente em torno do peptídeo.



Figura 5. Diagrama de Jablonski. As energias necessárias para a excitação são representadas na figura por  $hv_A$ , a energia resultante da fluorescência é dada por  $hv_F$  e a energia resultante do processo de fosforescência,  $hv_P$ . Modificado de Lakowicz, 1983.

A aquisição dos dados de fluorescência foi realizada em um espectrofotômetro de fluorescência Cary Eclipse VARIAN, e o comprimento de onda de excitação utilizado foi de 280 nm. O espectro de emissão de fluorescência foi adquirido em uma faixa de 300 a 500 nm, obtendo-se a intensidade de fluorescência e o comprimento de onda de emissão máxima para cada peptídeo e condição estudada.

Os espectros de fluorescência foram obtidos através do uso de uma solução aquosa de  $10 \ \mu$ M de peptídeos e com um volume de 600  $\mu$ L de volume. Inicialmente foi preparada uma solução estoque de peptídeo a qual foi utilizada em todos os experimentos.

A concentração das soluções utilizadas nos experimentos de fluorescência foi determinada inicialmente pela absorbância a 280 nm em um espectrofotômetro UV 1601 PC Shimadzu. O coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) utilizado foi de 5540 M<sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> (MACH et al., 1992). Os estudos espectrofotômetros foram todos realizados em uma sala com temperatura de 25°C.

A aquisição dos dados de absorbância em UV foi realizada em um espectrofotômetro UV 1601 PC Shimadzu de duplo feixe, instalado em um dos nossos laboratórios de pesquisa. O espectro de absorção foi obtido em uma faixa de 220 a 350 nm.

### 3.6.1. Variação de pH

O estudo foi realizado em duas etapas para amenizar a formação, pois a força iônica altera a estrutura conformacional do peptídeo. Dessa forma o pH da solução peptídica foi ajustada ou com solução de HCl ou NaOH. Na primeira etapa foi utilizada uma solução de HCl 2 M, à qual era gradativamente adicionada, com o auxílio de uma microseringa, à solução peptídica 10  $\mu$ M. Após a adição, esta mistura era homogeneizada e submetida a leitura do seu pH. Nessa primeira etapa a faixa de pH analisada foi de 2,0 até 4,0, medidas em intervalos de uma unidade de pH.

Na segunda etapa do experimento, uma segunda solução peptídica 10  $\mu$ M foi preparada, porém ao invés de se utilizar HCl utilizou-se NaOH 2 M, a fim de tornar o meio mais alcalino, repetindo-se todo o procedimento descrito acima. Nessa segunda etapa a faixa de pH analisada foi de 5,0 a 12,0.

Somando estes dois experimentos o intervalo de estudo foi de 2 a 12.

#### 3.6.2. Estudo de Força Iônica

No experimento de variação da força iônica foi utilizada uma solução NaCl de 2 M. A cada volume de solução salina que era adicionado, a solução peptídica era homogeneizada e posteriormente submetida as análises nos equipamentos de fluorescência e UV. O intervalo da concentração de NaCl foi de 0 a 383 mM.

### 3.6.3. Estudo com Trifluoretanol (TFE)

Fundamentalmente, o trifluoretanol (TFE) é um indutor de estrutura. Neste experimento, uma solução aquosa e outra de TFE, com concentração de 10  $\mu$ M de peptídeo cada, foram misturadas para a obtenção de soluções contendo diferentes proporções de TFE (0 - 60%). A porcentagem máxima de TFE, na solução, foi de 60%. A cada adição de TFE a amostra era homogeneizada e submetida à leitura de fluorescência e UV.

#### 3.6.4. Estudo em Micelas

Nos estudos com miméticos de membrana foram utilizados três tipos de micelas para avaliar o comportamento estrutural do peptídeo. São eles: o detergente aniônico, dodecilsulfato de sódio (SDS) da SIGMA e os detergentes zwitteriônicos (dipolares) N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amônio-1-propano-sulfonato (HPS) da SIGMA e o 1-palmitoil-2-hidroxi-snglicero-3-fosfocolina da AVANTI (figura 6).



Figura 6. Estrutura química dos detergentes utilizados. (a) SDS, (b) HPS e (c) LPC.

Foram preparadas soluções estoque concentradas dos detergentes (SDS 200 mM, HPS 100 mM e LPC 100 mM) as quais foram armazenadas sob refrigeração. Dessas soluções estoques foram retiradas pequenas alíquotas, necessárias para realização dos experimentos. Antes de iniciar cada experimento, a solução peptídica e a de detergente tiveram seu pH ajustado para pH 4,0; 7,0 e pH 9,0. Após os ajustes e homogeneização das soluções, estas foram submetidas às análises por UV e fluorescência.

As concentrações de detergentes utilizadas durante a titulação variaram de 0 a 50 mM para o SDS; de 0 a 10 mM para o HPS e de 0 a 10 mM para o LPC.

#### 3.6.5. Supressão por acrilamida

Para complementar os estudos de titulação e para obter maiores evidências sobre o mecanismo de formação de poro, realizamos experimentos de supressão de fluorescência, utilizando uma solução de acrilamida.

As análises foram realizadas em solução aquosa e na presença de micelas dos detergentes supra-citados. A concentração de peptídeo utilizada foi de 10 µM, e o volume

final da solução foi de 600  $\mu$ L. As concentrações de detergentes utilizadas foram: [SDS] = 50 mM, [HPS] = [LPC] = 10 mM. O aumento da concentração do apagador deu-se pela adição de uma solução de acrilamida 6 M, em alíquotas de 0,5  $\mu$ L em 0,5  $\mu$ L, até que a concentração final atingisse 50 mM.

#### 3.6.6. Dicroísmo Circular

Macromoléculas biológicas, tais como proteínas, carboidratos e ácidos nucléicos, são compostas de muitas unidades opticamente ativas ou enantiômeras (desviam o plano da luz polarizada para lados diferentes) que exibem sinal de Dicroísmo Circular (CD). Moléculas opticamente ativas interagem com a luz polarizada e provocam alteração na polarização da luz incidente. A técnica de CD detecta essa alteração através da medida da diferença da absorção da luz circularmente polarizada à direita (D, dextrógiro) e à esquerda (L, levógiro) após esta passar através de uma amostra. Em proteínas e em peptídeos os cromóforos responsáveis pelo espectro de CD são as ligações amida, os resíduos aromáticos de triptofano, tirosina e fenilalanina, e as pontes dissulfeto (SREERAMA; WOODY, 1994). Todos os aminoácidos, exceto a glicina, existem na forma L, caminhando pela "ponte" do grupo ácido, passando pelo carbono alfa ( $\alpha$ ) até o grupamento amina, o substituinte R do aminoácido fica à esquerda; se à direita, seria um D-aminoácido. Todos os aminoácidos utilizados na síntese dos peptídeos

A rotação ao redor da ligação O= C–NH da amida peptídica é restrita devido ao caráter de dupla ligação resultante da coplanaridade dos átomos CONH. Existem apenas duas ligações cuja rotação é permitida: C $\alpha$ -NH, cujo ângulo de rotação é  $\phi$  e C $\alpha$  - CO, cujo ângulo de rotação é  $\Psi$ . Os ângulos específicos  $\phi$  e  $\Psi$  são os responsáveis pelo espectro de CD

característico das estruturas secundárias,  $\alpha$ -hélice, folha  $\beta$  paralela e anti-paralela, vários tipos de dobras  $\beta$  e estrutura randômica.

Quando a proteína está enovelada, o arranjo tridimensional dos cromóforos afeta a estrutura eletrônica e, em conseqüência, o espectro da proteína ou peptídeo. Para as proteínas com estrutura ao acaso, as interações de longa distância são mínimas e seu espectro é composto das duas bandas,  $n \rightarrow \pi^*$  e  $\pi \rightarrow \pi^*$ . A estrutura  $\beta$  apresenta uma banda  $n \rightarrow \pi^*$  centrada em 215 nm e uma banda  $\pi \rightarrow \pi^*$  centrada em 196 nm, as quais são originadas pelos elétrons desemparelhados do oxigênio da carbonila. O espectro de uma  $\alpha$ -hélice possui essas mesmas bandas. Contudo, ele é mais complicado pois nele a transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  é desdobrada em  $\pi \rightarrow \pi^*$  ( $\perp$ ), centrada em 191 nm, e  $\pi \rightarrow \pi^*$ (//) centrada em 208 nm. A transição  $n \rightarrow \pi^*$  é deslocada para menor energia, centrada em 222 nm. Desta maneira, a forma do espectro de CD das proteínas depende do seu conteúdo de estrutura secundária. Isto permite que as proporções de hélices, estruturas  $\beta$ , alças (turns) e estrutura aleatória sejam determinadas. A figura 7 apresenta espectros característicos de CD das estruturas secundárias acima mencionadas.

