

Raquel Kely Bortoleto Bugs

Transformações Estruturais 2
Função de Fosfolipase



1910001039



INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE FÍSICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOFÍSICA

Transformações Estruturais e Função de Fosfolipase

RAQUEL KELLY BORTOLETO BUGS



Tese apresentada ao Departamento de Física do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, para a obtenção do Título de DOUTOR EM BIOFÍSICA MOLECULAR, Área de concentração: BIOFÍSICA MOLECULAR.

**São José do Rio Preto – SP
2001**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOFÍSICA

Transformações Estruturais e Função de Fosfolipase

RAQUEL KELLY BORTOLETO BUGS

Tese apresentada ao Departamento de
Física do Instituto de Biociências, Letras
e Ciências Exatas, para a obtenção do
Título de DOUTOR EM BIOFÍSICA
MOLECULAR, Área de concentração:
BIOFÍSICA MOLECULAR.

Orientador: Prof. Dr. RICHARD JOHN WARD

Co-Orientador: Prof. Dr. AUGUSTO AGOSTINHO NETO

**São José do Rio Preto – SP
2001**



Transformações Estruturais e Função de Fosfolipase

RAQUEL KELLY BORTOLETO BUGS

Tese apresentada ao Departamento de Física do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, para a obtenção do Título de DOUTOR EM BIOFÍSICA MOLECULAR, Área de concentração: BIOFÍSICA MOLECULAR.

Membros da Banca:



Prof. Dr. Augusto Agostinho Neto

DF – IBILCE - UNESP

(Co-Orientador)



Prof. Dr. Richard John Ward

IQ - USP Ribeirão Preto

(Orientador)



Prof. Dr. Amando Siuitu Ito

FFCLRP - USP



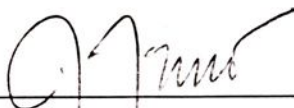
Prof. Dra. Prof. Dra. Iolanda Midea Cuccovia

IQ - USP São Paulo



Prof. Dr. Marcelo Santoro

Departamento de Bioquímica - UFMG



Prof. Dr. João Ruggiero Neto

DF - IBILCE - UNESP

São José do Rio Preto
03 de Dezembro de 2001

**Ao Milton por sua amizade, dedicação, carinho e
companheirismo e também por sua “paciência
alemã”**

**A MARIANE que transformou nossas vidas e por
ter dividido o tempo que era seu com a “jararaca
do sul e a jararaca do norte”**

**Aos meus pais João e Gracia pelos ensinamentos de
minha vida. Ao meu pai em especial, por ser tão
dedicado à Mariane nos muitos finais de semana
que dedicamos ao laboratório**

Dedico este trabalho



AGRADECIMENTOS

Ao orientador **Prof. Dr. Richard John Ward** por ter aceito a orientação e a responsabilidade perante a FAPESP num momento tão difícil. Por sua amizade, profissionalismo e honestidade. Pelo exemplo de dedicação à Ciência.

Ao co-orientador **Prof. Dr. Augusto Agostinho Neto** por ter aceito a responsabilidade de conduzir este trabalho. Pelo exemplo de dedicação e disciplina. Pelo grande cientista que realmente é. Por ter dado vida e significado a este trabalho. Por ter me ensinado que “a vida vale a pena ser vivida” e finalmente pela grande utilidade das caixinhas de lenço.

Ao **Prof. Dr. Raghuvir K. Arni** pela amizade e apoio que foram tão importantes no decorrer do trabalho. Pelas discussões das estruturas cristalográficas que ajudaram a esclarecer nossos resultados. Agradeço especialmente pelo uso do espalhamento dinâmico de luz (Dyna Pro) e pelo uso de seu laboratório.

Ao **Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio** pelo apoio e pela gentileza em ceder parte de seu laboratório para minha permanência

Ao **Prof. Dr. João Rugiero Neto** pelo uso do espectropolarímetro Jasco 110, pelo apoio e sugestões no decorrer do projeto. Agradeço também a leitura crítica da qualificação.

A **Prof. Silvia Maria Leite Agostinho** pela paciência e apoio nos momentos tão difíceis e também pelas sugestões nas leituras dos relatórios.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Fossey** pela amizade e incentivo.

Ao **Prof. Dr. Gustavo Bonilha** do Departamento de Química do IBILCE-UNESP pelo uso do espectrofotômetro Cary 100 scan (proc. FAPESP 96/08279-7)

Ao **Prof. Dr. Márcio Tiera** do Departamento de Química do IBILCE-UNESP pelo uso do espectrofluorímetro Hitachi F-4500.



Aos técnicos **Antônio Aparecido Barbosa** e **Paulo Roberto Salinas** do departamento de Física pela ajuda, paciência e amizade durante todos esses anos.

A secretária **Ilva Cecílio Bernardes** pelo apoio e pela ajuda nos "problemas" durante tanto tempo.

A **Leandra Watanabe** pela amizade, pelas "discussões e também pela confecção das figuras representativas das fosfolipases.

A **Fátima** pela amizade

Aos estagiários **Teresa, Alfredo e Daniel** pela paciência e disposição em ceder o prof. Augusto nos muitos momentos de urgência.

Ao amigo **Carlos Roberto Benatti**

Aos colegas **Arthur, Lucimara** e especialmente ao **Roberto** pelo apoio e "correio" Ribeirão- Rio Preto.

Aos colegas **Hamilton e Fábio** pela ajuda com o Cary 100.

Aos funcionários da Pós-Graduação: **Nanci Queiroz de Assis Pereira, Rosemar Rosa de Carvalho Brena, Genoeffa De Biagi, Oscar José Marques e Rosana Miguel Gomes Ferro.**

Aos colegas , funcionários e professores do Departamento de Física.

E ao **BRASIL** que precisa de mais pessoas que acreditam neste País.

A **FAPESP** pelo apoio financeiro, Proc. 97/02749-4.

MUITO OBRIGADO



Índice

Lista de Tabelas.....	x
Lista de Figuras.....	x
Lista de Abreviaturas.....	xiii
Resumo.....	xiv
Abstract.....	xvi

1 – Introdução.....	1
1.1 As fosfolipases lisina 49.....	5
1.2 Objetivo.....	9
 2 – Princípios Básicos	10
2.1 Espalhamento de luz.....	11
2.2 Espectroscopia de fluorescência.....	17
2.2.1 Anisotropia de fluorescência.....	20
2.3 Dicroísmo Circular.....	21
2.3.1 Dicroísmo circular para biomoléculas	24
 3 – Materiais e Métodos.....	28
3.1 Materiais.....	29
3.1.1 Reagentes	29
3.1.2 Equipamentos	30
3.2 Métodos.....	30
3.2.1 Purificação da BthTX-I	30
3.2.1.1 Cromatografia de troca catiônica	30



3.2.1.2 Cromatografia em filtração em gel	31
3.2.1.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS	32
3.2.1.4 Teste para Atividade Miotóxica.....	32
3.2.2 Preparo dos lipossomos.....	32
3.2.3 Medidas utilizando espalhamento dinâmico de luz	34
3.2.3.1 Para avaliar a cmc do SDS em solução tampão para diversas forças iônicas.....	34
3.2.3.2 Para investigar o sistema BthTX-I na presença de lipossomos zwitteriônicos para diferentes concentrações de SDS.....	35
3.2.4 Para investigar o sistema BthTX-I na presença ácido araquidônico.....	35
3.2.4.1. Preparo do ácido araquidônico	35
3.2.4.2. Medidas de EDL para investigar o sistema BthTX-I na presença ácido araquidônico.....	36
3.2.5. Fluorescência intrínseca do triptofano	36
3.2.5.1 Método de análise da intensidade de Fluorescência - Cálculo do centroíde	37
3.2.5.2 Anisotropia de fluorescência	37
3.2.6. Técnica de CD na investigação do sistema BthTX-I com lipossomos zwitteriônicos	38
3.2.6.1 Medidas na região de UV distante compreendido entre 203 - 250nm	38
3.2.6.1.1 Cálculo da Elipiticidade Molar	38
 4 - Resultados e Discussões	 39
4.1 Resultados e discussões para o sistema SDS/BthTX-I	40
4.1.1 Purificação da BthTX-I.....	40



4.1.2	Determinação da cmc para diversas forças iônicas pela técnica de EDL	42
4.1.3	Medidas de CD para diversas forças iônicas para o sistema SDS/ BthTX-I	50
4.1.4	Medidas da IFTI para o sistema SDS/BthTX-I	59
4.2	Medidas para o sistema CHAPS, SDS e BthTX-I	65
4.3	Medidas para o sistema BthTX-I na presença de lipossomos zwitteriônicos	69
4.4	Medidas para o sistema ácido araquidônico/BthTX-I na presença de lipossomos zwitteriônicos	80
4.5	Termodinâmica da micelização e da ligação de surfatante à proteína	84
4.5.1	Introdução	84
4.5.2	Energia livre do processo de transferência de uma cadeia alifática entre os meios água e hidrocarbonetos	85
4.5.3	Concentração micelar crítica.....	89
4.5.4	Termodinâmica da micelização	90
4.5.5	Estimativa da energia livre envolvida nas transformações conformacionais da proteína.....	95
4.6	Modelo para a Ação de Fosfolipases em Membranas.....	98
5	Conclusões.....	108
6	Bibliografia	111



Lista de Tabelas

Tabela I : Valores da concentração micelar crítica (CMC) para as forças iônicas indicadas na primeira coluna.	48
Tabela II : Concentração Micelar Crítica, número de agregação, grau efetivo de ionização da micela (p/n) e energia livre para formação da micela para o Dodecil Sulfato de Sódio (SDS).	88
Tabela III: Valores da cmc obtidos pela técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz para várias concentrações de NaCl.	89
Tabela IV: Valores da concentração micelar crítica e razão molar SDS/monômero de proteína para as forças iônicas.	95
Tabela V : Valores para a fração molar total de SDS ΔX_T ; fração molar que se liga a proteína ΔX_p ; ΔX_m fração de SDS que se liga a micela e a variação da energia livre de Gibbs para as várias forças iônicas.	98
Tabela VI: Estimativa da variação da energia eletrostática envolvida na ação de danificar a membrana pela BthTX-I.	103
Tabela VII: Alinhamento das sequências primárias das fosfolipases.	106

Lista de Figuras

Figura 1.1: Classificação das fosfolipases nos tipos A1, A2, C e D.	2
Figura 1.2: Sumário da via de biossíntese da série 2 das prostaglandinas e tromboxane A_2	3
Figura 1.3: Diagrama representativo para a estrutura terciária da forma monomérica da BthTX-I.	7
Figura 1.4: Diagrama representativo da estrutura terciária da forma dimérica da BthTX-I	8
Figura 1.5: Esquema representativo da distribuição de cargas na unidade monomérica de BthTx-I.	8
Figura 2.1: Diagrama representativo do equipamento de espalhamento de luz.	14
Figura 2.2: Etapas envolvidas no processo de fluorescência.	19

Figura 2.3: Diagrama da medida de anisotropia de fluorescência.	21
Figura 2.4: Esquema representativo da luz circularmente polarizada à direita.	23
Figura 2.5: Espectros do dicroísmo circular para α -hélice, folha β e de sequência aleatória para uma cadeia polipeptídica.	26
Figura 3.1: Diagrama representativo para a formação de lipossomos pelo método de evaporação de fase reversa.....	
Figura 4.1: Cromatograma obtida da troca catiônica Resource - 15S para a purificação da BthTX-I.	41
Figura 4.2: Gel SDS-PAGE da BthTX-I.	41
Figura 4.3: Histogramas representativo dos valores do raio hidrodinâmico (Rh) obtidos por EDL para: água Milli-Q filtrada; tampão 25 mM Tris-HCl pH 7,0 com 150 mM NaCl.	44
Figura 4.4: Histogramas representativos dos valores para o raio hidrodinâmico (Rh) para o SDS em solução tampão na ausência de NaCl: Valores do Rh para 7,6 mM SDS; 7,8 mM SDS e gráfico dos valores de Rh.	45
Figura 4.5: Histogramas representativos para os valores do raio hidrodinâmico (Rh) para o SDS em solução tampão na presença de 25 mM NaCl: valores do Rh para 3,0 mM SDS; 3,4 mM SDS e gráfico dos valores do Rh.	46
Figura 4.6: Histogramas representativos para os valores do raio hidrodinâmico (Rh) obtidos pela técnica de EDL para o SDS em solução tampão na presença de 100 mM NaCl: valores do Rh para 1,05 mM SDS; 1,3 mM SDS e gráfico dos valores de Rh.	47
Figura 4.7: Histogramas representativos para os valores dos raio hidrodinâmico (Rh) para o SDS em solução tampão 25 mM Tris-HCl pH7,0; 150 mM NaCl: valores do Rh para 925 μ M SDS; para 975 μ M SDS e valores do Rh para a titulação de SDS.	48
Figura 4.8: Espectros de CD para diversas forças iônicas, em solução tampão 25 mM Tris-HCl pH 7,0 com 35 μ M BthTX-I.	50
Figura 4.9: Elipiticidades molares em dois comprimentos de onda obtidos da titulação de SDS para concentrações distintas de BthTX-I : 37 μ M e 74 μ M.	52
Figura 4.10: Espectros de CD representativo da titulação da BthTX-I com SDS.	53
Figura 4.11: Titulação de SDS monitorada com os comprimentos de onda 216 nm e 222 nm.	53
Figura 4.12: Elipiticidade molar versus razão SDS/BthTX-I.	57



Figura 4.13: Espectros de CD em função da variação do comprimento de onda.	58
Figura 4.14: Intensidade de emissão de fluorescência e valores da anisotropia de fluorescência para os valores da razão molar SDS/BthTX-I por unidade monomérica de BthTX-I.	61
Figura 4.15: Valores do centroíde para valores da razão molar SDS/BthTX-I.	62
Figura 4.16: Fórmula estrutural do surfatante zwitteriônico CHAPS.	65
Figura 4.17: Elipiticidade molar da titulação de CHAPS para 37 μ M de BthTX-I.	66
Figura 4.18: Elipiticidade molar em função da titulação de CHAPS para 35 μ M de BthTX-I.	68
Figura 4.19: Espectros de CD para BthTX-I para diferentes valores de razão molar de SDS por monômero de BthTX-I na presença de concentrações constantes de lipossomos zwitteriônicos.	71
Figura 4.20: Histograma representativos do valor do raio hidrodinâmico (Rh).	73
Figura 4.21: Histogramas representativos dos valores dos raios Hidrodinâmicos para o sistema contendo DPPC.	75
Figura 4.22: Histogramas representativos dos valores dos raios Hidrodinâmicos (Rh) para BthTX-I e DPPC.	76
Figura 4.23: Histogramas representativos dos valores dos raios hidrodinâmicos (Rh) para o sistema BthTX-I e SDS para o valor da razão molar de 1 molécula de SDS por monômero de BthTX-I na presença de DPPC.	78
Figura 4.24: Histogramas representativos dos valores do raio hidrodinâmico para 60 μ M BthTX-I e 170 μ M SDS na presença de DPPC.	79
Figura 4.25: Fórmula Estrutural do ácido araquidônico.	80
Figura 4.26: Valores da elipicidade para 35 μ M BthTX-I em função do comprimento de onda.	81
Figura 4.27: Histogramas representativos para os valores do raio hidrodinâmico (Rh) para o valor da razão molar de 1 molécula de ácido araquidônico com DPPC.	83
Figura 4.28: Gráfico construído a partir dos dados apresentados nas tabelas II e III.	94
Figura 4.29: Espectro de CD em função da razão molar SDS/BthTX-I.	97

Lista de Abreviaturas

A	Alanina
Å	Angstrons
BthTx-I	Bothropstoxina-I de <i>Bothrops jararacussu</i>
CD	Dicroísmo Circular
CHAPS	<i>3-Cholamidipropyldimetyl-ammonio-1-propane sulfonate 615</i>
cmc	concentração micelar crítica
D	Ácido aspártico
DPPC	dipalmitoildifosfatidilcolina
E	Ácido glutâmico
EDL	Espalhamento Dinâmico de Luz
G	Glicina
HCl	Ácido clorídrico
IFTI	Intensidade de Fluorescência Intrínseca do triptofano
I	Isoleucina
K	Lisina
M	Metionina
NaCl	Cloreto de Sódio
NMR	Ressonância Nuclear Magnética
PLA2	fosfolipase A2
PLA2 K49	fosfolipase lisina na posição 49
R	Arginina
Rh	Raio Hidrodinâmico
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
T	Treonina
Tris	hidroximetil amino-metano
W	Triptofano
Y	Tirosina
λ	comprimento de onda



RESUMO

A botropstoxina-I (BthTX-I) é uma fosfolipase A₂ Lys49 isolada do veneno da *Bothrops jararacussu*. É constituída de 121 aminoácidos com um único triptofano que está localizado na interface monomérica. A estabilidade conformacional é mantida por 7 pontes dissulfetos. Em pH 7,0 apresenta-se como um homodímero. Age preferencialmente em membranas carregadas negativamente devido seu caráter básico (ponto isoeletrico de 9,3).

O objetivo do presente trabalho é o estudo das transformações conformacionais da proteína BthTxI, devido à interação com anfífilicos, e uma vez que a proteína é supostamente destituída de atividade hidrolítica mas com reconhecida atividade miotóxica, tem-se como finalidade detalhar aspectos da ação da proteína em membranas e possivelmente estender as conclusões inferidas com a BthTX-I para outras fosfolipases como a D49.

Nesta investigação foram utilizadas técnicas não-invasivas como dicroísmo circular, fluorescência intrínseca do triptofano e espalhamento dinâmico de luz na presença do surfatante aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS), de lipossomos formados por fosfolípidos zwitteriônicos e do anfífilico biológico ácido araquidônico.

De acordo com a interpretação dos resultados, o SDS acrescentado se liga à proteína nos “sítios hidrofóbicos”. O número de SDS ligados a proteína pode atingir o número de aproximadamente 30 moléculas de SDS por monômero de BthTX-I. Devido ao surfatante ligado, há a distensão dos laços de aminoácidos, conferindo à área da superfície ventral um acréscimo estimado em 1000 Å². A micela de SDS formada nos sítios hidrofóbicos, deixa o interior da proteína e volta para a solução. Se em solução a concentração de SDS livre está abaixo da cmc, a micela se decompõem em monômeros que voltam a ser coletados pela proteína.