Os espectros de CD foram adquiridos no Laboratório de Biologia Estrutural, do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP, São Paulo – SP, pelo aluno de Iniciação Científica, Felipe Jun, sob a supervisão da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Shirley Scherier, em um espectropolarímetro CD6 Jobin-Yvon, em celas de 1,0 mm de caminho óptico. O número de varreduras variou de acordo com o experimento. Em geral, utilizamos 4 varreduras por espectro com tempo de integração de 3 s por ponto. A concentração de peptídeo utilizada foi de 80 uM. Para todos os experimentos a leitura foi feita a cada 0,5 nm. O aparelho foi calibrado com ácido-(+)-10-canforsulfônico, conforme o manual do equipamento.


Figura 7. Espectros de CD característicos das estruturas secundárias (a) α-hélice, (b) folha β pregueada e (c) estrutura randômica (GREENFIELD; FASMAN, 1969).

# 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1. SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS

A síntese foi realizada em resina Rink-amida, de forma que o peptídeo obtido continha uma extremidade carboxi-amida. Este tipo de peptídeo mimetiza melhor a proteína, pois a ligação carboxi-amida simula a ligação peptídica desta extremidade com o corpo da proteína.

Os peptídeos foram sintetizados inicialmente de forma simultânea, por possuírem a região carboxi-terminal semelhante. A escala inicial de síntese foi de 1,65 mmol, com uma massa de resina de 3,0 g (grau de substituição da resina = 0,55 mmol/g).

A síntese foi realizada inicialmente da posição 30 a 25 da seqüência. Neste ponto a síntese foi interrompida e a resina dividida em duas partes: uma contendo 0,3 mmol/g, e que foi utilizada para o acoplamento do triptofano, seguido dos demais aminoácidos resultando ao final da síntese o peptídeo W24; no restante da resina continuou-se a síntese, obedecendo a seqüência original do peptídeo. A síntese foi novamente interrompida na posição 8, sendo novamente dividida em duas partes: na primeira seguiu-se o acoplamento do triptofano e dos aminoácidos seguintes, originando o peptídeo W7; o restante da resina foi utilizado para a obtenção do peptídeo W2, obtendo-se assim três peptídeos de 30 resíduos marcados com triptofano em três diferentes posições (tabela 1).

Fabela 1. Seqüência primária dos peptídeo	os W2, W7 e W24	e suas respectivas substituiçõe	es.
---	-----------------	---------------------------------	-----

Posiçá	ăo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
W 2	-	A	W	A	G	Т	Ι	Ι	A	G	А	S	L	Т	F	Q	v	L	D	K	v	L	Е	Е	L	G	K	v	S	R	K
W 7	-	A	L	A	G	Т	Ι	W	A	G	A	S	L	Т	F	Q	V	L	D	K	V	L	Е	Е	L	G	K	V	S	R	K
W 2 4	-	A	L	A	G	Т	Ι	Ι	A	G	A	S	L	Т	F	Q	V	L	D	K	V	L	Е	Е	W	G	K	V	S	R	K

Os peptídeos W2, W7 e W24 forma clivadas e apresentaram na forma pura, um rendimento de 28, 25 e 31%, respectivamente. Após o processo de purificação dos peptídeos, através HPLC, obteve-se um produto liofilizado com mais de 96% de grau de pureza. Os cromatogramas dos peptídeos puros em coluna de Fase Reversa C-18 estão mostrados nas figuras 8, 9 e 10.



Figura 8. Perfil cromatográfico obtido do peptídeo W2, após purificação via HPLC. Programa: 5-95 % B em 30 min. Solvente A: 0,045% TFA . H2O e B: 0,036% TFA . ACN. Fluxo de 1,5 mL e detecção em 220 nm.



Figura 9. Perfil cromatográfico obtido do peptídeo W7, após purificação via HPLC. Programa: 5-95 % B em 30 min. Solvente A: 0,045% TFA . H<sub>2</sub>O e B: 0,036% TFA . ACN. Fluxo de 1,5 mL e detecção em 220nm.



Figura 10. Perfil cromatográfico obtido do peptídeo W24, após purificação via HPLC. Programa: 5-95 % B em 30 min. Solvente A: 0,045% TFA . H<sub>2</sub>O e B: 0,036% TFA . ACN. Fluxo de 1,5 mL e detecção em 220 nm.

Os peptídeos obtidos foram caracterizados por espectrometria de massas e mostraram resultados coerentes com o teórico esperado. Os espectros obtidos para os peptídeos W2, W7 e W24, como o esperado, foram iguais, apresentando o mesmo peso molecular. O espectro obtido mostra além do pico de 3200 g/mol (carga +1), picos com valores de 1601 (Z=+2), 1068 (Z=+3) e 801 (Z=+4), comprovando a obtenção dos peptídeos (figura 11).



Figura 11. Espectro de massas obtido para os peptídeos puros W2, W7 e W24.

## 4.2. ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Os ensaios de atividade hemolítica (AH) demonstram que todos os peptídeos testados possuem a capacidade de lisar as hemáceas, observado pela queda na turbidez da suspensão dos eritrócitos com o tempo (Figura 12 – pg. 41). No entanto, a concentração necessária para obter a mesma atividade hemolítica é da ordem de  $\mu$ M para os peptídeos, enquanto para a proteína nativa é de nM (CASALLANOVO et al, 2006).

Embora todos peptídeos tenham apresentado atividade hemolítica, foram observadas diferenças entre eles, associadas às substituições de resíduos de Leu/Ile pelo Trp (figura 12). O inserto da Figura 12 mostra os valores do tempo necessário para se atingir 25% de lise das

hemácias (quanto menor  $t_{25}$  maior a capacidade hemolítica). As curvas de hemólise pelo tempo e os valores de  $t_{25}$  mostram a seguinte ordem de capacidade hemolítica W24>W2 $\geq$ W7>peptídeo nativo (sem triptofano). Ressaltamos, no entanto, que todos peptídeos apresentam atividade hemolítica na mesma ordem de grandeza, sendo que o peptídeo contendo o triptofano mais perto da extremidade carboxi-terminal (W24), mostrou a maior atividade hemolítica. Os resultados obtidos também mostraram que a adição do resíduo de triptofano aumenta a capacidade hemolítica das seqüências estudadas.

A capacidade de lisar as hemácias reforça a tese de que essa região é responsável pela formação dos poros, sendo que a baixa atividade comparada com a proteína total é atribuída ao fato que o sítio de ligação da St II com a superfície da membrana celular, acontece em outra região da proteína. Esta região de ligação têm sido descrita como um "cluster" de aminoácidos aromáticos composto por Tyr<sup>106</sup>, Trp<sup>110</sup>, Tyr<sup>111</sup>, e Trp<sup>114</sup> (provenientes do "loop" compreendido entre as folhas  $\beta 6 e \beta 7$ ), e Tyr<sup>131</sup>, Tyr<sup>135</sup>, e Tyr<sup>136</sup> da hélice  $\alpha 2$ . Estes resíduos são conhecidos por terem uma afinidade pelo grupo fosfocolina pertencente a esfingomielina existentes em membranas biológicas, tendo participação na fixação da proteína na membrana capacidade de formação de poros que a proteína nativa, isto é, o diâmetro do poro formado por este peptídeo (0,98 nm) é muito parecido para o medido com a proteína (0,99 nm), mostrando que estes 30 resíduos possuem atividade funcional similar a proteína que contém 175 aminoácidos (CASSALANOVO et al., 2006).

Desta forma, acreditamos que é viável a utilização desses peptídeos como modelos para o entendimento do mecanismo de ação hemolítica da Esticolisina II.



Figura 12. Cursos temporais da hemólise induzida pelos peptídeos que mimetizam a N-terminal da St II contendo Trp em suas estruturas. [Peptídeo] = 156 μM, buffer 10 mM Tris-HCl 140 mM NaCl, pH = 7.4. No inserto está colocado o tempo necessário para ocorrer a lise de 25% das hemácias.

# 4.3. FLUORESCÊNCIA E UV

O triptofano tem bastante espaço em estudos topográficos de proteínas, pois está presente em número relativamente baixo. A cadeia lateral deste aminoácido, anel indol, pode ser utilizada como sonda para determinar o grau de exposição do peptídeo, perturbação pelo solvente e modificações químicas (GHIRON et al., 1992). Desta maneira, as medidas realizadas devido à fluorescência do anel indólico do triptofano permitem obter pistas do comportamento do peptídeo em diferentes condições. O comprimento de onda de emissão dos fluoróforos ocorre em comprimentos de onda maiores do que os de absorção. Esta perda da energia entre a absorção e a emissão da luz é denominada deslocamento de Stokes. O  $\lambda$ max do grupo indol do aminoácido triptofano quando em meio aquoso ocorre em aproximadamente 355 nm, sendo que em proteínas nativas que contêm Trp pode variar de 308 a 355 nm (VIVIAN e CALLIS, 2001). Esta variação é devida a menor ou maior exposição do

fluoróforo ao ambiente que o circunda, sendo que em ambientes apolares o comprimento de onda de emissão é deslocado para valores menores.

Os primeiros testes foram realizados utilizando uma solução tampão de PBC (fosfato/borato/citrato) para a realização dos experimentos, mas devido à variação da estrutura do peptídeo com a força iônica (item 4.3.2), os estudos foram realizados em água.

Os estudos envolveram titulação com o solvente trifluoroetanol (TFE), que atua como indutor de estrutura secundária, bem como experimentos variando-se o pH e a força iônica (concentração de cloreto de sódio) do meio.

Análises também foram feitas utilizando-se miméticos de membranas através da titulação com detergente aniônico, dodecilsulfato de sódio (SDS), e com os detergentes zwitteriônicos N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amônio-1-propano-sulfonato (HPS) e 1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (LPC). Os parâmetros utilizados para analisar o comportamento estrutural do peptídeo foram o  $\lambda$ max de emissão e a razão F/F<sub>0</sub>, para os dados obtidos nos experimentos de fluorescência.

Dos parâmetros obtidos da fluorescência o mais considerado nas comparações entre os peptídeos foi o  $\lambda$ max de emissão, pois na intensidade de fluorescência as mudanças conformacionais dos peptídeos que podem ocorrer nestes experimentos, podem provocar uma maior ou menor aproximação das cadeias laterais dos aminoácidos do peptídeo, tais como Arg, Lys, Glu, Asp, Gln e Asn, com o grupo indol do triptofano afetando este parâmetro (CHEN; BARKLEY, 1998). No entanto, a razão F/F<sub>0</sub> foi utilizado para avaliar as alterações conformacionais de um mesmo peptídeo modificando-se uma determinada condição.

## 4.3.1. Variação do pH

Para avaliar a influência dos grupos ionizáveis do peptídeo em sua estrutura, foram realizadas medidas dos valores de fluorescência do peptídeo em solução aquosa numa faixa de pH de 2 a 12.

Os experimentos de titulação do pH demonstram que, entre pH 7,0 e 10,0 ocorrem as maiores alterações conformacionais do peptídeo, independente da posição do triptofano, visto que os valores de  $\lambda$ max de emissão para todas as seqüências diminuem neste intervalo. Estes dados indicam que a cadeia lateral do resíduo de triptofano está menos exposta ao ambiente aquoso. Essa alteração estrutural se agrava até valores próximos de pH 10,0 (figura 13, 14 e 15) onde atinge os menores valores de  $\lambda$ max de emissão, indicando proximidade com seu ponto isoelétrico (pI). O pI teórico deste peptídeo é de 10,2 justificando o comportamento acima, pois com carga zero, este está mais sujeito a agregações intermoleculares (menor repulsão).

Comparando-se os peptídeos estudados, o W24 apresentou menor variação do λmax de emissão com a alteração do pH, enquanto o mais afetado foi o W7. O triptofano na posição 7 ficou menos exposto à água com o aumento do pH, seguido pelo W2 (figura 16 e 17), indicando maior agregação do peptídeo nestas regiões em relação a posição 24.

Os dados obtidos indicam que, com o aumento de pH a região do peptídeo que mais sofre agregação é a amino-terminal, coerente com a natureza apolar dos dez primeiros resíduos da seqüência, talvez indicando a região onde inicia a interação dos peptídeos entre si e com a membrana para a formação do poro (CASALLANOVO et al., 2006).



Figura 13. Espectros de fluorescência do peptídeo W2 em função do pH.



Figura 14. Espectros de fluorescência do peptídeo W7 em função do pH.



Figura 15. Espectros de fluorescência do peptídeo W24 em função do pH.



Figura 16. Variação do λmax de emissão para os peptídeos W2 (■),W7 (●) e W24 (▲), em função da variação do pH.

Os dados obtidos para o  $\lambda$ max estão coerentes com os encontrados com a variação dos valores de intensidade de fluorescência (Figura 17). A alteração da razão F/F<sub>0</sub> mostra a variação da estrutura dos peptídeos em função do pH, mais acentuadamente em pH básico, como encontrado para o  $\lambda$ max. Destacamos que o peptídeo W24 também apresentou alteração neste parâmetro no intervalo de pH entre 4,0 e 6,0, provavelmente devido a proximidade desta posição a resíduos de ácido glutâmico (posições 22 e 23) que possuem pK teórico de 4,5.



Figura 17. Variação da intensidade de fluorescência para os peptídeos W2 (■),W7 (●) e W24 (▲), em função da variação do pH.

## 4.3.2. Força Iônica

Para avaliar a influência da força iônica do meio, foram realizadas titulações do peptídeo com um solução de NaCl. A diminuição dos valores de  $\lambda$ max de emissão com o aumento da força iônica, nos indica que a exposição do resíduo de Trp segue a seguinte ordem: posição 24 < 2 < 7 (figura 18 a 22). Desta maneira, é possível observar, como

encontrado no estudo anterior, que a região N-terminal, principalmente a próxima da posição 7, é mais propensa à agregação.

Estes dados estão coerentes com os apresentados para a citolisina Equinatoxina II (EqTx II), que com aumento da concentração de sal tende a se agregar (ULRIH et al., 2004), sendo que a região N-terminal pode ser um dos pontos desta agregação.



Figura 18. Espectros de fluorescência do peptídeo W2 em função da concentração de NaCl.



Figura 19. Espectros de fluorescência do peptídeo W7 em função da concentração de NaCl.



Figura 20. Espectros de fluorescência do peptídeo W24 em função da concentração de NaCl.



Figura 21. Variação do λmax de emissão para os peptídeos W2 (■),W7 (●) e W24 (▲), testados em função da concentração de NaCl.



Figura 22. Variação da intensidade de fluorescência para os peptídeos W2 (■),W7 (●) e W24 (▲), testados em função da concentração de NaCl.

Estudos de determinação estrutural da proteína St II por RMN e Raios X (MANCHENO et al., 2002), sugerem que a região amino-terminal possui um alto teor de  $\alpha$ hélice. Somando-se a isto a disposição dos aminoácidos na següência peptídica, é possível sugerir que os peptídeos estejam arranjados como  $\alpha$ -hélices anfipáticas (uma face com resíduos polares e outra com resíduos apolares) de acordo com o modelo de roda helicoidal de Schiffer e Edmundson (SCHIFFER e EDMUNSON, 1967). A previsão da estrutura para os peptídeos utilizando o programa Predict Protein Server (figura 23), disponível no site: http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\_automat.pl?page=npsa\_sopma.html, indica que а estrutura observada na proteína é semelhante para as seqüências estudadas. Isto é, todos os peptídeos apresentam grande propensão em assumir a conformação de  $\alpha$ -hélice, principalmente dos resíduos 13 ao 23. O diagrama de roda helicoidal destes peptídeos (figura 24) mostra que a  $\alpha$ -hélice formada seria do tipo anfipática, com uma face polar e uma apolar, com os resíduos de 1 a 8 fora desta regra.