Esta flutuação de população, tem como efeito um espalhamento adicional de luz que pode ser observado visualmente.

A ligação de SDS ou ácido araquidônico na região entre os monômeros, também forma pares adicionais de cargas positivas (lisinas ou argininas) da proteína e negativas do surfatante.

De acordo com a interpretação dos resultados, o SDS acrescentado se liga a proteína nos “sítios hidrofóbicos”. É atribuído ao efeito hidrofóbico a ligação do surfatante à proteína e admite-se que os eventos envolvidos sejam análogos aos que ocorrem no processo de micelização. A variação da energia conformacional da proteína devido a ligação de anfífilos nos sítios hidrofóbicos é estimada em 3 kT por monômero de surfatante ligado.

Os pares positivo-negativo formados e os que preexistem na região ventral da proteína constituem um meio de ancoragem eficiente em uma membrana.

A análise de vinte sequências de fosfolipases A_2 , mostram resíduos de aminoácidos com alto grau de conservação como as lisinas e argininas da porção ventral, os aminoácidos que compõe o sítio ativo e dos aminoácidos localizados na região da interface. Além disso, alguns resíduos de tirosinas conservados podem estar envolvidas na formação de um canal ou sulco hidrofílico por onde passam os íons aprisionados entre proteína e membrana quando há a ligação da proteína à membrana.



ABSTRACT

Bothropstoxin-I (BthTX-I) is a Lys49 phospholipase A2 (Lys49-PLA2) isolated from the venom of *Bothrops jararacussu* which exists as a homodimer at pH 7.0. The protein contains 121 amino acids, which include 14 cystine residues that form 7 disulphide bridges, and a single tryptophan (Trp77) located at the dimer interface. Due to the high content of cationic residues, the BthTX-I binds to and disrupts negatively charged membranes by a Ca^{2+} -independent membrane damaging mechanism. On interaction with amphiphilic molecules, the BthTX-I undergoes poorly understood conformational changes, which may be associated with the membrane damaging event. A deeper understanding of these conformation transitions will not only lead to greater understanding of the mechanism of action of the Lys49-PLA2s, but may also provide insights as to the activation mechanism of phospholipases in general.

The structural changes of BthTX-I induced by interaction with the anionic surfactants SDS and arachidonic acid together with liposomes composed of zwitterionic phospholipids have been evaluated using the non-invasive spectroscopic techniques of circular dichroism (CD), intrinsic tryptophan fluorescence (ITF) and dynamic light scattering. Results of SDS titrations of BthTX-I indicate that the amphiphilic molecules interact with hydrophobic patches on the surface of the protein, and that approximately 30 molecules of SDS are bound per BthTX-I monomer. As a consequence of surfactant binding, it is proposed that surface loops partially separate from the body of the protein, resulting in an increase in the ventral surface area of the protein by $\sim 1000 \text{ \AA}^2$. This increased surface area permits the associated amphiphiles to adopt a micelle-like structure around the expanded hydrophobic regions of the protein. Once the number of SDS molecules associated with the BthTX-I reaches the aggregation number, the SDS micelle and the BthTX-I separate. At SDS concentrations below the critical micelle concentration the liberated micelle decomposes and the free SDS molecules again associate with the protein. The fluctuation of the SDS between the free and bound states results in the dynamic formation and dissociation of electric dipoles formed by the anionic head group of the SDS and cationic amino acid side chains, which results in a visible increase in the light scattering of the protein/SDS mixture.

The binding of SDS or arachidonic acid results in conformation changes in the BthTX-I which could be monitored by CD and FIT. Above 4 molecules of SDS per monomer, structural changes in the BthTX-I resulted in an activated state of the protein which was capable of membrane damage. Thermodynamic analysis of the SDS binding data permitted an estimate of 3 kT for the free energy difference between the free and bound surfactant. This suggests that free energy of lipid binding may provide an important energetic contribution which stabilizes the activated form of the protein.

A comparison of 20 phospholipase A2 amino acid sequences revealed a highly conserved pattern of cationic/anionic residue pairs in the ventral surface of the molecule, which perhaps form an efficient anchor on association of the protein with zwitterionic phospholipid membranes. A stable association with the lipid membrane is essential for the catalytic events which result in phospholipid hydrolysis, and a highly conserved cluster of tyrosine residues may form a channel or cleft which permits the passage of ions away from the protein/membrane interface on interaction of the BthTX-I with the membrane surface.



Introdução



CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

As fosfolipases (PLA) são enzimas solúveis em água capazes de hidrolizar a ligação 3-*sn*- fosfoglicerídeos. Estão classificadas em quatro classes A₁, A₂, C e D de acordo com a posição da hidrólise nas ligações específicas no fosfolipídio (figura 1.1). As fosfolipases A₁ e A₂ hidrolisam, respectivamente, as ligações éster dos glicerofosfolipídeos nos carbonos C-1 e C-2 do glicerol. As fosfolipases C e D, hidrolisam uma das ligações fosfodiéster da cabeça polar. Após a remoção do ácido graxo por uma fosfolipase do tipo A, o ácido graxo remanescente é removido pela molécula de lisofosfolipase.

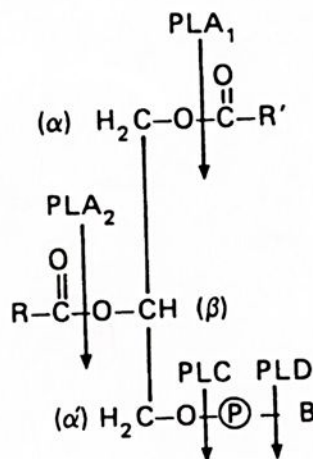


Figura 1.1: Classificação das fosfolipases nos tipos A₁, A₂, C e D de acordo com o sítio de hidrólise indicados pelas setas da ligação 3-*sn*-fosfoglicerídeos (extraído do livro Snake Toxins, A.L. Harvey, pg. 92).

As fosfolipases são enzimas que desempenham funções importantes como enzimas digestivas presentes no suco pancreático, secreções bacterianas e venenos de répteis e insetos. As PLA_2 exercem também a importante a função de molécula sinalizadora liberando o ácido araquidônico. O ácido araquidônico é o precursor mais comum das prostaglandinas, tromboxânio e leucotrienos - que são denominados coletivamente de eicosanoídes.

A figura 1.2 representa o sumário das etapas envolvidas na biossíntese da série-2 de prostaglandinas relacionada aos ácidos graxos com 20 carbonos. A biossíntese ocorre no retículo endoplasmático em 3 etapas principais : 1- a liberação do ácido araquidônico para a membrana ; 2) o processo de oxigenação do ácido araquidônico para produzir prostaglandina (PGH), uma prostaglandina endoperóxido sintase que exerce a função de precursora para outras prostaglandinas e 3) dependendo das enzimas presentes na célula, a conversão da PGH para outro tipo de prostaglandinas ou tromboxanes (TxA_2).

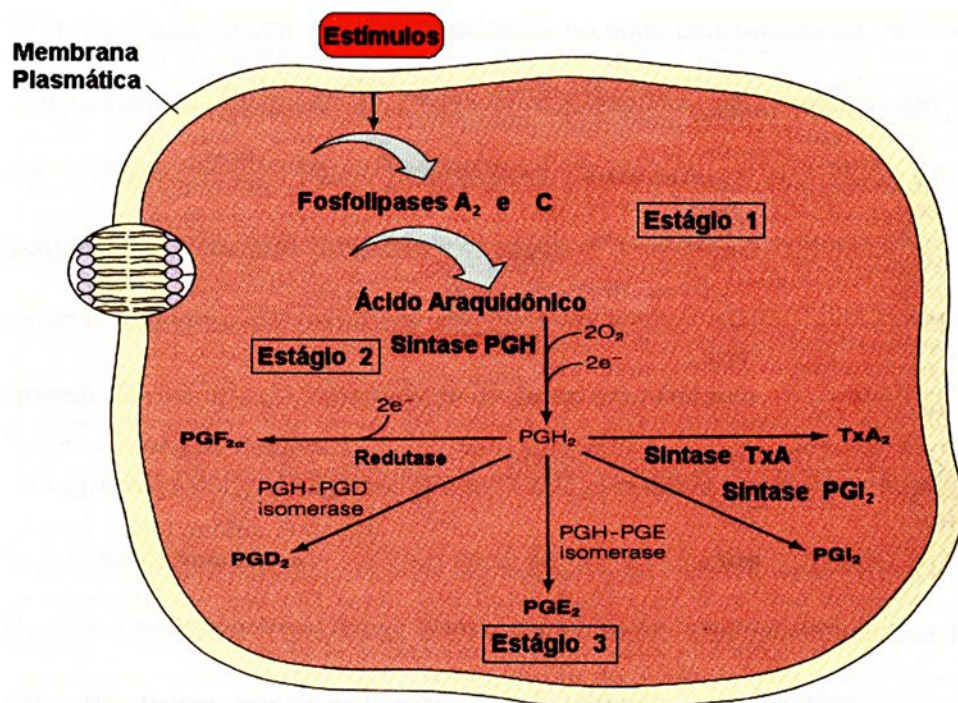


Figura 1.2: Sumário da via de biossíntese da série 2 das prostaglandinas e tromboxane A_2 (extraído do livro texto Biochemistry C. Mathews e K.E. van Holde, pg. 640).

A liberação do ácido araquidônico no estágio 1 ocorre como o resultado de estímulos produzidos por hormônios ou proteases. As PLA₂ extracelulares são responsáveis pela liberação do ácido araquidônico precursor de várias respostas inflamatórias e as intracelulares estão envolvidas em funções reguladoras e sinalização celular (Kudo et al., 1993).

A fosfolipase A₂ é um paradigma nas reações enzimáticas mediadas por cálcio na interface lipídeo-aquosa (Scott et al.; 1992, Verheij et al., 1980). A atividade das PLA₂ do suco pancreático e do veneno de serpentes têm sido investigada desde o início do século passado (Wittcoff, 1951). Nos últimos anos, houve avanço considerável na elucidação de estruturas tridimensionais e função dessas enzimas. Os diferentes tipos de PLA₂ encontradas em classes de répteis, insetos e mamíferos, são agrupados segundo a homologia na sequência primária de aminoácidos e local de ação intra ou extracelular. Foram divididas de acordo com a homologia em onze grupos (Henrikson, 1991; Dennis 1994, 1997). As PLA₂ do grupo I são abundantes no suco pancreático de mamíferos e no veneno das serpentes *Elapidae*. O grupo II é composto pelo veneno das serpentes *Crotalidea* e *Viperidea*, e as PLA₂ intracelulares de mamíferos. Nas PLA₂ do grupo III estão classificadas as enzimas presentes em venenos de abelha e lagartos e no grupo IV estão incluídas enzimas intracelulares de peso molecular maior que 85 kDa e que provavelmente fazem parte do metabolismo do ácido araquidônico.

As proteínas pertencentes aos grupos I e II apresentam grande homologia em sua sequência primária, o número de resíduos varia de 119 a 143 e são agrupadas com base em suas 7 ligações dissulfetos (Henrikson, 1991). As estruturas tridimensionais das PLA₂ dos grupos I, II e III foram determinadas através da difração por raio-X na presença e na ausência de cálcio e de inibidores específicos para a atividade catalítica. As estruturas dos



grupos de PLA₂, mostram em comum um microdomínio que compreende duas α -hélices antiparalelas, onde estão localizados os resíduos do sítio ativo, associadas a uma alça rica em glicina envolvida na ligação de cálcio. (Scott et al, 1990; Arni and Ward, 1995a;b; 1996). Os resíduos His48, Asp49, Tyr52 e Asp99, aos quais são atribuídas atividades hidrolíticas são conservados nos sítios ativos nos grupos I e II, sendo que nas PLA₂ do grupo III estes resíduos são encontrados em posições análogas. Comparando a sequência de aminoácidos, observa-se que os resíduos envolvidos na hidrólise são conservados nos três grupos (Van den Bergh et al., 1989; Scott et al., 1990). Ao resíduo Asp49 e aos três átomos de oxigênio pertencentes aos grupos carbonilas envolvidas nas ligações peptídicas da Tyr28, Gly30 e Gly32, é atribuída a ação na ligação de cálcio (Thunnissen et al., 1990). Como proposto por Scott (Scott et al., 1994), o co-fator Ca⁺² tem a função de estabelecer um intermediário oxianiónico, e na ausência do íon a proteína não apresenta atividade catalítica.

Os venenos das serpentes dos grupos I e II causam ruptura da membrana celular em tecidos específicos. Muitos venenos de serpentes apresentam atividades farmacológicas como miotoxicidade, estimulação de agregação plaquetária e neurotoxicidade pós-sináptica (Gutiérrez et al., 1995; Díaz et al., 1991, Fletcher et al., 1997).

1.1. As fosfolipases lisina 49

Foram isoladas algumas fosfolipases miotóxicas do grupo II do extrato bruto do veneno da serpente brasileira do gênero *Bothrops*, e ao grupo pertencem: miotoxina básica de *B. nummifer*, miotoxina I de *B. moojeni*, miotoxinas II de *B. asper* (Lomonte and Gutierrez, 1989, Francis et al., 1991) e bothropstoxina I de *B. jararacussu* (Homs-



Brandeburgo et al., 1988). As seqüências de aminoácidos deste grupo têm a característica de apresentar o aminoácido Lys49 em vez do aminoácido ácido aspártico (Asp49) (Ownby et al., 1999; de Araújo et al., 1996b). As estruturas destas PLA₂Lys49, determinadas através de difração de raio-X, mostram que o grupo ϵ amino da Lys49 passa a ocupar o sítio de ligação de cálcio (Arni et al., 1995a), tendo como consequência a perda da atividade catalítica, quando mediada pela ligação do co-fator Ca^{+2} . O estudo de fosfolipases obtidas por mutações sítios dirigidas da PLA₂ bovina e suína, demonstraram que a substituição eliminando a ligação do co-fator Ca^{+2} , resulta na queda da atividade catalítica da enzima em 25.000 vezes (van Den Bergh et al., 1989). Mesmo sem a atividade catalítica fosfolipásica, a interação dessas PLA₂Lys49 com membranas dos lipossomos provoca a liberação rápida do conteúdo aquoso de seu interior (Rufini et al., 1992; Pedersen et al., 1994).

A seqüência primária da bothropstoxina I (BthTX-I), cujo gene foi isolado e sequenciado (Cintra et al., 1993; Ward et al., 1995), é composto por 121 aminoácidos, peso molecular de 13,7 kDa com pI de aproximadamente 9,3. Em ambientes com pH próximo a 7 a estrutura quaternária da proteína é um dímero, e o único triptofano (posição 77 de acordo com o número de homologia) está localizado na interface entre os monômeros. Estudos cristalográficos levam a concluir que o dímero no cristal, dependendo das condições de cristalização apresenta duas formas denominadas de forma aberta e forma fechada (da Silva Giotto et al., 1998). A diferença significativa entre as formas "aberta" e "fechada" está nas posições da alça na região do C terminal. Independente da conformação aberta ou fechada, os dímeros estão estabilizados por interações entre os resíduos da α -hélice localizado na região N-terminal e pelas interações

dos resíduos localizados na pequena folha β denominada de “asa β ”. A figura 1.3 representa as componentes da estrutura terciária para a forma monomérica da BthTX-I.

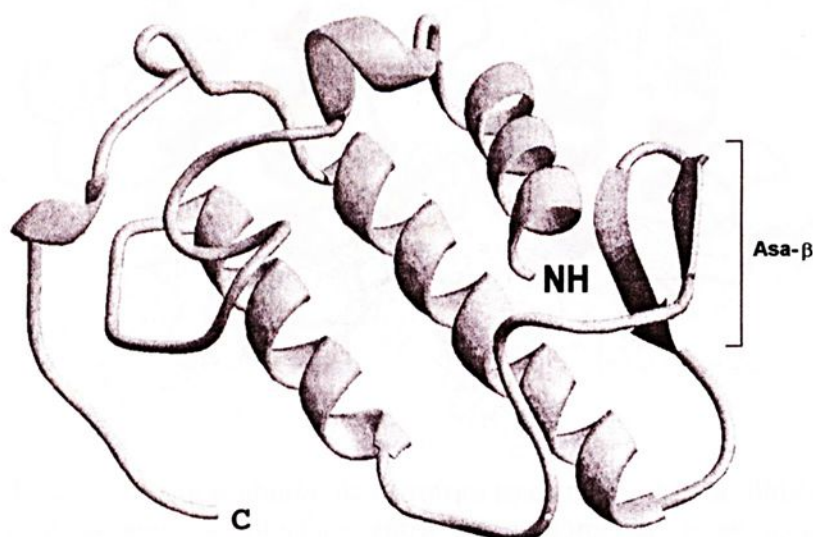


Figura 1.3: Diagrama representativo para a estrutura terciária da forma monomérica da BthTX-I. É representada as componentes α -hélice localizada na região do N-terminal (NH), fração da asa- β e sequência aleatória. A letra C indica a região C terminal (da Silva Giotto et al., 1998).

Na figura 1.4, é apresentado detalhe da interface entre os monômeros com destaque para os triptofanos. Também é representada a distribuição dos resíduos positivos, lisinas e argininas localizados na superfície.

Os contatos entre os dímeros, conferem ao mesmo tempo estabilidade e flexibilidade à estrutura, permitindo as conformações "aberta" e "fechada". Transições na estrutura quaternária talvez sejam importantes na ação do dímero (da Silva Giotto et al., 1998).

O exame da distribuição de cargas na superfície do dímero, esquematicamente representada na figura 1.5, mostra na superfície vista da membrana (figura 1.5A) uma abundância de lisinas (resíduos positivos representados pela cor azul) que pode estar relacionada com a ação desintegradora da fosfolipase quando interagindo com membranas.

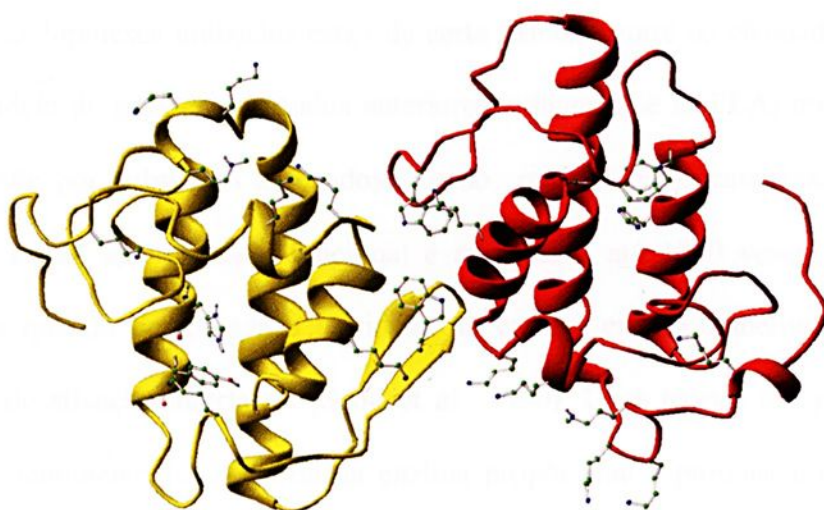


Figura 1.4: Diagrama representativo da estrutura terciária da forma dimérica da BthTX-I destacando o triptofano na interface entre os monômeros; e as lisinas e argininas distribuídas na superfície.

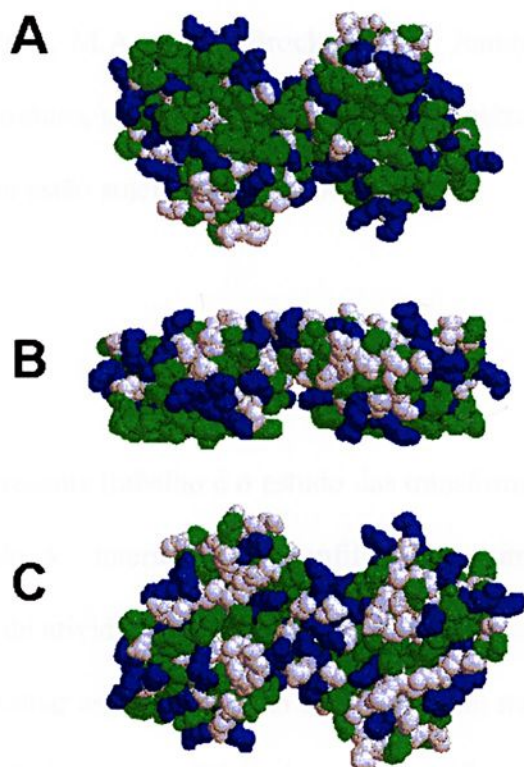


Figura 1.5: Esquema representativo da distribuição de cargas na unidade monomérica de BthTx-I: superfícies vista da membrana (A), superfície lateral (B) superfície oposta a membrana (dorsal) (C) em azul estão representados os aminoácidos com resíduos positivos e em verde os aminoácidos hidrofóbicos, incluindo os aromáticos.

A descrição da atuação de fosfolipase em substratos é feita por dois modelos principais, e as hipóteses utilizadas estão de certa maneira entre os chamados modelo da enzima e modelo do substrato. Estudos anteriores indicam que as PLA_2 apresentam uma maior afinidade por substratos agregados, como micelas, monocamadas, vesículas ou membranas e que sua atividade funcional é aumentada até 1000 vezes nas interfaces lipídeos-água quando comparada à atividade da enzima em monômeros. Este efeito é denominado de ativação interfacial (Scott et al., 1990). Duas teorias são propostas para explicar este fenômeno: (a) A teoria da enzima propõe que a proteína quando ligada a interface da membrana, sofre modificação conformacional (Piterson et al., 1974; Verger and De Haas, 1976) e (b) A teoria do substrato postula que as únicas propriedades importantes são aquelas referentes ao substrato como a densidade molecular, distribuição das cargas e fluidez (Wells, M.A., 1974; Brockerhoff & Jensen, 1974). As duas teorias partem de hipóteses extremas, uma dá ênfase ao substrato, outra a enzima. Porém tanto o substrato como a proteína estão sujeitos a alterações.

1.2. Objetivo

O objetivo do presente trabalho é o estudo das transformações conformacionais da proteína BthTx-I, devido à interação com anfífilos, e uma vez que a proteína é supostamente destituída de atividade hidrolítica mas com reconhecida atividade miotóxica, tem como finalidade detalhar aspectos da ação da proteína em membranas e possivelmente estender as conclusões inferidas com a BthTx-I para outras fosfolipases das classes I/II.



Princípios Básicos

CAPÍTULO 2

2. PRINCÍPIOS BÁSICOS

Neste capítulo são apresentados os princípios básicos das técnicas de Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL) (Berne and Pecora, 2000; Santos and Castanho, 1996; Schmitz, 1990; www.protein-solutions.com) Dicroísmo Circular (CD) (Fasmam, 1996; Rodger and Nordén, 1997; White, 1994) e Fluorescência (Lakowicz, 1983) utilizadas no decorrer do trabalho.

2.1. Espalhamento de Luz

No que segue, é feita uma breve revisão dos princípios usados para descrever a interação radiação-matéria e são apresentados alguns resultados referentes ao fenômeno designado como espalhamento de luz, tendo em vista as condições dos sistemas analisados no trabalho.

Luz, parte do espectro eletromagnético, é utilizada na investigação das propriedades da matéria, especificamente de moléculas. A descrição dos fenômenos luminosos, assim como qualquer fenômeno eletromagnético são englobados pelas equações de Maxwell, equações que relacionam o campo elétrico $\vec{E}$ e o campo de indução magnética $\vec{B}$ com suas fontes : cargas e correntes.



Classicamente, descrevemos a interação entre uma carga q e o campo elétrico $\vec{E}$ de uma radiação eletromagnética pela força (aproximadamente) $q \times \vec{E}$, quando a velocidade da partícula (v) é muito menor que a velocidade da luz (c) no vácuo.

Considerando o campo elétrico de uma onda plana monocromática de frequência ν ; sob ação do campo elétrico uma carga q passa a ter um movimento oscilatório e a frequência de oscilação é a mesma que a do campo da onda incidente. A carga q acelerada passa a agir como uma fonte secundária de radiação. O resultado da ação do campo elétrico na matéria, é o deslocamento relativo das cargas positivas e negativas, fenômeno descrito como polarização do meio material devido ao campo elétrico $\vec{E}$. Para descrever a capacidade do meio material adquirir uma polarização é utilizado conceito de polarizabilidade, representado pelo símbolo α .

Para descrevermos a incorporação da energia eletromagnética por um átomo ou uma molécula é necessário recorrer ao formalismo da mecânica quântica. Quando a energia da radiação eletromagnética é incorporada dizemos que há a absorção. Se a luz emitida após a absorção não tiver a mesma frequência que a luz absorvida (maior ou menor) dissemos que esta luz é o resultado do espalhamento não-elástico (frequências diferentes).

O fenômeno do espalhamento de luz interessa neste trabalho em seu aspecto de instrumento de investigação das propriedades de macromoléculas. A fonte de radiação eletromagnética que se utiliza é constituída por um *laser* que é uma fonte de luz monocromática. A distância entre a fonte emissora e as dimensões dos centros espalhadores permitem admitir localmente a estrutura de uma onda plana, e se as dimensões das moléculas são muito menores que o comprimento de onda, admite-se que a



radiação eletromagnética emitida pelos elementos que constituem o centro de espalhamento estão em fase.

As macromoléculas investigadas em solução apresentam um movimento aleatório denominado de movimento Browniano, portanto a fonte de luz reirradiada possui uma velocidade em relação ao detector, o que acarreta uma pequena diferença na frequência da radiação detectada em relação a onda emitida devido a este movimento (efeito Doppler).

O movimento Browniano das moléculas em solução é responsável pelas flutuações locais da polarização, isto é, do número de dipolos por unidade de volume e consequentemente pela variação da intensidade da luz espalhada.

O conhecimento destas distintas intensidades, permite obter informações a respeito do movimento da partículas ou seja, do coeficiente de difusão e dimensões das macromoléculas. Este conhecimento é adquirido via função de correlação.

A técnica do Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL) permite determinar a função de correlação dos fótons. Considerando um equipamento típico de espalhamento de luz, os fótons são detectados por um simples dispositivo contador (figura 2.1).

A função de autocorrelação de um sinal para a intensidade de luz espalhada é dada pela expressão abaixo. O valor da intensidade do sinal é descrita pela função $I(t)$:

$$G = \int_0^{\infty} I(t)I(t+\tau)dt \quad (2.1)$$

A expressão 2.1 é chamada de valor da função de correlação, e é usada para descrever a correlação entre a intensidade medida no tempo $t=0$ e a mesma medida algum tempo depois ($t_n = t_0 + n\tau$). Um contínuo de valores da função de correlação não pode ser

obtida experimentalmente. Para compensar esta deficiência, utiliza-se um conjunto de valores que é determinado pelo detetor e por amplificadores operacionais e que são continuamente multiplicadas e adicionados.

Um parâmetro que define a qualidade de um detetor é sua velocidade, ou seja, a possibilidade de adicionar rapidamente números. O intervalo de tempo (α) determina o menor tempo de acessibilidade para $G(\tau)$. Assim, $G(\alpha)$ é o primeiro ponto numérico da curva da função de correlação que pode ser experimentalmente medido. Usando o acréscimo de tempo α , obtém-se uma rede de valores para os dados experimentais. O valor inicial do experimento é $t_0 = 0$, o próximo valor é para $t_1 = \alpha$, o segundo é para $t_2 = 2\alpha$ e assim por diante até $t_n = n\alpha$.

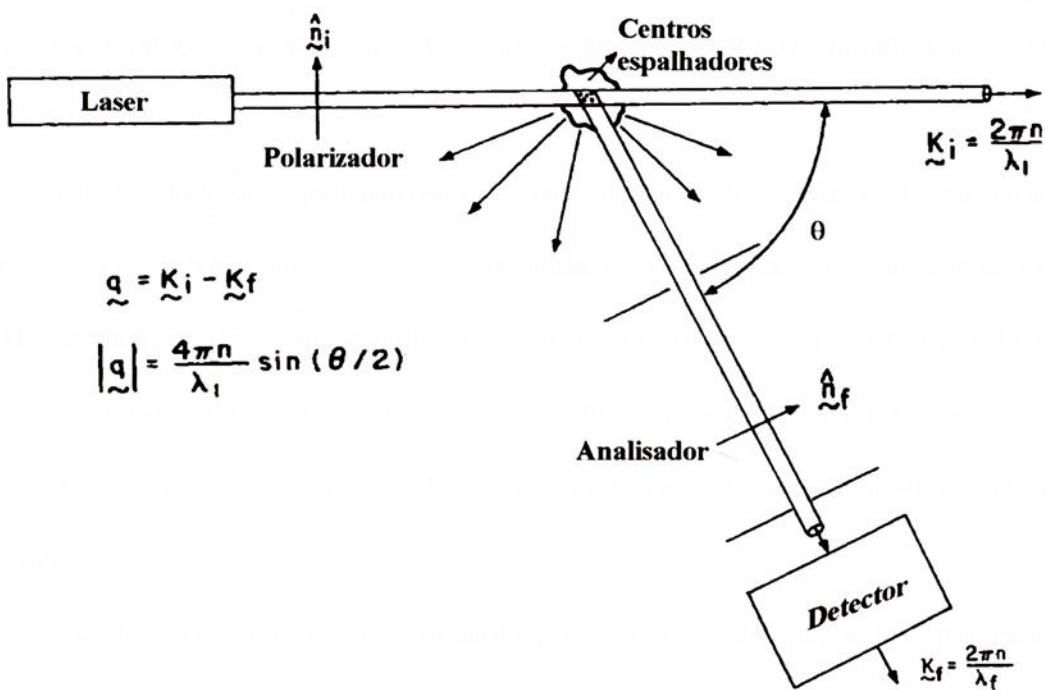


Figura 2.1: Diagrama representativo do equipamento de espalhamento de luz (extraído do livro *Dynamic Light Scattering with Applications to Chemistry* - Berne and Pecora, 2000 pg. 6).

Os valores das intensidades são relacionadas, comparando cada número com seu vizinho num definido intervalo de tempo. Esta comparação está associada ao tempo em que foi realizado o experimento, com a integral expressa como uma somatório com limite superior dado pelo índice apropriado, a função de correlação é calculada usando a relação :

$$G_k(\tau_k) = \sum_{i=0} I(t_i)I(t_i + \tau_k) \quad (2.2)$$

A equação 2.2 é geral e pode ser aplicada para descrever o decaimento de tempo linear ou arbitrário. A série dos valores $G(t)$ é normalizada para valores de tempos muito maiores que o tempo de decaimento característico ($t \rightarrow \infty$) por $G(\infty) = 1$, esta normalização impõe o limite teórico de $G(t_0) = 2$ em $t = 0$, para decaimento exponencial da função de correlação.

A intensidade do espalhamento é dependente da posição relativa da partícula e do detector. Uma mudança na posição da partícula é acompanhada por uma mudança na medida da intensidade de luz espalhada. A nova intensidade está correlacionada com a medida no instante inicial. Com o aumento do tempo, o volume de difusão aumenta e é acompanhado por uma diminuição da correlação entre as posições atual e a inicial da partícula.

Quando uma molécula é iluminada por um feixe de luz, a luz que incide na molécula é novamente irradiada em todas as direções. Para as partículas que têm dimensões menores que 5% do comprimento de luz incidente, essa re-distribuição da luz é descrito pela relação de espalhamento Rayleigh.

Nestas condições a intensidade de luz espalhada na aproximação de dipolo e com as dimensões do centro espalhador muito menor que o comprimento de onda (λ), é :



$$\frac{I_{\theta}}{I_0} = \frac{8\pi a \alpha^2}{\lambda^4 r^2} (1 + \cos^2 \theta) \quad (2.3)$$

Na relação 2.3 I_0 e I_{θ} são a intensidade de luz observada de um ângulo θ em relação a direção do feixe a uma distância r das moléculas, α é a polarizabilidade e a é o número de partículas por centímetro cúbico.

Para sinais aleatórios e para um tempo maior de medida, os valores de G podem resultar em um mesmo número. O sinal pode ser descrito como não correlacionado, e o resultado da curva da correlação da intensidade é constituído por flutuações sobre a linha de base. No espalhamento de luz por moléculas em movimento Browniano, a curva da correlação da intensidade exibe um decaimento exponencial.

A correlação da posição da partícula para pequenos deslocamentos é descrita pela função de correlação da intensidade medida. Na ausência de quaisquer forças aplicadas, a posição da partícula é imposta pelo movimento Browniano. O valor da função de correlação obtida é a medida indireta do coeficiente de difusão das partículas.

Para um processo típico de difusão a função de correlação tem a forma de $1 +$ o valor da função de decaimento (uma função exponencial). A constante de decaimento é dado por γ , na equação 2.4 está representada a função de correlação.

$$G = 1 + \exp(-\gamma t) \quad (2.4)$$

$$\gamma = \frac{D}{q^2} \quad (2.5)$$

$$q = \frac{4n_0\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (2.6)$$

$$D = \frac{kT}{f} = \frac{kT}{6\pi\eta R} \quad (2.7)$$

sendo D o coeficiente de difusão e γ é a constante de decaimento ($\tau = 1/\gamma$), λ o comprimento de onda da luz no vácuo e n_0 o índice de refração do meio.

Nos experimentos de espalhamento dinâmico de luz, o raio (R) da partícula é inferida a partir do coeficiente da difusão (D) e pela equação de Stokes Einstein (2.7), k é a constante de Boltzman, T é a temperatura, η é a viscosidade, e $f = 6\pi\eta R$ que descreve o "atrito" para uma esfera compacta no meio viscoso.

Na prática as macromoléculas em solução não são esféricas, o raio calculado da forma acima a partir do coeficiente de difusão das partículas oferece uma estimativa do tamanho aparente da partícula hidratada/solvatada designada pela terminologia "raio hidrodinâmico". O raio hidrodinâmico (R_h) inclui o efeito decorrente da forma e da hidratação das partículas.

2.2. Espectroscopia de Fluorescência

A espectroscopia de fluorescência tem como princípio o fenômeno da emissão de fótons que acompanha o decaimento de um átomo ou molécula eletronicamente excitada, do primeiro estado singleto excitado para o estado fundamental (figura 2.2). O tempo de vida de fluorescência, o primeiro intervalo de tempo médio que um fluoróforo permanece no estado excitado, tem valores entre 0,1 a 10 ns. Neste intervalo de tempo, uma grande

variedade de processos moleculares podem ocorrer, afetando as características espectrais do fluoróforo. Isto faz da fluorescência um método bastante sensível e entre no estudo de proteínas, membranas e na investigação de suas interações.

O espectro de emissão fluorescente dos fluoróforos é sensível à polaridade do meio que o envolve. Nas proteínas, o triptofano é uma sonda fluorescente intrínseca, permitindo assim investigar as mudanças no seu microambiente.

Para um fluoróforo no estado excitado, pode ocorrer uma transferência parcial de energia antes da emissão, devido a interação com o meio que o envolve. Os vários processos que estão envolvidos nesta transferência de energia são denominados de efeitos do solvente e ocorrem dentro do intervalo de tempo que precede a emissão fluorescente. O conjunto de efeitos é dividido de acordo com suas origens em duas categorias: a dos efeitos gerais e a dos efeitos específicos.

Os efeitos gerais do solvente são aqueles que dependem do índice de refração e constante dielétrica do meio que envolve o fluoróforo. Os valores do índice de refração do momento dipolo e da constante dielétrica do meio dependem das moléculas do meio. O fluoróforo no estado excitado possui momento de dipolo elétrico diferente do seu momento de dipolo no estado fundamental. Após a excitação, este novo momento de dipolo perturba o meio que o envolve, ocorrendo então uma reorganização das moléculas do solvente em torno do fluoróforo.



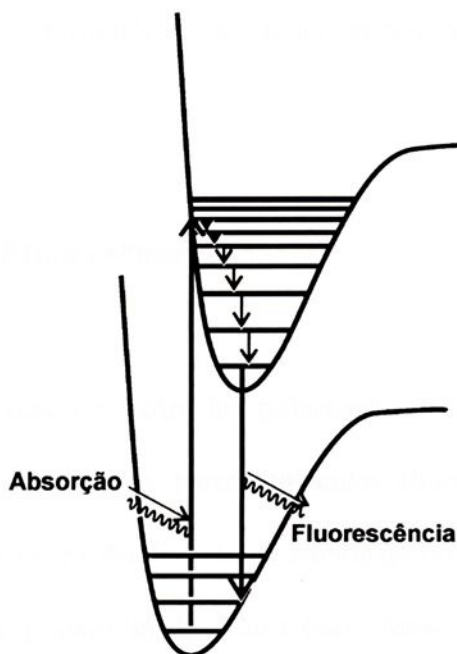


Figura 2.2: Etapas envolvidas no processo de fluorescência. Após a absorção inicial ocorre o decaimento com transferência de energia para a vizinhança. A transição radiativa (absorção) é do estado fundamental para o estado eletrônico superior.