Para avaliar na prática a capacidade deste peptídeo em adquirir este tipo de estrutura, utilizamos o solvente trifluoretanol (TFE) (SONNICHSEN et al., 1992). Esse solvente possui a polaridade semelhante à encontrada na membrana, sendo utilizado como um simulador deste tipo de ambiente, além de ser um solvente indutor de estrutura (ROCCATANO et al., 2002). A titulação do peptídeo com TFE (figuras 25, 26 e 27), apesar de causar apenas pequenas alterações nos valores de  $\lambda$ max de emissão obtidos através dos espectros de fluorescência, que juntamente com a variação da intensidade (razão F/F<sub>0</sub>), indica mudanças conformacionais na estrutura nativa dos peptídeos. As alterações na estrutura foram encontradas no intervalo de 10% a 40% de TFE (figuras 28 e 29), estabilizando após esssa concentração de álcool.



Figura 23. Propensão dos peptídeos W2, W7 e W24 em formar  $\alpha$ -hélice.



Figura 24. Diagrama de roda helicoidal para St II, que demonstra a posição espacial dos resíduos de aminoácidos, com destaque para os resíduos Leu (L2, I7 e L24), que foram substituídos por um resíduo de Trp.



Figura 25. Espectros de fluorescência do peptídeo W2 em função da concentração de TFE.



Figura 26. Espectros de fluorescência do peptídeo W7 em função da concentração de TFE.



Figura 27. Espectros de fluorescência do peptídeo W24 em função da concentração de TFE.



Figura 28. Variação do λmax de emissão para os peptídeos W2 (■),W7 (●) e W24 (▲), em função da concentração de TFE.



Figura 29. Variação da intensidade de fluorescência para os peptídeos W2 (■),W7 (●) e W24 (▲), em função da concentração de TFE.

Como os espectros de fluorescência indicaram a ocorrência de uma mudança estrutural, mas não o tipo de alteração, estes peptídeos foram analisados por dicroísmo circular (CD), uma técnica capaz de identificar o tipo de estrutura na molécula.

Inicialmente analisamos os peptídeos em solução em água com pH 4,0 (figura 30). Nesta condição podemos observar que todas as seqüências apresentam estrutura ao acaso ("random coil") – banda negativa em 202 nm - com uma pequena quantidade  $\alpha$ -hélice – banda negativa ao redor de 222 nm. A adição de TFE, até atingir 60 % do conteúdo da solução (Figura 31), provoca um aumento do teor de  $\alpha$ -hélice dos peptídeos caracterizado pelo aparecimento/aumento de duas bandas negativas, em 208 e 222 nm, e uma positiva em 191 nm. Desta forma, a análise dos espectros de CD destes peptídeos confirma a propensão de todos os peptídeos adquirirem conformação em  $\alpha$ -hélice, incluindo o peptídeo original. Este achado reforça o fato que estes peptídeos marcados com triptofano podem ser utilizados como modelos para o entendimento do modo de ação da St II, pois todos tendem a ter o mesmo tipo de estrutura. Destacamos, no entanto, que a proporção de  $\alpha$ -hélice foi diferente para os peptídeos estudados, tendo os contendo triptofano um maior teor desta estrutura. Este dado pode estar relacionado com a maior capacidade hemolítica destes peptídeos marcados com triptofano em relação ao peptídeo nativo.



Figura 30. Espectros de CD dos peptídeos estudados em solução aquosa em pH 4,0 de TFE.



Figura 31. Espectros de CD dos peptídeos estudados em solução de 60% de TFE.

### 4.3.4. Estudo em Micelas

Iniciando os estudos de interação dos peptídeos com sistemas que mimetizam a membrana celular, neste tópico utilizamos os 3 tipos de detergentes descritos em "materiais e métodos" para a formação de micelas.

Para obtermos maiores evidências sobre o mecanismo de inserção do fragmento as análises foram realizadas em condição neutra (pH 7,0), ácida (pH 4,0) e alcalina (pH 9,0).

#### 4.3.4.1. Micelas de SDS

O primeiro detergente estudado foi o SDS, que forma micelas aniônicas, em pH 7,0. A queda dos valores de  $\lambda$ max de emissão, migração para um ambiente mais apolar, demonstrou que todos os peptídeos interagem com as micelas de SDS (figura 32 a 35). Entretanto, ao contrário do esperado para um ambiente mais apolar, como o micelar, a intensidade de fluorescência decai para os três peptídeos com o aumento da concentração de SDS (figura 36). Atribuímos este fato às mudanças conformacionais sofridas pelo peptídeo, o que pode causar uma maior ou menor aproximação das cadeias laterais de alguns aminoácidos com o grupo indol do Triptofano, alterando a intensidade de fluorescência (CHEN; BARKLEY, 1998). Ressaltamos, no entanto, que estas mudanças conformacionais não foram as únicas responsáveis pela grande diminuição de  $\lambda$ max encontrada na titulação com SDS (> 10 nm), pois em TFE, apesar da estruturação do peptídeo em  $\alpha$ -hélice a variação do  $\lambda$ max foi de aproximadamente 2 nm.

Analisando a interação do peptídeo com o SDS ponto a ponto, podemos observar que a seqüência contendo triptofano na posição 2 apresenta uma queda inicial brusca no  $\lambda$ max em concentrações baixas de SDS. Como nesta concentração não há detergente suficiente para a formação de micelas (CMC  $\approx 8$  mM), esta diminuição do  $\lambda$ max deve ser provocada pela

interação de monômeros de SDS com o peptídeo. Em concentrações de detergentes acima de aproximadamente 8 mM os valores de  $\lambda$ max se estabilizam, indicando uma mesma interação do peptídeo com o detergente, independente de sua quantidade, que a partir deste valor se encontra na forma de micelas. A interação do peptídeo com monômeros de SDS não foi visualizada para os peptídeos W7 e W24.



Figura 32. Espectros de fluorescência do peptídeo W2, obtidos na titulação de SDS em pH 7,0.



Figura 33. Espectros de fluorescência do peptídeo W7, obtidos na titulação de SDS em pH 7,0.



Figura 34. Espectros de fluorescência do peptídeo W24, obtidos na titulação de SDS em pH 7,0.



Figura 35. Variação do λmax de emissão para os peptídeos W2 (■),W7 (●) e W24 (▲), em função da concentração de SDS em pH 7,0.



Figura 36. Variação da intensidade de fluorescência para os peptídeos W2 (■),W7 (●) e W24 (▲), em função da concentração de SDS em pH 7,0.

Comparando-se os valores de  $\lambda$ max para os três peptídeos estudados, podemos sugerir que a região 24 do peptídeo está mais imersa na micela, pois apresenta o menor comprimento de onda de emissão em comparação com os demais.

A alteração do pH para 4,0 – ácido - ou 9,0 – básico - (figuras 37 a 46) não alterou significativamente os resultados obtidos em pH 7,0. Isto é, todos os peptídeos interagem com as micelas, apresentando na posição 24 a maior interação. Em pH 4,0 podemos observar que além do peptídeo W2, os demais também interagem com os monômeros de SDS em concentrações menores que a CMC (figura 40). Podemos atribuir o aparecimento desta interação para os peptídeos W7 e W24 a uma maior protonação do grupo  $\alpha$ -amino, favorecendo a formação de uma ponte salina entre o grupo negativo do SDS e o  $\alpha$ -grupo (positivo) facilitando uma agregação entre a cauda apolar do SDS com os 10 primeiros resíduos apolares do peptídeo.

Comparando-se os valores de comprimento de onda de máxima emissão, nos diversos pHs estudados, não foi possível observar uma clara dependência entre o pH e a imersão na micela, apresentando os peptídeos valores de  $\lambda$ max parecidos após a CMC independente da concentração hidrogeniônica.

Os resultados acima descritos indicam que todos os peptídeos estão imersos nas micelas, comprovando a capacidade destes de interagirem com membrana e indicando um provável mecanismo de ação, onde tanto a extremidade amino-terminal como a carboxiterminal da cadeia peptídica interage com a membrana.