O intervalo de tempo em que ocorre a absorção, da ordem de 10^{-15} segundos, é pequena demais para que ocorra movimentação de núcleos durante este processo apenas a carga eletrônica se redistribui durante a absorção.

Os efeitos específicos envolvem interações específicas entre moléculas do fluoróforo e do solvente. Podem ocorrer a formação de pontes de hidrogênio entre moléculas do solvente e soluto, e ainda a formação de complexos entre estas moléculas.

Devido a interação com o solvente, os valores de energia dos níveis eletrônicos da molécula são distintos daqueles obtidos para a molécula no vácuo. O efeito do solvente polar, observado no espectro de emissão, é o deslocamento do comprimento de onda correspondente ao pico para comprimentos de onda maiores, (menor energia) e algumas vezes também pode ocorrer a diminuição na intensidade do pico. Este efeito é parcialmente revertido, ou seja, o pico de emissão se desloca para comprimentos de ondas menores e o

espectro pode aumentar em intensidade a medida que se diminui a polaridade do meio que envolve o fluoróforo.

2.2.1. Anisotropia de Fluorescência

As medidas de fluorescência com luz polarizada fornecem informações sobre o tamanho, formato e flexibilidade das macromoléculas fluorescentes. A fluorescência polarizada é determinada pela probabilidade de excitação dos fluoróforos que estão com orientações especiais e pela probabilidade destes fluoróforos excitados emitirem em uma dada orientação. Na prática o que se mede é a intensidade de emissão paralela e perpendicular ao feixe de luz polarizada incidente, denominada de anisotropia de fluorescência. A anisotropia de fluorescência é definida pela seguinte equação :

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (2.8)$$

sendo r a anisotropia de fluorescência, $I_{\parallel}$ e $I_{\perp}$ são as intensidades de fluorescência vertical e horizontal respectivamente da emissão polarizada, quando a amostra é excitada com luz verticalmente polarizada, conforme está ilustrado na figura 2.3. O denominador da equação acima representa a intensidade total de luz que poderia ser observada na ausência do polarizador.

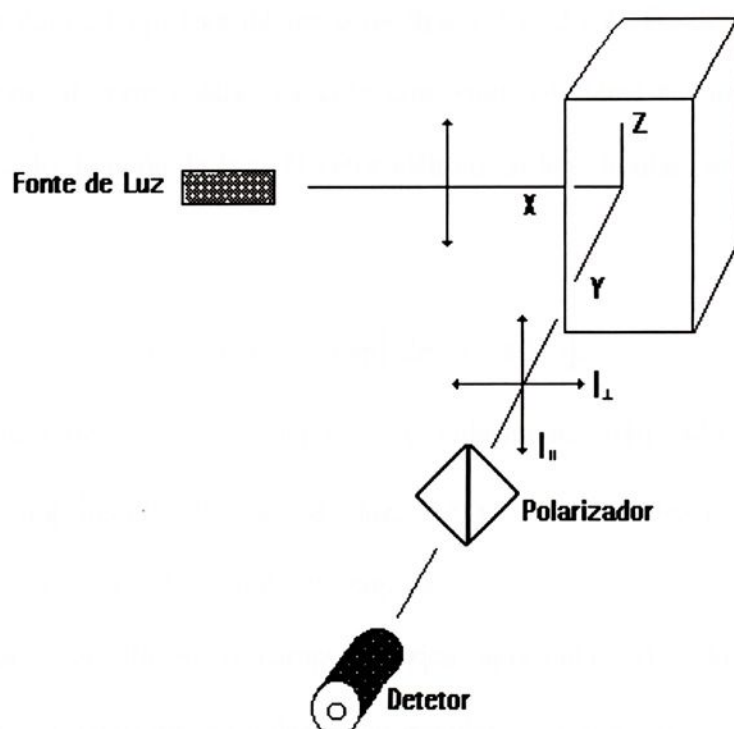


Figura 2.3: Diagrama da medida de anisotropia de fluorescência.

2.3. Dicroísmo Circular

A espectroscopia da quiralidade refere-se a espectroscopia que utiliza a luz polarizada e especialmente aos tipos de espectroscopia que utiliza a diferença das interações moleculares da luz polarizada a esquerda e a polarizada a direita na ausência de um campo magnético. Moléculas que apresentam quiralidade ou seja, que são enantiomorfas são opticamente ativas. Esta propriedade implica na interação distinta com a luz circularmente polarizada a esquerda e a direita.

A propriedade que consiste na interação distinta para a luz circularmente polarizada a esquerda e para a luz circularmente polarizada a direita emitidas com igual intensidade é denominada dicroísmo. O feixe de luz circularmente polarizada consiste de dois feixes de luz plano-ortogonal de 90° que estão fora de fase por $\pi/2$. O feixe de luz polarizado

circularmente a direita (rcp) está ilustrado na figura 2.4. Neste feixe, a variação do vetor elétrico na direção de propagação, executa uma volta completa em um comprimento de onda ou no período de onda de luz. O vetor elétrico da luz circularmente polarizada pode ser descrito por:

$$E_{\pm} = E_0(i \pm j) \exp[i 2\pi(\nu t - z/\lambda)], \quad (2.9)$$

onde $+$ se refere a luz rcp e $-$ a luz lcp (luz circularmente polarizada a esquerda); E_0 é a amplitude do comprimento da onda de luz; i e j são unidades dos vetores para as coordenadas x e y e $+z$ é a direção de propagação.

Na polarização linear, o campo elétrico apresenta direção constante, e sua amplitude varia, enquanto que na polarização circular o módulo do vetor campo elétrico é constante e a direção varia.

O sinal de CD é definido como a diferença entre a absorção da luz circularmente polarizada a esquerda e a circularmente polarizada a direita. A definição de absorbância para a luz circularmente polarizada a direita é descrita por :

$$A_r = \log_{10} \left(\frac{I_r^0}{I_r} \right) = \varepsilon_l C l, \quad (2.10)$$

onde I_r^0 é a intensidade da luz polarizada circularmente à direita incidente na amostra e I_r a intensidade de luz circularmente polarizada a direita após passar pelo solução opticamente ativa, cuja concentração molar é C e cujo coeficiente de extinção molar ε_l e l é o caminho óptico. Esta definição é a mesma para a luz circularmente polarizada a esquerda.

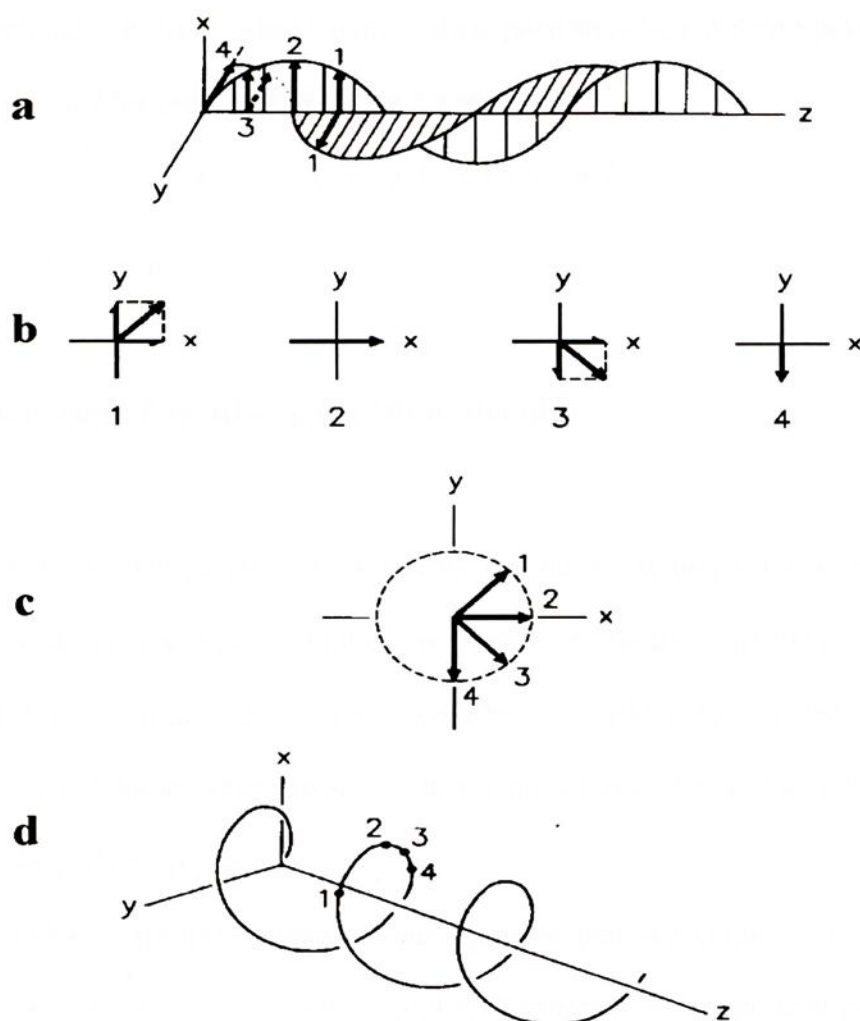


Figura 2.4: Luz circularmente polarizada à direita : **(a)** Os vetores elétricos ortogonalmente polarizados emitidos a 90° estão fora de fase. **(b)** Os componentes x e y estão representados no ponto ao longo do eixo z enumerado de 1 a 4 em **(a)**, junto com seus resultados. **(c)** A soma do vetor em **(b)** foi projetada sobre um plano normal na direção z , demonstrando que a extremidade do vetor do campo elétrico segue uma via circular quando examinada ao longo da direção de propagação, observada junto a fonte de luz. **(d)** Representa a luz polarizada circularmente a direita, mostrando o vetor do campo elétrico em função da posição junto a direção de propagação. Notar que o topo ou a extremidade do vetor do campo elétrico, representa uma hélice transmitida a direita. Com referência a **(a)** - **(c)**, notar que um observador em um ponto fixo no eixo z , olhando através da fonte de luz, verá o ponto 1 primeiro seguido do 4. Para este observador, o vetor do campo elétrico parecerá girar no sentido horário na direção da propagação em função do tempo. Na luz circularmente polarizada a esquerda, a extremidade do vetor do campo elétrico representa uma hélice transmitida a esquerda, e um observador no eixo z olhando através da fonte de luz verá no vetor do campo elétrico a rotação no sentido anti-horário (Circular Dichroism and the conformational analysis of biomolecules, Fasman, 1996 pp. 27).

Assim, a definição de CD, considerando as duas polarizações, é descrito pela diferença de absorbância para a luz polarizada a direita e a esquerda :

$$\Delta A = A_l - A_r = \varepsilon_l Cl - \varepsilon_r Cl = \Delta \varepsilon Cl, \quad (2.11)$$

sendo $\Delta \varepsilon$ é o CD molar.

2.3.1. Dicroísmo Circular para Biomoléculas

O conhecimento da estrutura tridimensional nativa de uma proteína é fundamental no entendimento de suas funções biológicas. Porém, é grande a dificuldade envolvida na obtenção dessas estruturas, iniciando por exemplo, com a obtenção dos cristais. Assim, são necessárias metodologias alternativas que forneçam informações diretas sobre a estrutura secundária de qualquer proteína.

Uma técnica apropriada para estimar a porcentagem das componentes da estrutura secundária de proteínas é o dicroísmo circular. O espectro de CD de uma proteína nativa para cada comprimento de onda é a soma da contribuição de cada uma das componentes da estrutura. Assim, técnicas não-invasivas capazes de fornecer informações sobre a estrutura secundária de uma proteína são potencialmente valiosas no entendimento da ação dessas macromoléculas. A estrutura secundária da proteína tem a unidade peptídica $O = C - N$ planar e rígida, mas apresenta liberdade rotacional em suas conexões.

O espectro de CD é dividido na região do UV próximo e na região do UV distante. Na região do UV próximo (intervalo para o comprimento de onda entre 250-300 nm), pode-se monitorar a contribuição dos aminoácidos aromáticos e também das pontes dissulfetos. A região de UV distante (intervalo para o comprimento de onda entre 190-



250 nm) é dominada pelas transições da cadeia peptídica da proteína. O conjunto oferece informações sobre a estrutura global da proteína.

A região do UV distante permite estimar a composição da estrutura secundária e monitorar mudanças que ocorrem na estrutura. A estrutura secundária é constituída e organizada na forma de α hélices, folhas β , voltas β e sequências aleatórias. Os sinais característicos destas estruturas estão representadas na figura 2.5. A seguir, serão apresentadas características de cada componente da estrutura secundária.

α -hélice: elemento da estrutura secundária nas proteínas, foi descrito pela primeira vez por Linus Pauling em 1951, como uma estrutura estável. A α -hélice apresenta 3,6 resíduos por passo de hélice. Nas proteínas globulares, a α -hélice varia consideravelmente em comprimento, de 4-5 aminoácidos até um número maior que 14 resíduos. A média do comprimento está em 10 resíduos, o que corresponde a 3 voltas. As pontes de hidrogênio da α -hélice, estão posicionadas na mesma direção que o eixo da hélice devido ao alinhamento das unidades peptídicas ao longo do eixo da hélice. O alinhamento confere um momento dipolo às unidades peptídicas decorrente das diferentes polaridades dos grupos NH e $C=O$, estes momentos de dipolos também estão alinhados ao longo do eixo da hélice. A proteína é uma rede de dipolos de α -hélices que confere carga parcial positiva ao amino terminal e uma carga parcial negativa ao carboxi-terminal. A magnitude da carga que contribui para o momento dipolo resultante correspondente a 0,5 - 0,7 da carga do elétron. As características gerais do espectro de CD para a α -hélice são de duas bandas positivas próximo de 222 nm e 208 nm.



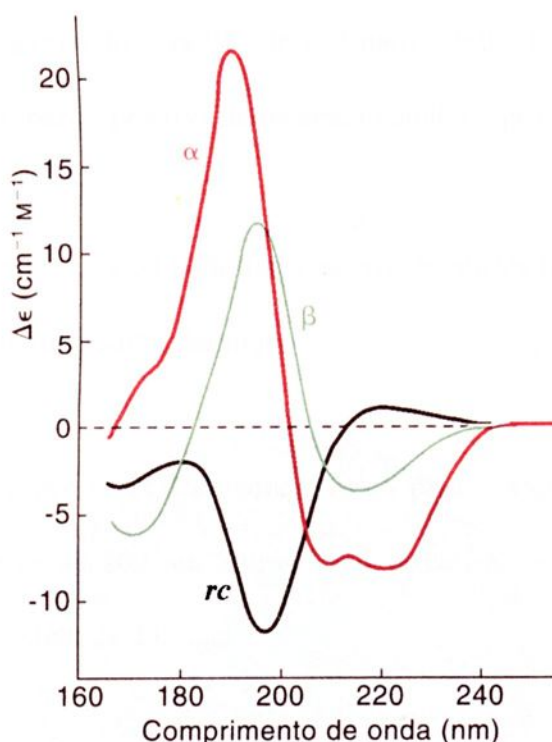


Figura 2.5: Espectros do dicroísmo circular para α -hélice (vermelho), folha β (verde) e uma região de sequência aleatória "random-coil" (preto) para uma cadeia polipeptídica.

Folha β : Esta estrutura é formada por uma combinação de uma ou várias regiões da cadeia polipeptídica e em contraste com a α -hélice, não está formada por uma região contínua e enrolada, mas sim quase totalmente distendida e plana. Nestas regiões, as fitas β , são usualmente formadas por 5-10 resíduos e estão alinhadas uma ao lado das outras com distância axial de 3,5 Å. A folha β é estabilizada por pontes de hidrogênio entre os grupos NH e $C=O$ em cadeias peptídicas diferentes, conferindo rigidez a estrutura. A folha β pode ser estendida em dois sentidos : no mesmo sentido - folha β paralela ou no sentido oposto - folha β anti-paralela. As ligações entre as folhas β paralelas e anti-paralelas são feitas pela volta β .

As características gerais do espectro de CD para a folha β é uma banda negativa próximo de 216 nm e uma banda positiva de mesma magnitude próximo de 195 nm (figura 2.5).

A volta β é usualmente usada para todas as possibilidades de volta que ocorrem, e sua caracterização não tem um padrão definido.

Sequência aleatória: O espectro de CD característico para a sequência aleatória é uma forte banda negativa abaixo de 200 nm e uma banda positiva próximo de 218 nm e as vezes uma banda fraca próximo de 235 nm.



Materiais e Métodos



CAPÍTULO 3

3. MATERIAIS e MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Reagentes

- Acrilamida (Pharmacia)
- Bis - Acrilamida (N, N' - metilenobisacrilamida), Pharmacia
- Carbonato de Cálcio (Sigma)
- Centricon 10 (Millipore)
- Centriprep10 (Millipore)
- Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) (Pharmacia)
- Etanol Absoluto (Carlo Erba)
- Fosfato de Sódio Monobásico e Dibásico (Sigma)
- Hi-Load Superdex 75 XK16/60, Pharmacia
- L- α - dipalmitoildifosfatidilcolina C16:1, [cis]-9) 99%; Sigma
- Nitrato de Prata (Merck)
- Resource-15S (Pharmacia)
- TEMED (N, N, N, N', N', tetrametiletilenodiamino), Pharmacia
- Tris [hidroximetil]amino-metano) (Pharmacia)



- Veneno bruto "cristalizado de Bothrops jararacussu"
- Ácido araquidônico (Sigma)
- Kit CK-UV, Sigma Chem. Co.

3.1.2. Equipamentos

- Centrífuga de mesa modelo Eppendorf 5415C
- Centrífuga Refrigerada Sorvall modelo RC 5B
- Coletor de frações FRAC-200, (Pharmacia)
- Espalhamento Dinâmico de Luz DYNAPRO MSTC014; (Protein Solutions- Inglaterra)
- Espectropolarímetro Jasco J-100 (Jasco Inc., Tokyo - Japão)
- Espectrofotômetro SLM 8100 (Spectronic Inc., Rochester NY)
- Fonte Pharmacia EPS310
- Evaporador rotativo MA 120, Marconi, Brasil
- FPLC P-500 (*Flow Pressure Liquid Chromatography*) (Pharmacia)
- Hoefer Multi Protein (Pharmacia)
- PHmetro modelo 430 (Corning)
- *Recorder* REC 102, (Pharmacia)
- Sonicador Virsonic 475, Virtis company, Inc. NY.