Figura 37. Espectros de fluorescência do peptídeo W2, obtidos na titulação de SDS em pH 4,0.



Figura 38. Espectros de fluorescência do peptídeo W7, obtidos na titulação de SDS em pH 4,0.



Figura 39. Espectros de fluorescência do peptídeo W24, obtidos na titulação de SDS em pH 4,0.



Figura 40. Variação do λmax de emissão para os peptídeos W2 (■),W7 (●) e W24 (▲), em função da concentração de SDS em pH 4,0.



Figura 41. Variação da intensidade de fluorescência para os peptídeos W2 (■),W7 (●) e W24 (▲), em função da concentração de SDS em pH 4,0.



Figura 42. Espectros de fluorescência do peptídeo W2, obtidos na titulação de SDS em pH 9,0.



Figura 43. Espectros de fluorescência do peptídeo W7, obtidos na titulação de SDS em pH 9,0.



Figura 44. Espectros de fluorescência do peptídeo W24, obtidos na titulação de SDS em pH 9,0.



Figura 45. Variação do λmax de emissão para os peptídeos W2 (■),W7 (●) e W24 (▲), em função da concentração de SDS em pH 9 ,0.



Figura 46. Variação da intensidade de fluorescência para os peptídeos W2 (■),W7 (●) e W24 (▲), em função da concentração de SDS em pH 9,0.

## 4.3.4.2. Micelas de HPS

Continuando os estudos com miméticos de membrana, analisamos a interação do peptídeo com o detergente HPS, que diferente das micelas formadas pelo SDS (carregadas negativamente), forma agregados dipolares.

Os dados de HPS indicam (figuras 47 a 61), como o observado para os SDS, que independente do pH, há interação de todos os peptídeos com a membrana, indicando novamente uma imersão tanto da extremidade amino-terminal (resíduos 2 e 7) como da carboxi-terminal (resíduo 24) com a membrana. Neste detergente não foi possível distinguir qual dos peptídeos apresentou maior interação, pois todos apresentaram valores de  $\lambda$ max parecidos após a interação com as micelas.



Figura 47. Espectros de fluorescência do peptídeo W2, obtidos na titulação de HPS em pH 7,0.



Figura 48. Espectros de fluorescência do peptídeo W7, obtidos na titulação de HPS em pH 7,0.



Figura 49. Espectros de fluorescência do peptídeo W24, obtidos na titulação de HPS em pH 7,0.



Figura 50. Variação do λmax de emissão para os peptídeos W2 (■),W7 (●) e W24 (▲), em função da concentração de HPS em pH 7,0.



Figura 51. Variação da intensidade de fluorescência para os peptídeos W2 (■),W7 (●) e W24 (▲), em função da concentração de HPS em pH 7,0.



Figura 52. Espectros de fluorescência do peptídeo W2, obtidos na titulação de HPS em pH 4,0.



Figura 53. Espectros de fluorescência do peptídeo W7, obtidos na titulação de HPS em pH 4,0.


Figura 54. Espectros de fluorescência do peptídeo W24, obtidos na titulação de HPS em pH 4,0.



Figura 55. Variação do λmax de emissão para os peptídeos W2 (■),W7 (●) e W24 (▲), em função da concentração de HPS em pH 4,0.



Figura 56. Variação da intensidade de fluorescência para os peptídeos W2 (■),W7 (●) e W24 (▲), em função da concentração de HPS em pH 4,0.



Figura 57. Espectros de fluorescência do peptídeo W2, obtidos na titulação de HPS em pH 9,0.



Figura 58. Espectros de fluorescência do peptídeo W7, obtidos na titulação de HPS em pH 9,0.



Figura 59. Espectros de fluorescência do peptídeo W24, obtidos na titulação de HPS em pH 9,0.



Figura 60. Variação do λmax de emissão para os peptídeos W2 (■),W7 (●) e W24 (▲), em função da concentração de HPS em pH 9,0.



Figura 61. Variação da intensidade de fluorescência para os peptídeos W2 (■),W7 (●) e W24 (▲), em função da concentração de HPS em pH 9,0.

## 4.3.4.3. Micelas de LPC

O último detergente a ser estudado foi o LPC, que também é dipolar, mas apresenta vetor de polaridade diferente do HPS. No LPC a carga negativa fica mais próxima da cadeia acila. Este detergente difere dos lipídeos por conter uma única cauda acila e, portanto, não forma a bicamada, mas apresenta uma cabeça polar com um fosfato ligado à cauda acila e a um grupo colina, o que o torna quimicamente próximo à fosfatidilcolina, um fosfolipídeo presente na membrana celular de diversos tecidos vivos.

Os dados de fluorescência obtidos da titulação neste detergente em pH 7,0, corroboram os resultados obtidos em HPS, mostrando novamente que o peptídeo está como um todo inserido na micela, indicado pela queda do valor de  $\lambda$ max de emissão (figuras 62 a 76) com a formação da micela.

Interessante notar com este detergente uma menor interação do peptídeo W7, mostrando uma dependência da composição da micela na interação com os peptídeos. Os peptídeos contendo triptofano nas posições 2 e 24 mostraram inserção semelhante na membrana. Desta forma em LPC, a estrutura do peptídeo parece estar na forma de um grampo, com a posição 7 mais inserida na micela e as demais mais próximas da superfície.



Figura 62. Espectros de fluorescência do peptídeo W2, obtidos na titulação de LPC em pH 7,0.



Figura 63. Espectros de fluorescência do peptídeo W7, obtidos na titulação de LPC em pH 7,0.



Figura 64. Espectros de fluorescência do peptídeo W24, obtidos na titulação de LPC em pH 7,0.



Figura 65. Variação do λmax de emissão para os peptídeos W2 (■),W7 (●) e W24 (▲), em função da concentração de LPC em pH 7,0.



Figura 66. Variação da intensidade de fluorescência para os peptídeos W2 (■),W7 (●) e W24 (▲), em função da concentração de LPC em pH 7,0.



Figura 67. Espectros de fluorescência do peptídeo W2, obtidos na titulação de LPC em pH 4,0.



Figura 68. Espectros de fluorescência do peptídeo W7, obtidos na titulação de LPC em pH 4,0.



Figura 69. Espectros de fluorescência do peptídeo W24, obtidos na titulação de LPC em pH 4,0.



Figura 70. Variação do λmax de emissão para os peptídeos W2 (■),W7 (●) e W24 (▲), em função da concentração de LPC em pH 4,0.



Figura 71. Variação da intensidade de fluorescência para os peptídeos W2 (■),W7 (●) e W24 (▲), em função da concentração de LPC em pH 4,0.



Figura 72. Espectros de fluorescência do peptídeo W2, obtidos na titulação de LPC em pH 9,0.



Figura 73. Espectros de fluorescência do peptídeo W7, obtidos na titulação de LPC em pH 9,0.



Figura 74. Espectros de fluorescência do peptídeo W24, obtidos na titulação de LPC em pH 9,0.



Figura 75. Variação do λmax de emissão para os peptídeos W2 (■),W7 (●) e W24 (▲), em função da concentração de LPC em pH 9,0.



Figura 76. Variação da intensidade de fluorescência para os peptídeos W2 (■),W7 (●) e W24 (▲), em função da concentração de LPC em pH 9,0.

## 4.3.5. Estudo de Supressão de Fluorescência

A supressão de fluorescência é um processo no qual estudamos a diminuição da intensidade de emissão de fluorescência sob a ação de apagadores. A acessibilidade destes grupos supressores ou "quenchings" à proteína, tem como característica fundamental perturbar a intensidade de emissão de fluorescência dos fluoróforos, permitindo um estudo comparativo das mudanças estruturais induzidas por diferentes meios.

Para obter maiores detalhes em relação à inserção dos peptídeos nas micelas, estudamos a supressão da fluorescência do Trp pela acrilamida em pH 7,0. Esta molécula tem o potencial para indicar a profundidade da inserção do fluoróforo em um sistema de membrana, uma vez que o acesso deste supressor de fluorescência aos sítios hidrofóbicos de micelas ou vesículas é extremamente limitado por seu caráter polar. Este apagamento pode ser numericamente mensurado a partir da obtenção da constante de Stern-Volmer para cada peptídeo nas diferentes condições estudadas (EFTINK e GHIRON, 1976). A constante de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) é um parâmetro obtido a partir da tangente da curva de supressão, dada pelo valor inicial da intensidade de fluorescência em relação aos valores pontuais obtidos ( $F_0/F$ ).

Cada peptídeo sintetizado possui o fluoróforo triptofano em uma região diferente; desta forma, os estudos de supressão podem fornecer pistas preciosas sobre a inserção das diferentes regiões desta seqüência no modelo de membrana utilizado, neste caso, micelas de SDS, HPS e LPC. Desta maneira, um maior apagamento da fluorescência indica uma maior exposição de Trp ao meio aquoso (polar) e uma menor inserção na membrana, ou no nosso caso à micela.

Nesse estudo, também realizamos experimentos de supressão de fluorescência com o peptídeo em solução. Essa análise nos fornece informações do nível de exposição do triptofano na ausência de micelas (figuras 77, 78 e 79).

Um exemplo de titulação por acrilamida, onde é possível verificar a diminuição da intensidade de fluorescência com o aumento deste supressor, pode ser visualizado na figura 77. Nesta figura podemos observar que o comprimento de onda de emissão não se altera, indicando, juntamente com os espectros de ultravioleta (não mostrados) que também não se modificam, que a supressão é do tipo dinâmica, isto é, ocorre através da colisão entre a molécula de acrilamida e o triptofano. Se a supressão ocorresse através da formação de um complexo (supressão estática), tanto os valores de comprimento de onda de absorção como de emissão sofreriam alteração.

Comparando-se os valores de Ksv para os peptídeos em solução, podemos verificar que o peptídeo W24 possui um Ksv de 40,2, muito superior aos obtidos para as outras duas seqüências (Ksv  $\approx 22 \text{ M}^{-1}$ ). Estes dados indicam que a região amino-terminal está menos exposta á água do que a carboxi-terminal, sugerindo uma maior agregação desta extremidade.

Este achado, juntamente com os obtidos na variação da força iônica e do pH, indica que a interação entre as cadeias peptídicas para a formação do poro começa na região aminoterminal, que possui uma seqüência de 10 resíduos com características apolares. Este achado, está coerente com o reportado na literatura, que atribui a região apolar situada entre os resíduos 1 e 10 do peptídeo como responsável pela agregação inicial entre os monômeros para a formação do poro (CASALLANOVO et al., 2006).

Analisando-se agora os valores de Ksv em solução com os obtidos (Tabela 2), podemos observar que independente do detergente utilizado os apagamentos foram menores que em água, confirmando os dados de titulação, que mostram a interação dos peptídeos com a micela. Neste caso, um menor apagamento significa que o triptofano está menos exposto ao meio aquosa, indicando imersão na micela.

Analisando-se os valores de Ksv, para o mesmo tipo de micela, variando-se o peptídeo estudado, podemos verificar que o peptídeo que mais penetra na micela em SDS é o W24 (Ksv =  $6,21 \text{ M}^{-1}$ ), seguido pelas seqüências W2 e W7 que apresentaram valores próximos entre si (Ksv =  $11,26 \text{ e } 11,59 \text{ M}^{-1}$ , respectivamente). Nas micelas de HPS, os valores de Ksv foram 11,82; 13,80 e 13,96 M<sup>-1</sup>, para os peptídeos W24, W2 e W7, respectivamente. Estes resultados estão condizentes com os encontrados durante a titulação dos peptídeos com estes detergentes que indicam imersão parecida.

Diferente do encontrado nos dois detergentes acima citados, em LPC, os peptídeos W24 (Ksv = 6,45) e W2 (Ksv = 6,41) apresentaram a maior interação com a micela, sendo que o W7 mostrou a menor imersão. O motivo desta maior interação do peptídeo W2 em micelas de LPC não está clara, necessitando de maiores estudos. Ressaltamos, no entanto, que devido a maior semelhança estrutural entre o LPC e os lipídeos de membrana acreditamos que os resultados neste detergente são os mais próximos dos que seriam encontrados na membrana biológica.



Figura 77. Espectros de fluorescência do peptídeo W2, obtidos na titulação de acrilamida em solução pH 7,0.



Figura 78. Espectros de fluorescência do peptídeo W7, obtidos na titulação de acrilamida em solução pH 7,0.



Figura 79. Espectros de fluorescência do peptídeo W24, obtidos na titulação de acrilamida em solução pH 7,0.

Tabela 2. Valores de emissão de fluorescência do triptofano e das constantes de Stern-Volmer (Ksv) na análise de supressão de fluorescência em diferentes surfactantes em pH 7,0.

	W2		W7		W24	
	Ksv (M <sup>-1</sup> )	λmax (nm)	Ksv (M <sup>-1</sup> )	λmax (nm)	Ksv (M <sup>-1</sup> )	λmax (nm)
SOLUÇÃO	21,8	353,6	22,4	353,7	40,16	356,5
SDS	11,26	344,5	11,59	345,9	6,21	341,6
HPS	13,8	345,5	13,96	345,2	11,82	345,6
LPC	6,41	342,5	8,56	346,2	6,45	342,2



Figura 80. Os gráficos demonstram a supressão de fluorescência pela acrilamida dos peptídeos W2 (■),W7 (●) e W24 (▲), em solução aquosa pH 7,0, onde (F₀) é a fluorescência inicial e (F) fluorescência obtida.



Figura 81. Os gráficos demonstram a supressão de fluorescência pela acrilamida dos peptídeos W2 (■),W7 (●) e W24 (▲), em solução pH 7,0 de SDS, onde (F<sub>0</sub>) é a fluorescência inicial e (F) fluorescência obtida.



Figura 82. Os gráficos demonstram a supressão de fluorescência pela acrilamida dos peptídeos W2 (■),W7 (●) e W24 (▲), em solução pH 7,0 de HPS, onde (F<sub>0</sub>) é a fluorescência inicial e (F) fluorescência obtida.



Figura 84. Os gráficos demonstram a supressão de fluorescência pela acrilamida dos peptídeos W2 (■),W7 (●) e W24 (▲), em solução pH 7,0 de LPC, onde (F<sub>0</sub>) é a fluorescência inicial e (F) fluorescência obtida.

## 5. CONCLUSÕES

A estratégia de síntese de peptídeos em fase sólida através do protocolo Fmoc/tBu, utilizada na obtenção dos peptídeos deste trabalho, foi viável.

O processo de purificação dos peptídeos através de HPLC também se mostrou eficiente e viabilizou a obtenção de material com alto índice de pureza.

O rendimento final incluindo as etapas de síntese e purificação foi de aproximadamente 30% para os peptídeos sintetizados.

Quanto aos ensaios de atividade hemolítica, pode-se concluir que todos os peptídeos são ativos. No entanto, nas mesmas condições da St II, mostraram atividade cerca de 1000 vezes menor. Apesar desta menor atividade comparada com a proteína integral, estes peptídeos são interessantes objetos de estudo, pois esta região é responsável pela formação do poro, mecanismo ainda não totalmente compreendido. Além disto, a capacidade funcional do peptídeo se mostrou semelhante à da proteína nativa, isto é ambos formam poros de mesmo diâmetro, isto é, próximo de 0,99 nm. Desta maneira, acreditamos que os peptídeos podem ser utilizados como modelos mais simples para os estudos do modo de ação desta proteína. A maior atividade biológica da proteína em relação aos peptídeos foi atribuída a maior afinidade desta pela membrana biológica, atribuída à presença do "cluster aromático" existente em sua cadeia polipeptídica, e desta maneira, a facilidade de interação com a bicamada lipídica.

Os estudos de variação da força iônica e de pH, através de fluorescência, sugerem que a região do peptídeo mais sujeita a agregação é a N-terminal, mais especificamente próxima a posição 7 da seqüência.

Os experimentos com TFE, indicaram que os peptídeos sofrem alterações estruturais quando expostos a este solvente, passando de uma estrutura ao acaso para uma com um maior teor de α-hélice, condizente com a proteína nativa e com os dados de predição estrutural. Os experimentos em micelas mostraram que todos os peptídeos estudados interagem com membranas, provavelmente sofrendo alterações estruturais durante sua inserção neste tipo de membrana modelo.