3.2. Métodos

3.2.1. Purificação da BthTX-I

3.2.1.1. Cromatografia de troca catiônica

O protocolo utilizado na purificação é uma variação do proposto por Spencer et al. (Spencer et al., 1998). As etapas do processo de purificação são:



O veneno bruto cristalizado da serpente *Bothrops jararacussu* (150 mg) é dissolvido em um volume de 1,2 ml de solução tampão 20 mM de fosfato de sódio pH 7,8 e centrifugado a 10.000 g por 15 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante é aplicado na coluna XK-50 empacotada com 40 ml da resina Resource-15S, tamanho da matriz de 15 μ m e capacidade de ligação da resina de 20 mg de proteína /ml de resina; equilibrada com tampão 20 mM fosfato de sódio pH 7,8 (tampão A). A coluna é equilibrada com 10 volumes de coluna com o tampão A, até retornar a linha de base, sendo que um primeiro pico eluído é decorrente de proteínas que apresentam ponto isoelétrico menor ou igual a 7,8 e portanto não ligam na coluna. A seguir, é feita uma segunda lavagem com 5 volumes de coluna com 110 mM de NaCl para eluir outras proteínas que estão ligadas mais fracamente a resina. Após estes procedimentos, é estabelecido na resina o início de um gradiente linear de concentração de sal a partir do tampão B (tampão B acrescido de 2 M de NaCl) e iniciando com 150 mM de NaCl até 2 M de NaCl. Foram coletadas frações de 5 ml/tubo num fluxo de 120 ml/h no coletor de frações FRAC200. O cromatograma foi traçado no Recorder REC 102 a partir da absorbância lida em 1.

3.2.1.2. Cromatografia em filtração em gel

A fração correspondente a aproximadamente 260-400 mM de NaCl (13-20% do gradiente) coletadas da Resource-15S foram submetidas novamente a técnica de cromatografia, utilizando agora uma resina de filtração em gel com a finalidade de obter a BthTX-I pura.

As amostras foram concentradas a 1/10 do volume utilizando CENTRICON10. A coluna Hi-Load Superdex G-75 (XK16/60) foi equilibrada com 5 volumes de coluna (600ml) com tampão 25 mM fosfato de Sódio pH 7,8; 150 mM NaCl. As amostras

contidas no pico de maior intensidade é a de interesse e foram concentradas e trocado o tampão inicial por 25 mM Tris-HCl pH 7,0 em CENTRIPREP10 2ml.

3.2.1.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)

O grau de pureza da proteína foi verificado usando o procedimento descrito por Laemmli (1970) com gel desnaturante (SDS-PAGE) 12 % (m/v) em acrilamida (bis-acrilamida : 0,8:30) foi preparado em tampão Tris-HCl 2,0 M pH 8,8 e SDS 0,1%. As condições de corrida do gel foi de 30 mA. Decorrido este processo, o gel foi corado por nitrato de prata.

3.2.1.4. Teste para Atividade Miotóxica

Camundongos Swiss (18 - 22 gramas) foram injetados intramuscularmente no gastrocnemius direito com diferentes doses (μ g) de cada toxina em 50 μ l de tampão fosfato salino (PBS). Os controles receberam somente PBS e três horas depois, o sangue dos camundongos foi coletado pela cauda em capilares heparinizados e imediatamente centrifugados. A atividade da enzima creatina cinase foi determinada utilizando-se 4 μ l de plasma pelo kit CK-UV 47-20 cinético. O procedimento consiste em incubar o plasma com 1,0 ml de reativo dissolvido em água destilada por 3 minutos a 37 °C e realizar leituras a 340 nm nos intervalos 0 e 3 minutos (Soares, 2000).

3.2.2. Preparo dos lipossomos

Os lipossomos foram preparados pela técnica de evaporação da fase reversa conforme está ilustrado na figura 3.1 (Skoza e Papahadjopoulos, 1978).



O fosfolípido dipalmitoildifosfatidilcolina (5 mg/ml) foi dissolvido em éter etílico e seco por evaporação rotativa. O DPPC adere na parede do frasco e para ressuspende-la faz-se necessário a adição de 2 ml de éter etílico e 1 ml de solução tampão - 25 mM Tris-HCl pH 7,0, 150 mM NaCl. A suspensão mantida no gelo, foi sonicada usando 25% da potência máxima do sonicador por 2 minutos para a formação da emulsão de fase reversa.

A fusão dessas micelas é induzida por uma evaporação lenta do éter resultando na fase reversa. Após esta evaporação, a solução, agora na fase aquosa, é deixada em banho a 45 °C por 30 minutos para a evaporação do éter residual. A solução de lipossomos utilizado nos experimentos, foi obtida a partir da diluição do estoque dos lipossomos (100 µl de solução contendo lipossomos em 900 µl de solução tampão) filtrado em filtro Miliipore de 0,4 µm.

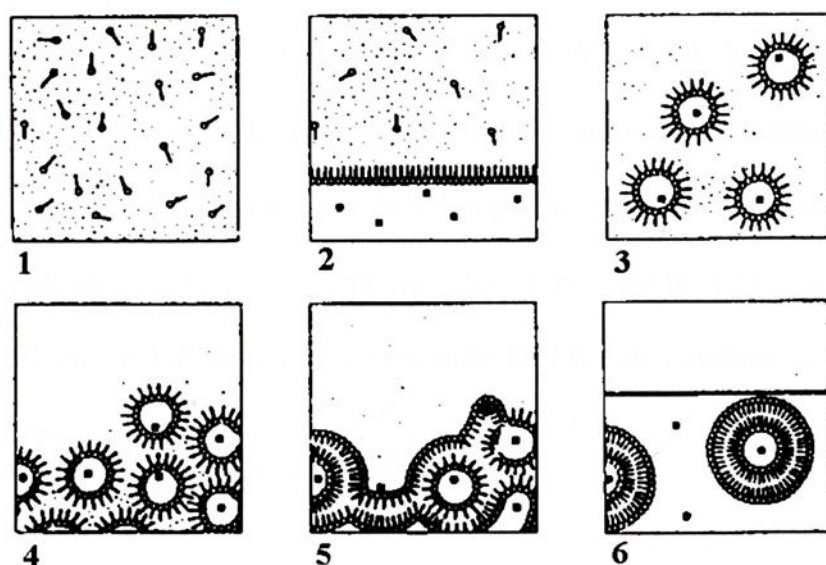


Figura 3.1: Diagrama representativo para a formação de lipossomos pelo método de evaporação de fase reversa. (1) os fosfolípidos dissolvidos em solventes (2) fixação dos fosfolípidos na superfície do frasco, (3) formação de micelas na fase reversa, (4, 5 e 6) Sonicação e a finalização com a formação dos lipossomos pela fusão das micelas.

3.2.3. Medidas utilizando espalhamento dinâmico de luz

3.2.3.1. Para avaliar a cmc do SDS em solução tampão para diversas forças iônicas

A calibração do equipamento DynaPro foi realizada periodicamente com uma amostra padrão adquirida do fabricante. O controle foi feito medindo o raio hidrodinâmico da proteína BSA (soro albumina bovina) 2,0 g/L. A qualidade da medida foi verificada através da função de correlação.

Experimentos utilizando a técnica de espalhamento dinâmico de luz (EDL) foram realizadas para a determinação da concentração micelar crítica do surfatante SDS em solução tampão 20 mM Tris-HCl pH 7,0, com concentrações de NaCl de zero, 25 mM, 100 mM e 150 mM. As amostras de tampão e surfatante foram filtradas em Anodisc 0,1 μ m Whatman e a cada titulação, foram centrifugadas a por 10 minutos para minimizar a presença de bolhas. As medidas foram realizadas em triplicatas.

As titulações foram feitas a partir de um estoque de 3mM de SDS e adicionado 2 μ l num volume de 200 μ l e deste volume retirados 12 μ l para as medidas de EDL, 82 acumulações do sinal para cada medida de 1,5 segundos. Os parâmetros utilizados para a análise dos resultados: linha de base mínima 0,997 e máxima de 1,01; limite mínimo da amplitude de 0,005 e 120 canais. A temperatura foi mantida constante a 25 °C por um sistema de Peltier.



3.2.3.2. Para investigar o sistema BthTX-I na presença de lipossomos zwitteriônicos (DPPC) para diferentes concentrações de SDS

Todas as medidas foram feitas em solução tampão 20 mM Tris-HCl pH 7,0; 150 mM NaCl filtradas em Anodisc 0,1µm Whatman. Concentração da proteína de 60 µM filtrada em Anodisc 0,02 µm Whatman. A cada titulação as amostras foram centrifugadas a 6000 g por 10 minutos para minimizar a presença de bolhas. As medidas foram feitas em triplicatas.

As titulações com o lipossomo foram obtidas de soluções com as concentrações de SDS de: 0; 60 µM; 120 µM e 240 µM. As medidas de EDL foram feitas em intervalos de tempo regulares de 10-15 minutos e uma outra medida após 24 horas com o sistema resultante da última adição de DPPC. Foram feitas 82 acumulações, o tempo de aquisição para cada medida foi de 1,5 segundos. Os parâmetros utilizados na análise foram : linha de base mínima 0,997 e máxima de 1,01; limite mínimo da amplitude de 0,005 e 120 canais. A temperatura foi mantida constante a 25 °C por um sistema Peltier.

3.2.4. Para investigar o sistema BthTX-I na presença do ácido araquidônico

3.2.4.1. Preparo do ácido araquidônico

O ácido araquidônico foi dissolvido em 1ml de tampão 25 mM Tris-HCl pH 7,0 com 150 mM de NaCl e 2ml de éter etílico. O frasco contendo a emulsão foi evaporado em roto-evaporador por 15 minutos restando apenas o tampão com o ácido araquidônico solúvel. A suspensão permaneceu por 45 minutos a 37°C para evaporar o excesso de éter.



3.2.4.2. Medidas de EDL para investigar o sistema BthTX-I na presença do ácido araquidônico

Foram realizados experimentos com o complexo BthTX-I/ácido araquidônico na presença de lipossomos *zwitteriônicos* em solução tampão 25 mM Tris-HCl pH 7,0; 150 mM NaCl e 70 μ M de BthTX-I. A solução tampão foi filtrada em Anodisc 0,1 μ m Whatman e a solução contendo a proteína filtrada em Anodisc 0,02 μ m Whatman. A cada titulação as amostras foram centrifugadas a 12rpm por 30 minutos. As medidas foram feitas em triplicatas.

As concentrações de ácido araquidônico utilizadas variaram de 70 μ M a 700 μ M, conforme indicado nas legendas das figuras. As medidas foram obtidas após os seguintes intervalos de tempo: 10 minutos após a adição do ácido araquidônico; após a adição dos lipossomos e 12 horas após a incubação em 37 °C . Condições experimentais: 50 acumulações; tempo de aquisição da medida 1,5 segundos, temperatura de 25 °C mantida por sistema Peltier. Os parâmetros utilizados na análise foram linha de base mínima de 0,997 e máxima de 1,01; limite mínimo da amplitude de 0,005 com 120 canais.

3.2.5. Fluorescência intrínseca do triptofano

As medidas de fluorescência intrínseca do triptofano foram realizadas em solução tampão 25 mM de Tris-HCl pH 7,0; 150 mM NaCl com concentração final da proteína 37 μ M BthTX-I. Os parâmetros usados e observados no experimento foram: excitação em 295 nm, emissão com comprimento de onda entre 305 a 450 nm com comprimento de onda



correspondente ao máximo de emissão do triptofano em 350 nm. Amostras foram mantidas em cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm à 22 °C.

3.2.5.1. Método de análise da intensidade de fluorescência – cálculo do centroíde

A partir dos dados de intensidade de fluorescência foi realizada uma conversão dos valores do comprimento de onda máximo (λ) para o número de onda (λ^{-1}) e a partir daí foram calculados as posições do centroíde (CM) do espectro através da equação:

$$CM = \frac{\sum I_{\lambda^{-1}} \cdot \lambda^{-1}}{\sum I_{\lambda^{-1}}} \quad (3.1)$$

onde $I_{\lambda^{-1}}$ é a intensidade de fluorescência correspondente ao número de onda λ^{-1} , expresso em cm^{-1} .

3.2.5.2. Anisotropia de fluorescência

Os dados, usando a técnica de anisotropia de fluorescência foram obtidas utilizando soluções tampão 25 mM de Tris-HCl pH7,0; 150 mM NaCl e concentração final de 37 μM de BthTX-I, com polarizadores prismáticos de quartzo Glan-Thompson na configuração T para comprimento de emissão fixo em 350 nm e excitação em 295 nm, em cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm, temperatura de 22 °C. Para cada medida foi feita a subtração do controle (branco).



3.2.6. Técnica de CD na investigação do sistema BthTX-I com lipossomos *zwiteriônicos*

3.2.6.1. Medidas na região de UV distante compreendidas entre 203nm-250nm

A calibração do espectropolarímetro foi feita periodicamente utilizando a molécula (+)-10-camforsulfônico. O espectro de CD padrão para esta molécula corresponde a duas bandas positivas : 290,5 nm e 192,5 nm.

As medidas foram feitas no espectropolarímetro na região de UV distante, compreendida entre 203-250 nm, com resolução de 0,5 nm; 5 acumulações com velocidade de varredura de 20 nm/segundos e sensibilidade de 100 mdeg com tempo de resposta de 1segundo. A força iônica (concentração de NaCl) na solução tampão 25 mM Tris-HCl pH 7,0; variou entre zero e 150 mM NaCl, conforme indicado nas legendas das figuras correspondentes a cada condição experimental .

Foram realizados experimentos com o complexo BthTX-I/SDS na tentativa de investigar a interação com lipossomo *zwitteriônico* - dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). Condições experimentais: um controle sem a adição de SDS; com 83 µM de SDS; 167 µM de SDS e 240 µM de SDS; caminho ótico da cubeta de quartzo era de 0,2 cm.

3.2.6.1.1. Cálculo da elipiticidade molar

A relação para a elipiticidade Molar é :

$$[\theta] = 100 \theta (\lambda) / lC \quad (3.2)$$

sendo C é a unidade de absorbância em moles • litros⁻¹ e l é o caminho óptico da cubeta em cm e as unidades de $[\theta]$ é dado por deg. cm² dmol⁻¹ (Fasman, G., 1996).



Resultados e Discussões

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos com a utilização das técnicas descritas e as discussões serão apresentados em seções para cada sistema investigado: 4.1- Interação SDS/BthTX-I; 4.1.1- Purificação e obtenção da BthTX-I; 4.2- Interação CHAPS/SDS/BthTX-I; 4.3- Interação BthTX-I e SDS na presença de lipossomos; 4.4- Interação BthTX-I e ácido araquidônico na presença de lipossomos e 4.5 -Termodinâmica da micelização e da ligação de surfatante à proteína.

4.1. Resultados e discussões para o sistema SDS/BthTX-I

4.1.1. Purificação da BthTX-I

A Figura 4.1 representa o resultado do processo de purificação para a BthTX-I obtido pela técnica de troca catiônica. O pico eluído com 260-400 mM de NaCl corresponde a fração que contém a BthTX-I. A fração foi repurificado pela técnica de filtração em gel (cromatograma não apresentado). O grau de pureza da BthTX-I foi verificada pela técnica de eletroforese SDS-PAGE (figura 4.2). O gel apresenta duas bandas com massas moleculares distintas.

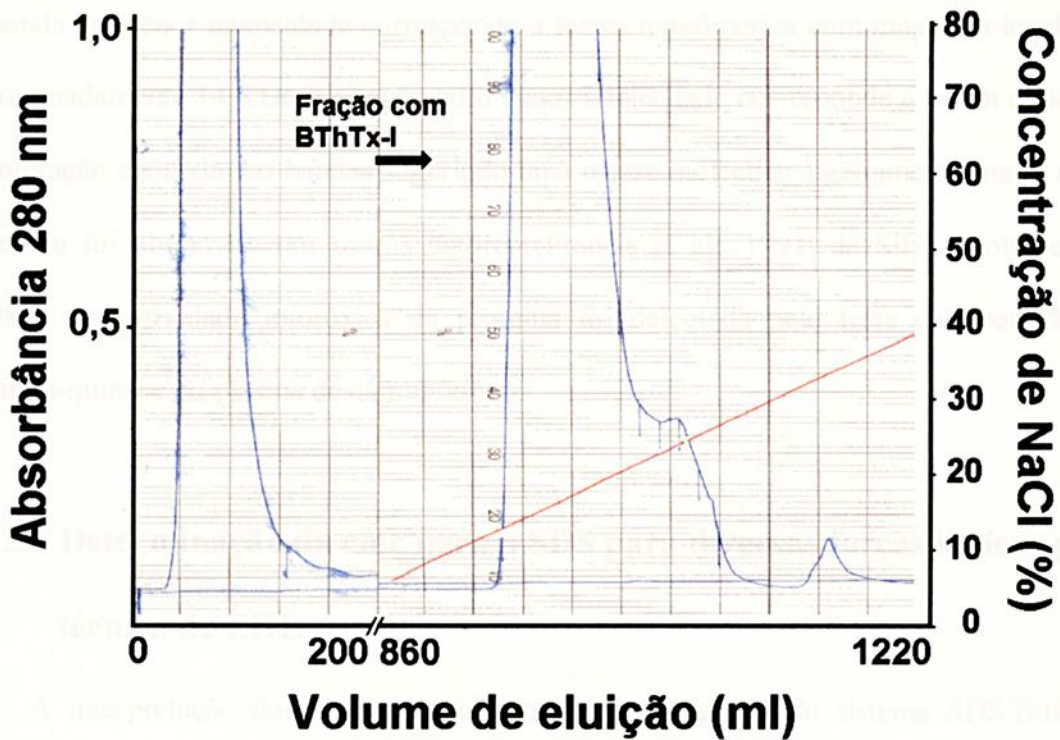


Figura 4.1: Cromatograma obtida da troca catiônica Resource - 15S para a purificação da BthTX-I com gradiente não-linear de NaCl de zero a 500 mM indicado pela linha vermelha. A absorbância foi monitorada em 280 nm (linha azul). O fluxo de fase foi de 2,5 ml/min.