A variação do pH de neutro para ácido (4,0) ou básico (9,0), não alterou a interação do peptídeo com a membrana.

A análise dos dados obtidos por supressão de fluorescência, indica que a região 24 do peptídeo está mais inserida que à região amino-terminal na micela de SDS, enquanto que em LPC a região com menor inserção na membrana foi a próxima do 7º aminoácido.

Os dados obtidos neste projeto juntamente com outros adquiridos em um projeto na qual foram estudadas as regiões 12, 17 e 21 desta mesma região da Esticolisina II nos levam a acreditar que o mecanismo de formação de poros ocorre através da indução de formação de estruturas não-lamenares, levando a destruição da membrana e conseqüentemente da célula (ANDERLUH; MACEK, 2003). Esta indução levaria inicialmente a formação de uma estrutura de grampo pelo peptídeo, induzindo a formação de poros através da sua mudança de estrutura. Esta indução somente ocorreria após a interação de 3 ou 4 cadeias peptídicas interagindo inicialmente pela sua extremidade amino-terminal. Chamamos atenção que, pelo modelo proposto para a proteína a estrutura do poro formado é toroidal. Neste modelo, somente á área ocupada pelo peptídeo não é suficiente para explicar a formação de um poro com aproximadamente 1 nm, sendo que a bicamada lipídica se deforma, participando do poro (figura 85). Desta forma, a região onde é formado o poro é similar a uma micela, mostrando que nossos estudos indicam a estrutura do peptídeo neste modelo.



Figura 85. Mecanismo de ação proposto para a ação dos peptídeos estudados.

Conseguimos com este projeto desenvolver novos peptídeos, biologicamente ativos, que podem servir como sistemas mais simples para o estudo da formação de poros da membrana. No entanto, há necessidade de dados complementares para a comprovação do mecanismo proposto, como estudos utilizando vesículas e também um tipo de supressor de fluorescência de caráter apolar, no qual é ligado a cadeia hidrofóbica dos surfactantes.

Acreditamos que com essas informações conseguimos informações que ajudaram a propor um modelo mais preciso da interação do peptídeo com a membrana e assim elucidar o mecanismo de formação de poros em membranas da Esticolisina II e de seus análogos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERICIO, F. Editorial: current perspectives in peptide chemistry. I. Synthesis. **Biopolymers**, v. 55, n. 2, p. 99-100, 2000.

ALVAREZ, C.; LANIO, M. E.; TEJUCA, M.; MARTINEZ, D.; PAZOS, F.; CAMPOS, A. M.; ENCINAS, M. V.; PERTINHEZ, T.; SCHREIER, S.; LISSI, E. A. The role of ionic strength on the enhancement of the hemolytic activity of sticholysin I, a cytolysin from *Stichodactyla helianthus*. **Toxicon**, v. 36, n. 1, p. 165-178, 1998.

ANDERLUH, G.; MACEK, P. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). **Toxicon**, v. 40, n. 2, p. 111-124, 2002.

ANDERLUH, G.; MACEK, P. Dissecting the actinoporin pore-forming mechanism. **Structure (Camb.)**, v. 11, n. 11, p. 1312-1313, 2003.

ANDERLUH, G.; BARLIC, A.; PODLESEK, Z.; MACEK, P.; PUNGERCAR, J.; GUBENSEK, F.; ZECCHINI, M. L.; DALLA SERRA, M.; MENESTRINA, G. Cysteinescanning mutagenesis of an eukaryotic pore-forming toxin from sea anemone - Topology in lipid membranes. **European Journal of Biochemistry**, v. 263, n. 1, p. 128-136, 1999a.

ANDERLUH, G.; KRIZAJ, I.; STRUKELJ, B.; GUBENSEK, F.; MACEK, P.; PUNGERCAR, J. Equinatoxins, pore-forming proteins from the sea anemone *Actinia equina*, belong to a multigene family. **Toxicon**, v. 37, n. 10, p. 1391-1401, 1999b.

ANDERLUH, G.; PUNGERCAR, J.; KRIZAJ, I.; STRUKELJ, B.; GUBENSEK, F.; MACEK, P. N-terminal truncation mutagenesis of equinatoxin II, a pore-forming protein from the sea anemone *Actinia equina*. **Protein Engineering**, v. 10, n. 7, p. 751-755, 1997.

ATHERTON, E.; WOOLLEY, V.; SHEPPARD, R. C. Internal association in solid-phase peptide-synthesis - synthesis of cytochrome-c residues 66-104 on polyamide supports. **Journal of the Chemical Society-Chemical Communications**, v. 20, p. 970-971, 1980.

BLUMENTHAL, K. M.; KEM, W. R. Primary structure of *Stoichactis helianthus* Cytolysin III. Journal of Biological Chemistry, v. 258, n. 9, p. 5574-5581, 1983.

BODANSZKY, M. **Peptide chemistry:** a practical textbook. Heidelberg: Springer-Verlag, 1993.

CANTOR, C. R. ; SCHIMMEL, P. R. **Biophysical chemistry:** techniques for the study of biological structure and function. San Francisco: Paperback, 1980. v. 2.

CASALLANOVO, F.; DE OLIVEIRA, F. J.; DE SOUZA, F. C.; ROS, U.; MARTINEZ, Y.; PENTON, D.; TEJUCA, M.; MARTINEZ, D.; PAZOS, F.; PERTINHEZ, T. A.; SPISNI, A.; CILLI, E. M.; LANIO, M. E.; ALVAREZ, C.; SCHREIER, S. Model peptides mimic the structure and function of the N-terminus of the pore-forming toxin Sticholysin II. **Biopolymers**, v. 84, n. 2, p. 169-180, 2006.

CHEN, Y.; BARKLEY, M. D. Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins. **Biochemistry**, v. 37, n. 28, p. 9976-9982, 1998.

DEVLIN, J. P. Isolation and partial-purification of hemolytic toxin from sea-anemone, *Stoichactis helianthus*. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 63, n. 9, p. 1478-1480, 1974.

EFTINK, M. R.; GHIRON, C. A. Exposure of Tryptophanyl residues in proteins quantitative-determination by fluorescence quenching studies. **Biochemistry**, v. 15, n. 3, p. 672-680, 1976.

GHIRON, C. A.; EFTINK, M. R.; ENGLER, D.; NIYOGI, S. K. Fluorescence studies with human epidermal growth-factor. **Photochemistry and Photobiology**, v. 55, n. 1, p. 29-34, 1992.

GREENFIELD, N.; FASMAN, G. D. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. **Biochemistry**, v. 8, n. 10, p. 4108-4116, 1969.

HINDS, M. G.; ZHANG, W.; ANDERLUH, G.; HANSEN, P. E.; NORTON, R. S. Solution structure of the eukaryotic pore-forming cytolysin equinatoxin II: Implications for pore formation. Journal of Molecular Biology, v. 315, n. 5, p. 1219-1229, 2002.

HONG, Q.; GUTIERREZ-AGUIRRE, I.; BARLIC, A.; MALOVRH, P.; KRISTAN, K.; PODLESEK, Z.; MACEK, P.; TURK, D.; GONZALEZ-MANAS, J. M.; LAKEY, J. H.; ANDERLUH, G. Two-step membrane binding by equinatoxin II, a pore-forming toxin from the sea anemone, involves an exposed aromatic cluster and a flexible helix. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 44, p. 41916-41924, 2002.

HUERTA, V.; MORERA, V.; GUANCHE, Y.; CHINEA, G.; GONZALEZ, L. J.; BETANCOURT, L.; MARTINEZ, D.; ALVAREZ, C.; LANIO, M. E.; BESADA, V. Primacy structure of two cytolysin isoforms from *Stichodactyla helianthus* differing in their hemolytic activity. **Toxicon**, v. 39, n. 8, p. 1253-1256, 2001.

KING, D. S.; FIELDS, C. G.; FIELDS, G. B. A cleavage method which minimizes side reactions following Fmoc solid phase peptide synthesis. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 36, n. 3, p. 255-266, 1990.

KRISTAN, K.; PODLESEK, Z.; HOJNIK, V.; GUTIERREZ-AGUIRRE, I.; GUNCAR, G.; TURK, D.; GONZALEZ-MANAS, J. M.; LAKEY, J. H.; MACEK, P.; ANDERLUH, G. Pore formation by equinatoxin, a eukaryotic pore-forming toxin, requires a flexible N-terminal region and a stable beta-sandwich. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 45, p. 46509-46517, 2004.

LANIO, M. E.; MORERA, V.; ALVAREZ, C.; TEJUCA, M.; GOMEZ, T.; PAZOS, F.; BESADA, V.; MARTINEZ, D.; HUERTA, V.; PADRON, G.; CHAVEZ, M. D. Purification and characterization of two hemolysins from *Stichodactyla helianthus*. **Toxicon**, v. 39, n. 2/3, p. 187-194, 2001.

LAKOWICZ, J. R. Principles of fluorescence spectroscopy. New York: Plenum, 1983.

MACH, H.; MIDDAUGH, C. R.; LEWIS, R. V. Statistical determination of the average values of the extinction coefficients of tryptophan and tyrosine in native proteins. **Analitical Biochemistry**, v. 200, n. 1, p. 74-80, 1992.

MACEK, P.; BELMONTE, G.; PEDERZOLLI, C.; MENESTRINA, G. Mechanism of Action of Equinatoxin-Ii, A Cytolysin from the sea-Anemone *Actinia equina* belonging to the family of actinoporins. **Toxicology**, v. 87, n. 1/3, p. 205-227, 1994.

MACEK, P.; ZECCHINI, M.; PEDERZOLLI, C.; DALLASERRA, M.; MENESTRINA, G. Intrinsic tryptophan fluorescence of equinatoxin-Ii, A pore-forming polypeptide from the seaanemone *Actinia equina*, monitors its interaction with lipid-membranes. **European Journal** of **Biochemistry**, v. 234, n. 1, p. 329-335, 1995.

MANCHENO, J. M.; LOS RIOS, V.; DEL POZO, A. M.; LANIO, M. E.; ONADERRA, M.; GAVILANES, J. G. Partially folded states of the cytolytic protein sticholysin II. **Biochimica** et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology, v. 1545, n. 1/2, p. 122-131, 2001.

MANCHENO, J. M.; MARTINEZ-RIPOLL, M. A.; GAVILANES, J. G.; HERMOSO, J. A. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the water-soluble state of the pore-forming toxin sticholysin II from the sea anemone Stichodactyla helianthus. Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography, n. 58, p. 1229-1231, 2002.

MANCHENO, J. M.; MARTIN-BENITO, J.; MARTINEZ-RIPOLL, M.; GAVILANES, J. G.; HERMOSO, J. A. Crystal and electron microscopy structures of sticholysin II actinoporin reveal insights into the mechanism of membrane pore formation. **Structure**, v. 11, n. 11, p. 1319-1328, 2003.

MARTINEZ, D.; MORERA, V.; ALVAREZ, C.; TEJUCA, M.; PAZOS, F.; GARCIA, Y.; RAIDA, M.; PADRON, G.; LANIO, M. E. Identity between cytolysins purified from two morphos of the Caribbean sea anemone *Stichodactyla helianthus*. **Toxicon**, v. 40, n. 8, p. 1219-1221, 2002.

MARTINEZ, D.; CAMPOS, A. M.; PAZOS, F.; ALVAREZ, C.; LANIO, M. E.; CASALLANOVO, F.; SCHREIER, S.; SALINAS, R. K.; VERGARA, C.; LISSI, E. Properties of St I and St II, two isotoxins isolated from *Stichodactyla helianthus*: a comparison. **Toxicon**, v. 39, n. 10, p. 1547-1560, 2001. MENESTRINA, G.; CABIAUX, V.; TEJUCA, M. Secondary structure of sea anemone cytolysins in soluble and membrane bound form by infrared spectroscopy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 254, n. 1, p. 174-180, 1999.

MERRIFIELD, R. B. Solid phase peptide synthesis .1. Synthesis of a tetrapeptide. Journal of the American Chemical Society, v. 85, n. 14, p. 2149, 1963.

MYGIND, P. H.; FISCHER, R. L.; SCHNORR, K. M.; HANSEN, M. T.; SONKSEN, C. P.; LUDVIGSEN, S.; RAVENTOS, D.; BUSKOV, S.; CHRISTENSEN, B.; DE MARIA, L.; TABOUREAU, O.; YAVER, D.; ELVIG-JORGENSEN, S. G.; SORENSEN, M. V.; CHRISTENSEN, B. E.; KJAERULFF, S.; FRIMODT-MOLLER, N.; LEHRER, R. I.; ZASLOFF, M.; KRISTENSEN, H. H. Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. **Nature**, v. 437, n. 7061, p. 975-980, 2005.

NAKAMURA, M.; SEKINO-SUZUKI, N.; MITSUI, K.; OHNO-IWASHITA, Y. Contribution of tryptophan residues to the structural changes in perfringolysin O during interaction with liposomal membranes. **Journal of Biochemistry**, v. 123, n. 6, p. 1145-1155, 1998.

PARKER, M. W.; FEIL, S. C. Pore-forming protein toxins: from structure to function. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**, v. 88, n. 1, p. 91-142, 2005.

ROCCATANO, D.; COLOMBO, G.; FIORONI, M.; MARK, A. E. Mechanism by which 2,2,2-trifluoroethanol/water mixtures stabilize secondary-structure formation in peptides: a molecular dynamics study. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 19, p. 12179-12184, 2002.

SARIN, V. K.; KENT, S. B. H.; MERRIFIELD, R. B. Properties of swollen polymer networks - solvation and swelling of peptide-containing resins in solid-phase peptide-synthesis. Journal of the American Chemical Society, v. 102, n. 17, p. 5463-5470, 1980.

SCHIFFER, M.; EDMUNSON, A. B. Use of helical wheels to represent structures of proteins and to identify segments with helical potential. **Biophysical Journal**, v. 7, n. 2, p. 121, 1967.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Protein secondary structure from circular dichroism spectroscopy. Combining variable selection principle and cluster analysis with neural network, ridge regression and self-consistent methods. **Journal of Molecular Biology**, v. 242, n 4, p. 497-507, 1994.

SONNICHSEN, F. D.; VANEYK, J. E.; HODGES, R. S.; SYKES, B. D. Effect of trifluoroethanol on protein secondary structure - an nmr and cd study using a synthetic actin peptide. **Biochemistry**, v. 31, n. 37, p. 8790-8798, 1992.

SOUZA, F. C. Estudos das propriedades estruturais de análogos substituídos com Trp<sup>12</sup>, <sup>17 ou 21</sup> do fragmento com 30 resíduos da região amino-terminal da Esticolisina II. 2006. 72 f. Dissertação – (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

STEWART, F. H. C. Some applications of competitive coupling in peptide-synthesis. **Australian Journal of Chemistry**, v. 33, n. 9, p. 2087-2095, 1980.

TEJUCA, M.; SERRA, M. D.; FERRERAS, M.; LANIO, M. E.; MENESTRINA, G. Mechanism of membrane permeabilization by sticholysin I, a cytolysin isolated from the venom of the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. **Biochemistry**, v. 35, n. 47, p. 14947-14957, 1996.

TEJUCA, M.; DALLA SERRA, M.; POTRICH, C.; ALVAREZ, C.; MENESTRINA, G. Sizing the radius of the pore formed in erythrocytes and lipid vesicles by the toxin sticholysin I from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. **Journal of Membrane Biology**, v. 183, n. 2, p. 125-135, 2001.

TEJUCA, M.; ANDERLUH, G.; MACEK, P.; MARCET, R.; TORRES, D.; SARRACENT, J.; ALVAREZ, C.; LANIO, M. E.; DALLA SERRA, M.; MENESTRINA, G. Antiparasite activity of sea-anemone cytolysins on *Giardia duodenalis* and specific targeting with anti-Giardia antibodies. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 3, p. 489-498, 1999.

ULRIH, N. P.; ANDERLUH, G.; MACEK, P.; CHALIKIAN, T. V. Salt-induced oligomerization of partially folded intermediates of equinatoxin II. **Biochemistry**, v. 43, n. 29, p. 9536-9545, 2004.

VIVIAN, J. T.; CALLIS, P. R. Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. **Biophysical Journal**, v. 80, n. 5, p. 2093-2109, 2001.

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 27-55, 2003.