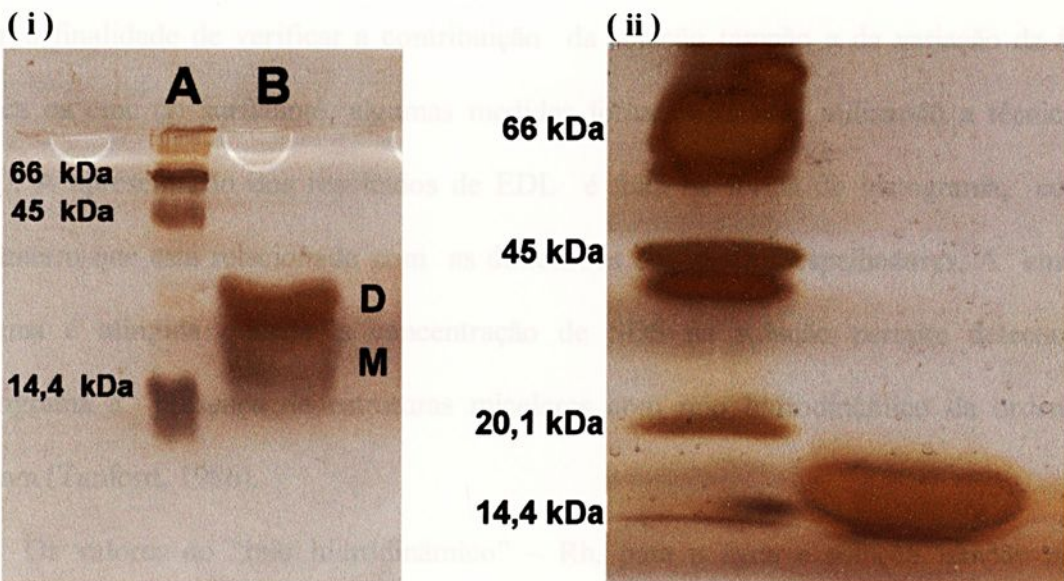


Figura 4.2: Gel SDS-PAGE 12% corado com nitrato de prata. (i) Na canaleta A marcador de peso molecular e na canaleta B a banda de maior intensidade indicada pela letra D corresponde a forma dimérica e a letra M indica a forma monomérica da BthTX-I. (ii) forma monomérica da BthTX-I na presença de β -mercaptoetanol fervida por 5 minutos.

A banda de menor intensidade corresponde a forma monomérica com massa molecular de aproximadamente 14 KDa e a banda com maior intensidade corresponde a forma dimerica. A migração anômala das bandas sugerindo uma massa molecular ligeiramente maior que a esperada foi observada por outros autores (Francis et al., 1991; da Silva Giotto et al., 1998). A atividade miotóxica da proteína foi detectada pelo teste da liberação da creatina-quinase no plasma de camundongos.

4.1.2. Determinação da cmc para o SDS para diversas forças iônicas pela técnica de EDL

A interpretação dos resultados obtidos na investigação do sistema SDS/BthTX-I requer conhecimento da concentração micelar crítica do surfatante SDS. O sistema aqui proposto como objeto de investigação, é bastante heterogêneo e complexo e além disso, a BthTX-I apresenta características de anfifílico devido seu caráter hidrofóbico/hidrofílico. Com a finalidade de verificar a contribuição da solução tampão e da variação da força iônica na cmc do surfatante, algumas medidas foram realizadas utilizando a técnica de EDL. A apresentação dos resultados de EDL é feita na forma de histograma, com o parâmetro que está relacionado com as dimensões dos centros espalhadores. A cmc do sistema é atingida quando a concentração de SDS na solução permite detectar no histograma a presença de estruturas micelares com raio hidrodinâmico da ordem de 2,3 nm (Tanford, 1986).

Os valores do “raio hidrodinâmico” – R_h , para a água e solução tampão estão representados na figura 4.3. Na figura 4.3A e 4.3B, duas amostras de água Milli-Q com pH próximo de 6,0: uma filtrada e a outra submetida a bomba de vácuo. Os raios hidrodinâmicos com valores da ordem de $10^3 \text{ \AA}$ são atribuído a bolhas. Na amostra



submetida a bomba de vácuo, estas bolhas desaparecem. A presença de bolhas é minimizada centrifugando as amostras.

Gráficos e histogramas com os resultados obtidos na investigação do surfatante SDS, com o propósito de determinar a cmc para várias concentrações iônicas na presença do tampão (25 mM de Tris-HCl pH 7,0) são apresentados na sequência.

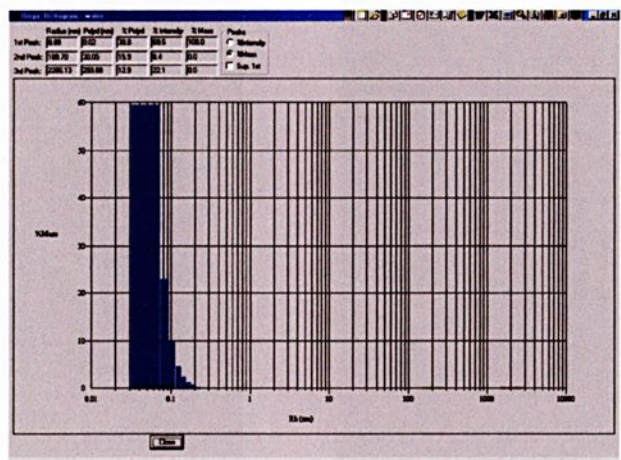
Os histogramas e gráficos mostram que a solução tampão praticamente não interfere no valor da concentração micelar crítica, pois na ausência de NaCl, o valor está entre 7,5 (figura 4.4A) a 7,8 mM (figura 4.4B) de SDS. A titulação de SDS está representada na figura 4.4C.

Para a solução tampão na presença de 25 mM de NaCl, (figura 4.5), o valor da cmc para o surfatante SDS está entre 3,0 (figura 4.5A) a 3,4 mM de SDS (figura 4.5B). O gráfico 4.5C representa toda a titulação de SDS.

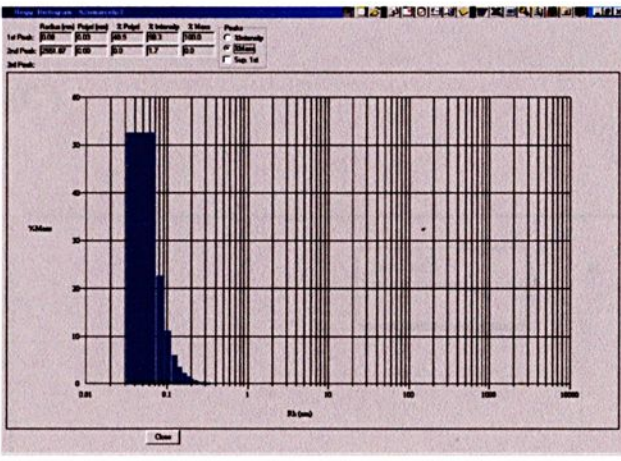
Na figura 4.6 em solução tampão com concentração de 100 mM de NaCl, o valor da cmc para o SDS está entre 1,05 (figura 4.6A) e 1,3mM (figura 4.6B). A figura 4.6C representa os valores do Rh para diversas concentrações de SDS.



(A)



(B)



(C)

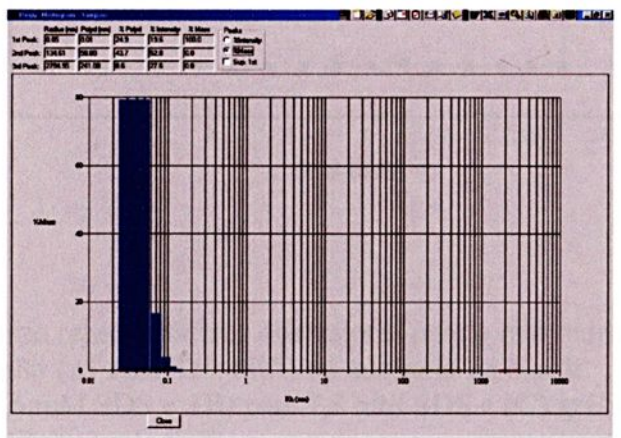


Figura 4.3: Histogramas representativo dos valores do raio hidrodinâmico (Rh) obtidos por EDL para: (A) água Milli-Q filtrada; (B) para a mesma amostra após a utilização da bomba de vácuo; (C) tampão 25 mM Tris-HCl pH 7,0; 150 mM NaCl.

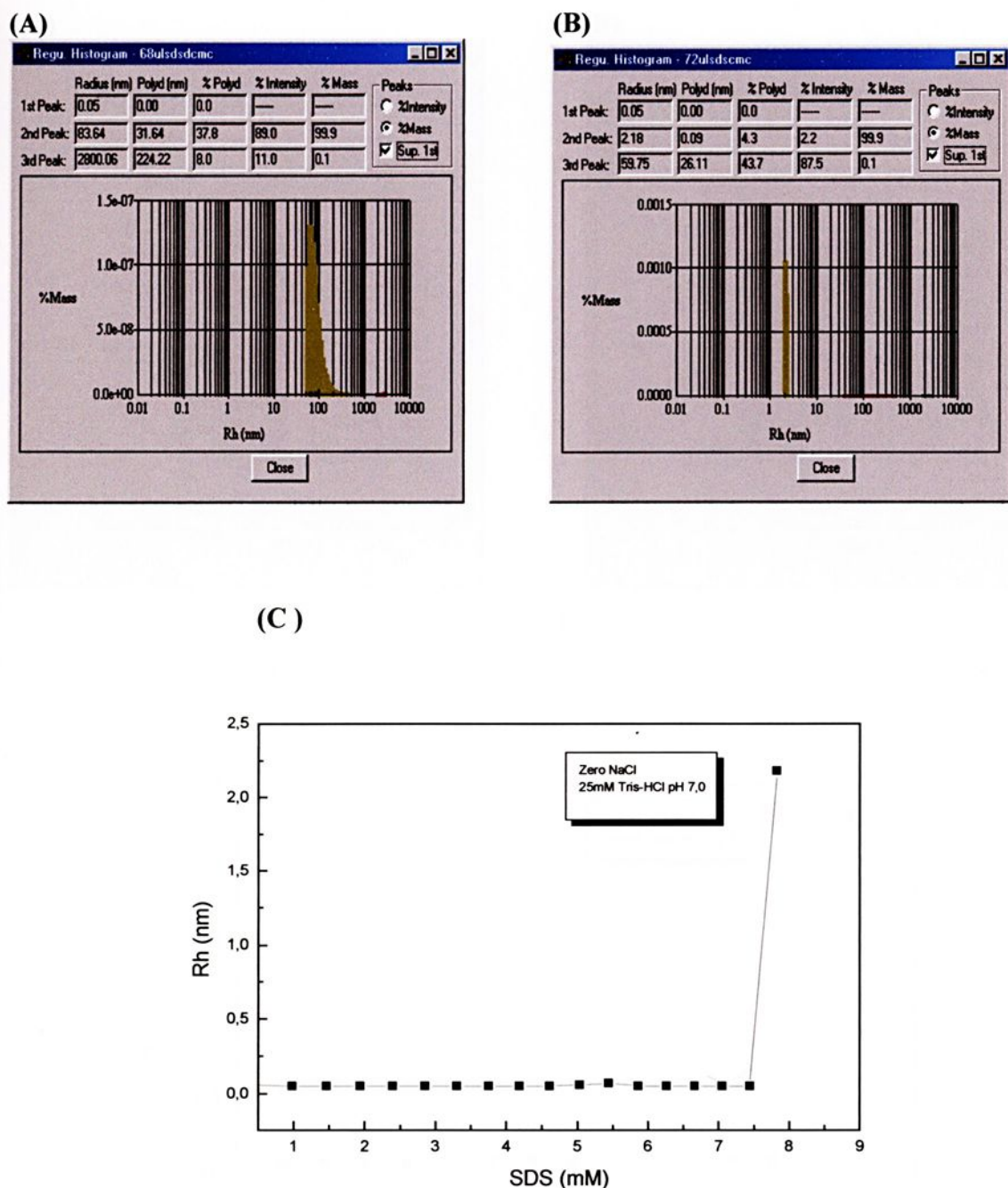


Figura 4.4: Histogramas representativos dos valores para o raio hidrodinâmico (Rh) para o SDS em solução tampão (25 mM Tris-HCl) na ausência de NaCl: (A) Valores do Raio hidrodinâmico para 7,6 mM SDS e (B) para 7,8 mM SDS e (C) gráfico dos valores de raio hidrodinâmico para a titulação de SDS.

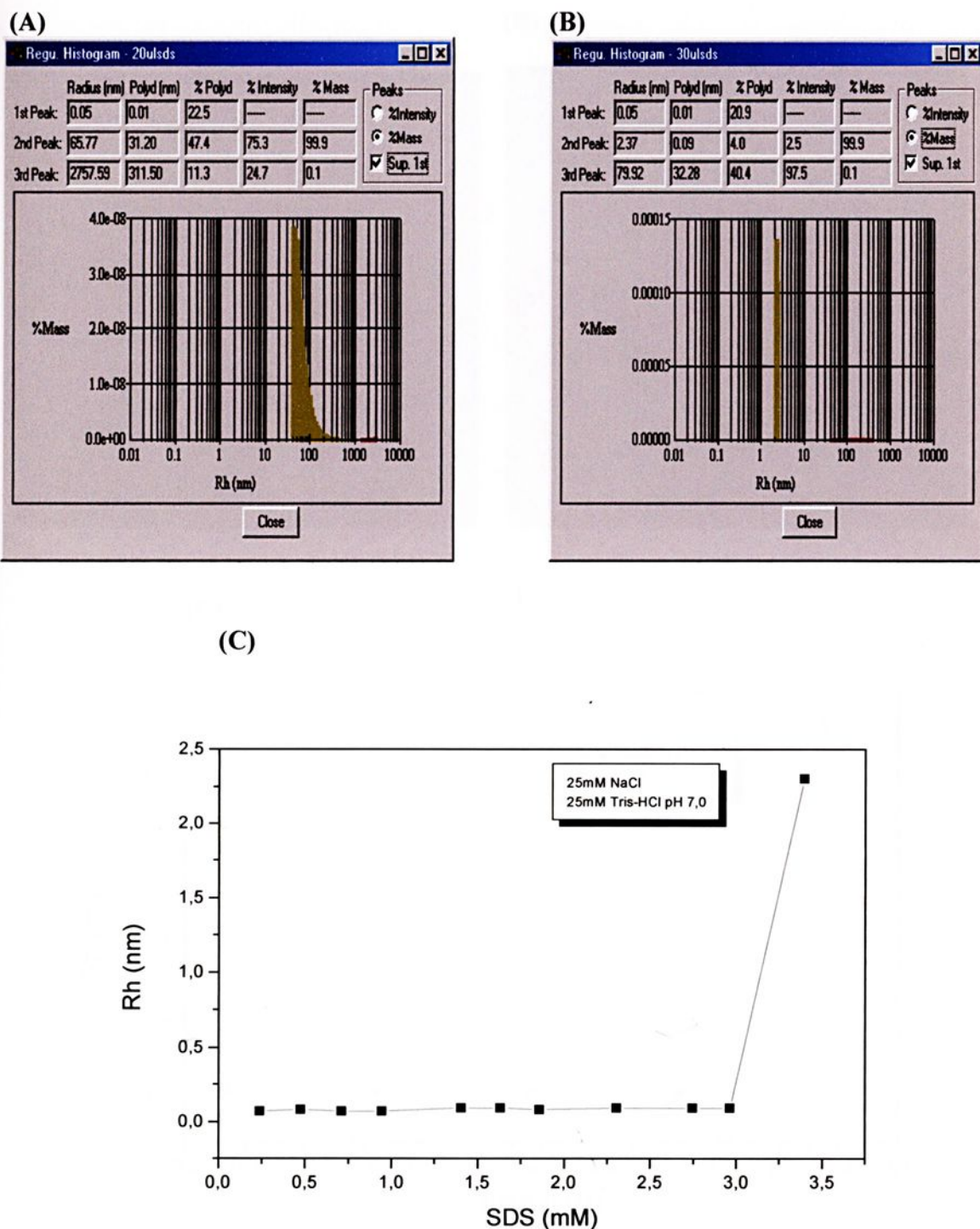


Figura 4.5: Histogramas representativos para os valores do raio hidrodinâmico (Rh) para o SDS em solução tampão (25 mM Tris-HCl, pH 7,0) na presença de 25 mM NaCl: (A) valores do raio hidrodinâmico para 3,0 mM SDS e (B) para 3,4 mM SDS e (C) gráfico dos valores do raio hidrodinâmico em diversas concentrações de SDS.

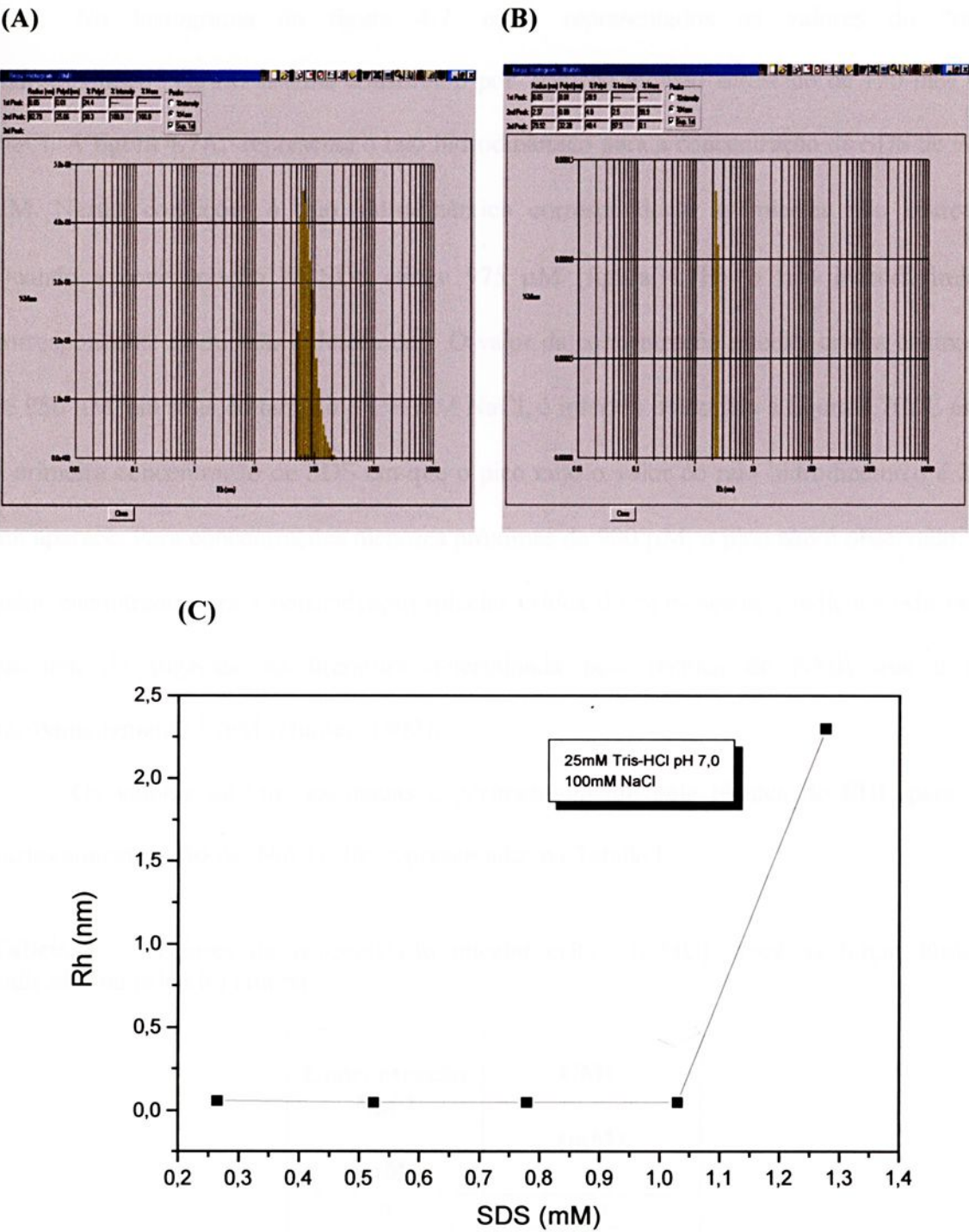


Figura 4.6: Histogramas representativos para os valores do raio hidrodinâmico (Rh) obtidos pela técnica de EDL para o SDS em solução tampão (25 mM Tris-HCl, pH 7,0) na presença de 100 mM NaCl: (A) valores do raio hidrodinâmico para 1,05 mM SDS e (B) para 1,3 mM SDS e (C) gráfico dos valores de raio hidrodinâmico em para a titulação com SDS.

No histograma da figura 4.7, estão representados os valores do “raio hidrodinâmico” para o sistema constituído por solução tampão acrescido de 150 mM de NaCl. A figura 4.7A, representa o raio hidrodinâmico para a concentração de SDS de 925 μM . Nestas condições o raio hidrodinâmico correspondente as micelas não aparece. Quando a concentração de SDS atinge 975 μM (figura 4.7B), o raio hidrodinâmico correspondente as micelas é detectado. O valor da concentração micelar crítica estimada de 950 μM , em solução tampão e 150 mM NaCl, é inferido utilizando a figura 4.7C. É esta a primeira concentração de SDS em que o pico cujo o valor do raio hidrodinâmico é 2,1 nm aparece. Para concentrações menores próximas de 900 μM , o pico não é observado. O valor encontrado para a concentração micelar crítica do SDS nestas condições está bem próxima da sugerida na literatura determinada pela técnica de NMR que é de aproximadamente 1 mM (Hunter, 1992).

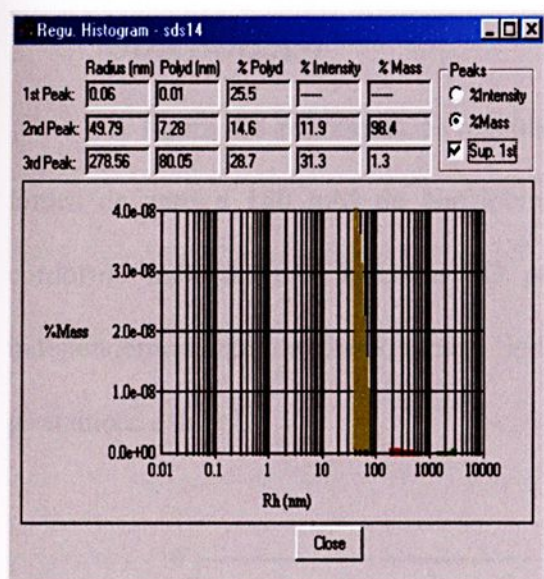
Os valores da cmc estimadas experimentalmente pela técnica de EDL para as várias concentração de NaCl estão representadas na Tabela I.

Tabela I : Valores da concentração micelar crítica (CMC) para as forças iônicas indicadas na primeira coluna.

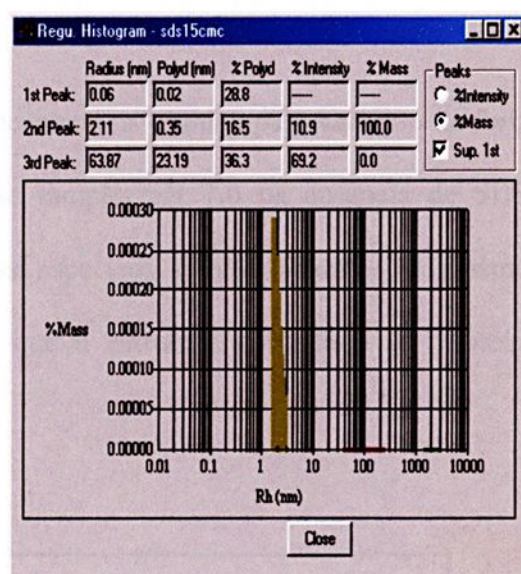
Concentração NaCl (mM)	CMC (mM)
0	7,7
25	3,2
100	1,2
150	0,95



(A)



(B)



(C)

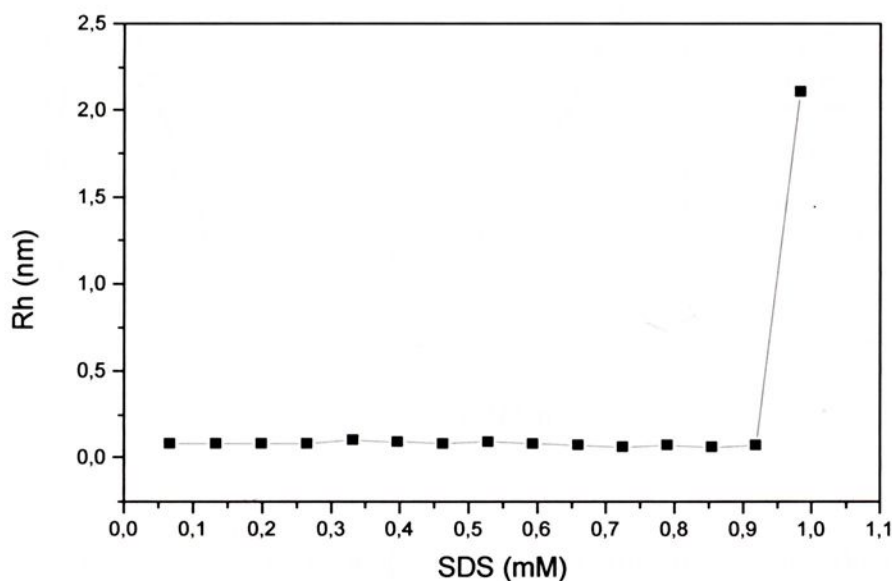


Figura 4.7: Histogramas representativos para os valores dos raio hidrodinâmico (Rh) para o SDS em solução tampão 25 mM Tris-HCl pH7,0; 150 mM NaCl: (A) valores do Rh para 925 μ M SDS e (B) para 975 μ M SDS e (C) valores do Rh para a titulação de SDS.

4.1.3 Medidas de CD para diversas forças iônicas para o sistema

SDS/BthTX-I

A figura 4.8 representa os resultados experimentais obtidos pela variação da força iônica de zero a 150 mM de NaCl em solução tampão pH 7,0 na ausência de SDS, conforme indicado na legenda. O perfil dos espectros é praticamente o mesmo, independentemente da força iônica, indicando que a estrutura secundária da proteína permanece estável.

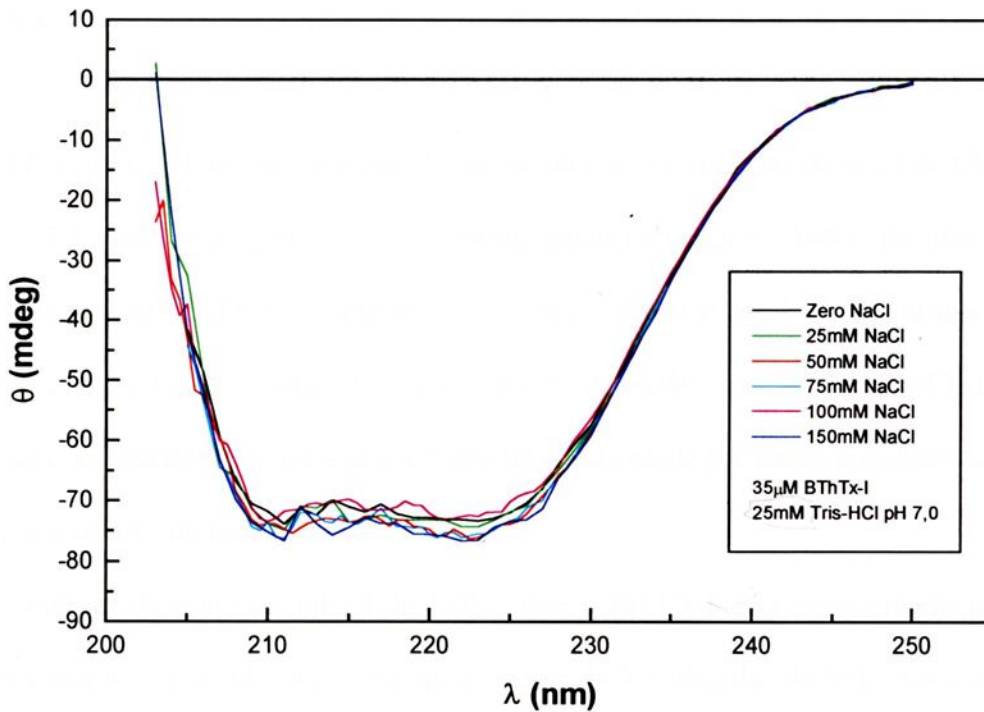


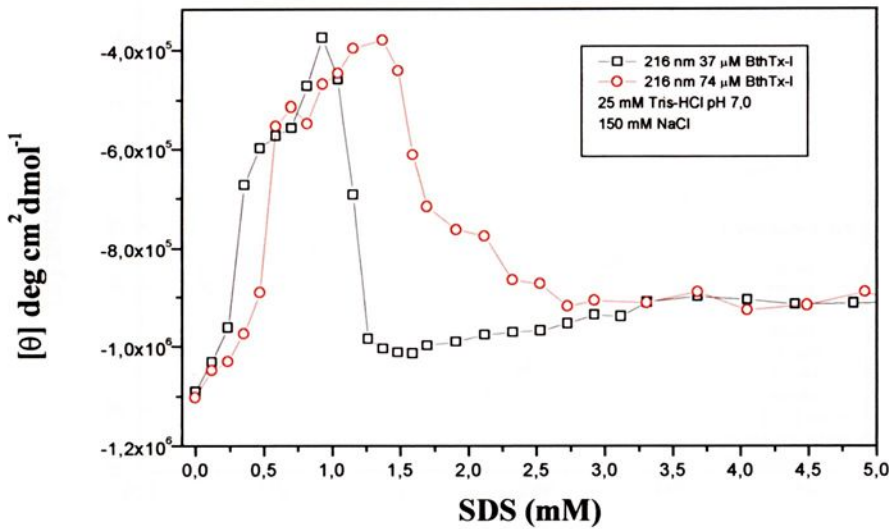
Figura 4.8: Espectros de CD para diversas forças iônicas. Os experimentos foram realizados em solução tampão 25 mM Tris-HCl pH 7,0 para as forças iônicas indicadas na legenda com 35 μM BthTX-I. As medidas foram realizadas a 25 °C em cubeta de quartzo de caminho óptico de 0,2 cm, no espectropolarímetro Jasco modelo 710 nas seguintes condições: 5 acumulações, velocidade de varredura 20 nm/min; largura da banda de 1,0 nm e tempo de resposta de 1 segundo.

Os resultados exibidos na figura 4.9 em que os sistemas apresentam concentrações de proteína uma o dobro da outra ($37\ \mu\text{M}$ e $74\ \mu\text{M}$), permitem concluir que as moléculas de proteína podem ser consideradas como independentes e além disso, praticamente todo SDS adicionado ao sistema se liga à proteína. Estas conclusões são obtidas uma vez que é necessário o dobro de SDS quando se tem o dobro de BthTX-I para obter o mesmo resultado. Para os comprimentos de onda indicados na legenda da figura 4.9A e 4.9B, as atribuições que se tem na literatura, a respeito da variação do sinal de CD são: para $216\ \text{nm}$ as contribuições mais significativas são da componente folha β e sequência aleatória e para $222\ \text{nm}$ os efeitos são atribuídos às variações do componente da α -hélice na estrutura terciária.

Na figura 4.10 estão representados os resultados da variação do sinal de CD para a região de UV distante para os valores da razão molar entre zero e 108 moléculas de SDS por monômero de BthTX-I. O que deve ser notado é que o sinal de CD atinge valores mínimos quando a razão molar está por volta de 25 moléculas de SDS/BthTX-I, e com continuada adição de SDS, retorna a valores de elipiticidade próximos aos detectados para os menores valores da razão molar.

O efeito da titulação inicial de SDS sobre a BthTX-I está representado na figura 4.11. Verifica-se, que até o valor da razão molar de 5 moléculas de SDS por monômero de proteína, não há modificações nas componentes da estrutura secundária da BthTX-I. A partir da razão molar de 5 moléculas de SDS por BthTX-I, a adição de SDS provoca a diminuição mais pronunciada nos valores da elipiticidade.

(A)



(B)

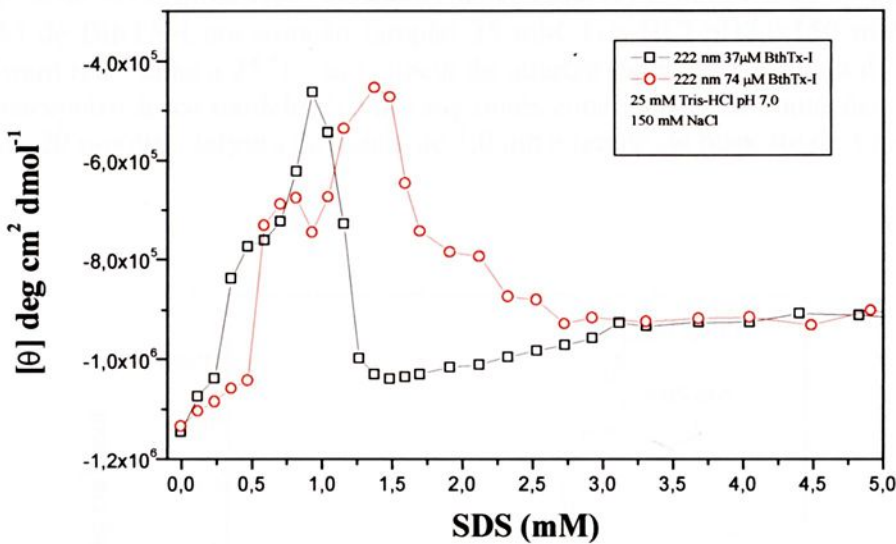


Figura 4.9: Elipiticidades molares em dois comprimentos de onda obtidos da titulação de SDS para concentrações distintas de BthTX-I (A) 37 μ M e (B) 74 μ M conforme indicado na figura. Os experimentos foram realizados em solução tampão 25 mM Tris-HCl pH 7,0; 150 mM NaCl. As medidas foram realizadas a 25 °C em cubeta de quartzo de caminho óptico de 0,2 cm, no espectropolarímetro Jasco modelo 710 nas seguintes condições: 5 acumulações, velocidade de varredura 20 nm/min; largura da banda de 1,0 nm e tempo de resposta de 1 segundo.

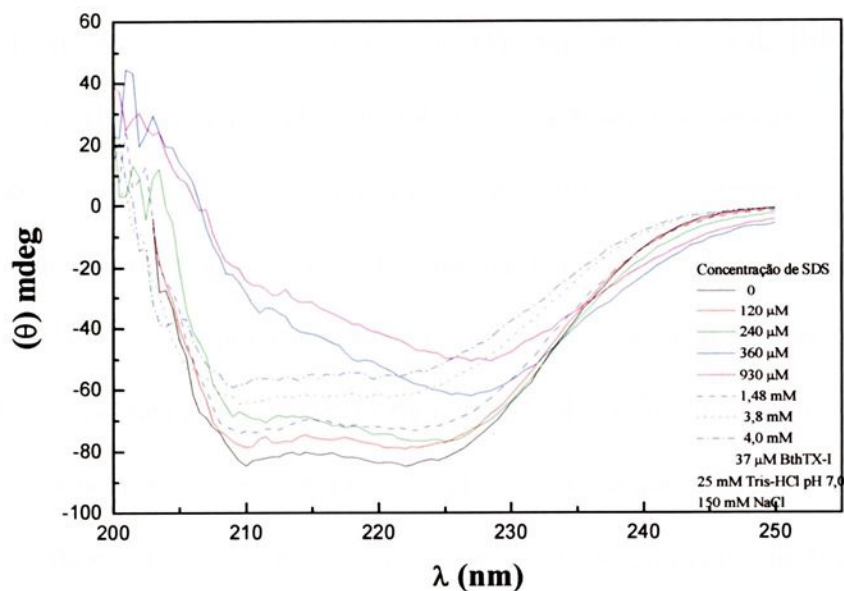


Figura 4.10: Espectros de CD representativo da titulação da BthTX-I com SDS. As concentrações de SDS (mM) estão indicadas na legenda. Os experimentos foram realizados com 37 μ M de BthTX-I em solução tampão 25 mM Tris-HCl pH 7,0; 150 mM NaCl. As medidas foram realizadas a 25 °C em cubeta de quartzo de caminho óptico de 0,2 cm, no espectropolarímetro Jasco modelo 710 nas seguintes condições: 5 acumulações, velocidade de varredura 20 nm/min; largura da banda de 1,0 nm e tempo de resposta de 1 segundo.

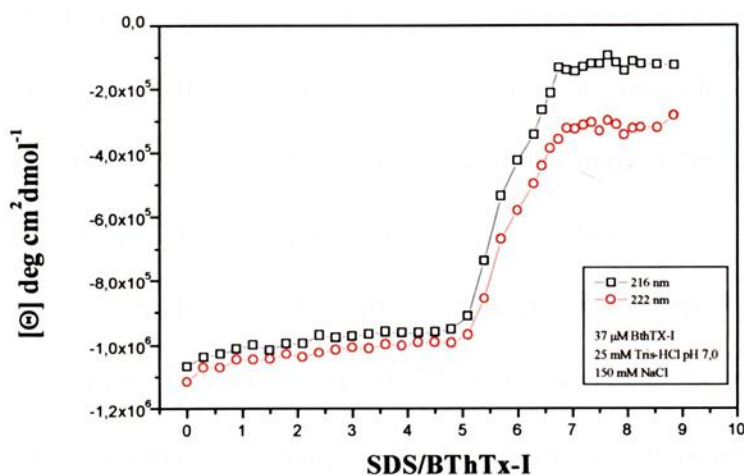


Figura 4.11: Titulação de SDS monitorada com os comprimentos de onda 216 nm e 222 nm. Os experimentos foram realizados em solução tampão 25 mM Tris-HCl pH 7,0; 150 mM NaCl 35 μ M BthTX-I. As medidas foram realizadas a 25 °C em cubeta de quartzo de caminho óptico de 0,2 cm, no espectropolarímetro Jasco modelo 710 nas seguintes condições: 5 acumulações, velocidade de varredura 20 nm/min; largura da banda de 1,0 nm e tempo de resposta de 1 segundo.

O conjunto de gráficos apresentado na figura 4.12 mostra numa faixa comum, que está compreendido entre zero e 5 moléculas de SDS por monômero de BthTX-I que não há variações significativas para os componentes da estrutura secundária. A partir de 5 moléculas de surfatantes por monômero de BthTX-I, ocorrem modificações conformacionais na estrutura secundária da proteína. Para valores de razões molares acima de 8-10 moléculas de SDS por monômero de proteína, a solução aquosa composta por proteína e SDS apresenta um espalhamento adicional da luz que pode ser detectado visualmente na cubeta, sendo mais intenso nas condições em que a força iônica é maior. O espalhamento adicional de luz desaparece com o prosseguimento da titulação e sua extinção ocorre para valores distintos da razão molar para diferentes valores de forças iônicas. Este efeito está associado às propriedades do surfatante e não às características da proteína uma vez que a sua estrutura secundária é independente da força iônica (figura 4.8).

A partir da razão molar correspondente a 10 moléculas de SDS por monômero de BthTX-I, para cada valor de força iônica, os experimentos mostram características distintas. Para os gráficos correspondentes a zero e 25 mM de NaCl não é atingido o valor correspondente ao valor da cmc (vide tabela I) e ainda é possível detectar visualmente o espalhamento adicional de luz, ainda que com pouca intensidade.

Para os valores de força iônica 50 e 75 mM, o intervalo correspondente às concentrações de razões molares entre 10-22 moléculas de SDS por monômero de proteína, é o que apresenta uma maior diferença para as componentes da estrutura secundária. Por outro lado, para valores de concentrações 100 e 150 mM, estas diferenças são atenuadas. No intervalo para os valores de razão molar entre 10-25 moléculas de SDS/BthTX-I, percebe-se para as concentrações de 50 e 75 mM de NaCl, uma estrutura de



saturação semelhante a um “ombro”. Os resultados obtidos dos dados de CD sugerem que o surfatante adicionado está se ligando aos sítios hidrofóbicos localizados na parte ventral da proteína (vista da membrana). Quando o valor da elipiticidade molar atinge os menores valores, a intensidade do espalhamento adicional de luz é máxima. O espalhamento adicional de luz é consequência da variação local do índice de refração (espalhamento Rayleigh ($1/\lambda^4$)). A intensidade máxima do espalhamento adicional de luz está associado às flutuações populacionais do sistema proteína-surfatante, ou seja, na solução aquosa tem-se: moléculas de surfatantes ligados aos monômeros de proteína em número variável, monômeros de surfatante na fase final do processo de micelização e micelas de SDS liberadas e que se decompõem em monômeros. É fato conhecido que a concentração micelar crítica do SDS é tanto menor quanto maior a força iônica (vide tabela I).

Existe uma relação de moléculas de surfatante por monômero da proteína para a qual o sinal de CD passa por um “mínimo” e na figura 4.12 observa-se que quanto menor a força iônica maior a proporção de moléculas de surfatante por monômero na posição do mínimo. Estes eventos para as forças iônicas mais elevadas (> 50 mM NaCl) correspondem às condições em que se tem na solução moléculas de surfatante livres com valores de concentração próximos à concentração micelar crítica. Na figura 4.12 estas condições estão indicadas pelas setas. Com relação ao surfatante que deixou a proteína na forma de micelas, infere-se que se a concentração de moléculas de surfatante livre, não ligadas à proteína, estiver abaixo da concentração micelar crítica essa micela se decompõe rapidamente em monômeros (tempo da ordem 10^{-3} segundos), e como consequência há flutuações na polarização do meio devido a decomposição de micelas do surfatante SDS em monômeros.

Se o sistema já atingiu a cmc (valores indicados pela seta) a adição de monômeros de SDS, altera muito pouco o sinal de CD, não reproduzindo mais o sinal inicial da titulação. A partir do valor da razão molar correspondente à volta do sinal, os monômeros de SDS adicionados se ligam preferencialmente às micelas presentes no sistema ou formam micelas, estejam as micelas ligadas, via interação coulombiana à proteína (na condição de baixa força iônica) ou em solução.

A figura 4.13 representa o sinal de CD para as diversas forças iônicas para três condições experimentais: (a) BthTX-I na ausência de SDS; (b) para valores iniciais da razão molar entre 4-5 moléculas de SDS/BthTX-I e (c) o primeiro valor da razão molar em que o sinal retorna praticamente ao detectado quando o valor inicial da razão molar estava entre 4 a 5 moléculas de SDS/BthTX-I. O valor da razão molar em que cada espectro retoma as características semelhantes ao sinal correspondente a 4-5 moléculas de SDS, é dependente da força iônica.



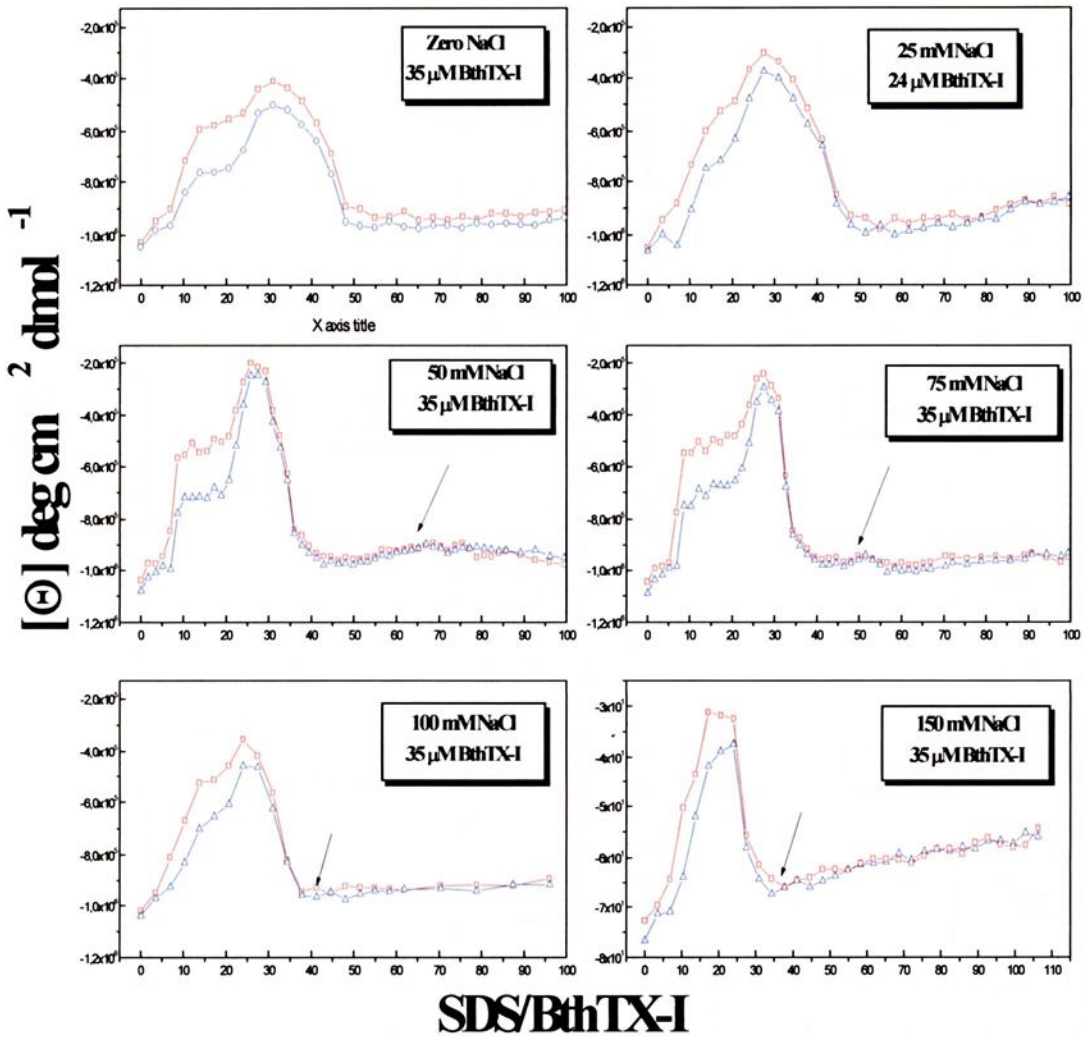


Figura 4.12: Elipiticidade molar versus razão SDS/BthTX-I. Valores da elipiticidade molar obtidos da titulação de SDS para a 35 μM de BthTX-I (exceto para 25 mM NaCl, onde a concentração de BthTX-I corresponde a 24 μM) em solução tampão 25 mM Tris-HCl pH 7,0 para as forças iônicas indicadas. Os comprimentos de ondas 216 nm em quadrados vermelhos ($\square$) e 222 nm triângulos azuis ($\triangle$) correspondem a folha- β , sequência aleatória e a α -hélice respectivamente. As setas indicam o valor aproximado da cmc. As medidas foram realizadas a 25 °C em cubeta de quartzo de caminho óptico de 0,2cm, no espectropolarímetro Jasco modelo 710 nas seguintes condições: 3 acumulações, velocidade de varredura 20 nm/min; largura da banda de 1,0 nm e tempo de resposta de 1 segundo.

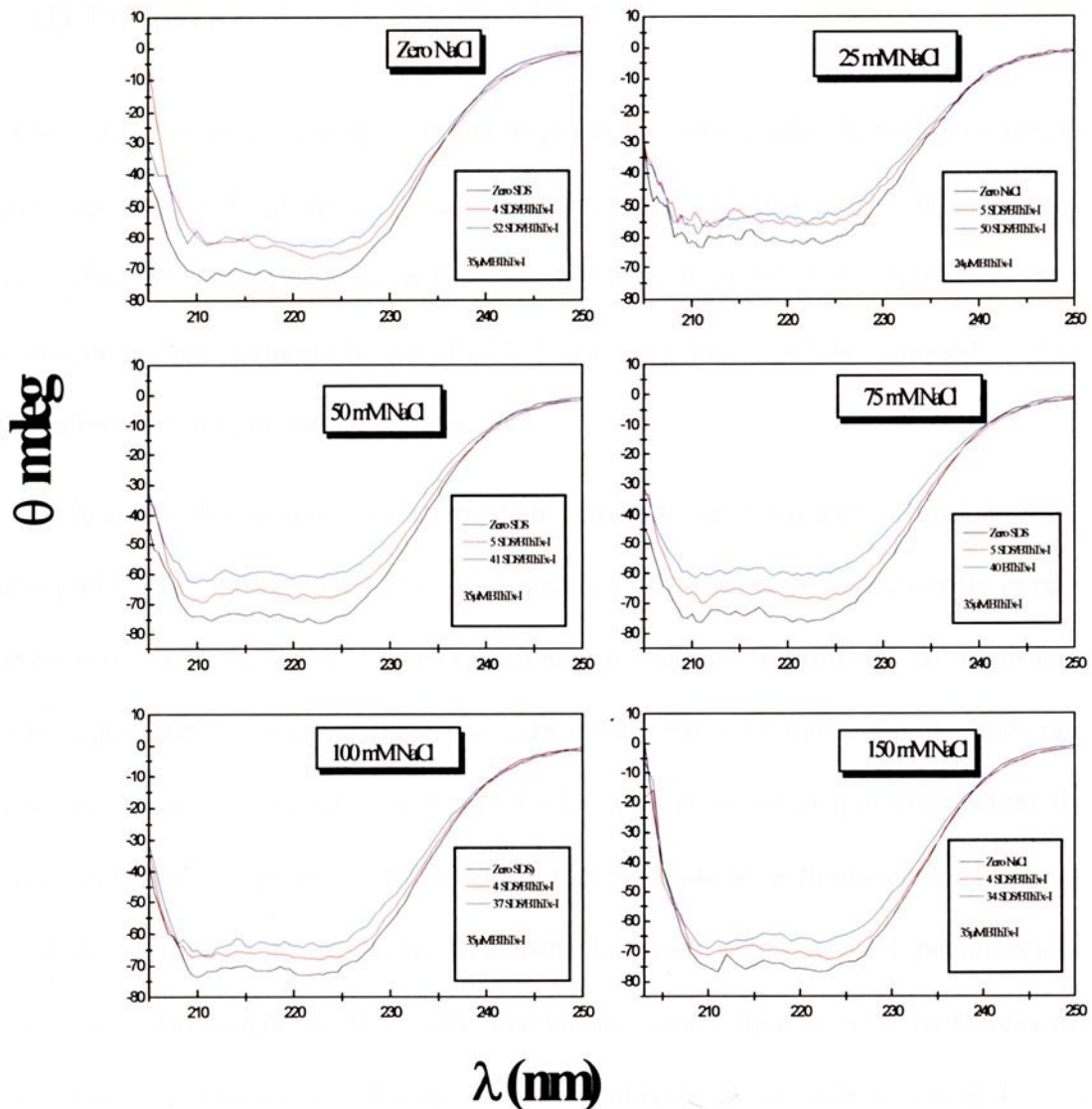


Figura 4.13: Espectros de CD em função da variação do comprimento de onda, para distintos valores da razão molar conforme indicado nas legendas. As medidas foram feitas em solução tampão 25 mM Tris-HCl pH 7,0 para diversas forças iônicas (vide legendas), a temperatura de 25 °C em cubeta de quartzo de caminho óptico de 0,2 cm, no espectropolarímetro Jasco modelo 710 nas seguintes condições: 3 acumulações, velocidade de varredura 20 nm/min; largura da banda de 0,1 nm e tempo de resposta de 1 segundo.

4.1.4. Medidas da intensidade de fluorescência intrínseca do triptofano (IFTI) para o sistema SDS/BthTX-I

Os resultados anteriores sugerem que as primeiras 5 moléculas de SDS não afetam a estrutura secundária da proteína. A técnica de IFTI foi utilizada com a finalidade de verificar o efeito da interação SDS na estrutura terciária da proteína. O triptofano sendo apenas um único por monômero da BthTX-I constitui uma sonda adequada para monitorar alterações no seu microambiente.

A figura 4.14A, apresenta a intensidade integrada de fluorescência intrínseca do triptofano (IFIT) e na figura 4.14B está representada a anisotropia de fluorescência para o comprimento de onda da radiação correspondente ao máximo de emissão do triptofano (350 nm), para valores da razão molar de SDS entre zero e 12 moléculas de SDS por monômero de BthTX-I. A análise da figura 4.14A, permite verificar que para valores da razão molar entre 0-5 moléculas de SDS/BthTX-I a intensidade de fluorescência diminui; e para valores acima de 6 moléculas SDS/BthTX-I, este efeito é mais pronunciado. Admite-se que a diminuição na IFTI esta relacionado com a ligação de 5 moléculas de SDS na interface monomérica afetando o microambiente do triptofano. Os dados de anisotropia de fluorescência representados na figura 4.14B são referentes às mesmas concentrações de SDS que o experimento anterior. Os valores de anisotropia de fluorescência para os valores da razão molar entre 0-5 moléculas de SDS/BthTX-I, os valores aumentam de 0,10 para 0,14 e entre 5-8 moléculas de SDS/BthTX-I, permanece praticamente constante;

Nas figuras 4.14C e 4.14D estão representados os dados de IFTI e anisotropia de fluorescência para valores da razão molar entre zero e 130 moléculas de SDS/BthTX-I.



Verifica-se que para os valores da razão molar ente 0-10 moléculas de SDS/BthTX-I, a intensidade de fluorescência diminui; com concentrações correspondentes a 10-25 moléculas de SDS por monômero de proteína, a intensidade de fluorescência atinge valores 4 vezes menores quando comparado ao sinal da BthTX-I na ausência de SDS. Nesta condição, é detectado o espalhamento adicional de luz. Acima de 25 moléculas de SDS/BthTX-I a intensidade de fluorescência aumenta, até o valor correspondente a 0,75 do valor inicial. Para valores da razão molar acima de 35 moléculas de SDS/BthTX-I o valor da intensidade de fluorescência volta a diminuir. Os resultados da anisotropia de fluorescência estão representados na figura 4.14D para os mesmos valores da razão molar que o experimento anterior. Entre 0-10 moléculas de SDS/BthTX-I ocorre um aumento de 0,10 a 0,18 nos valores de anisotropia de fluorescência; entre 10-20 moléculas de SDS/BthTX-I o valor da anisotropia de fluorescência permanece constante até aproximadamente o valor para a razão molar de 25 SDS/BthTX-I, acima desta razão, os valores da anisotropia de fluorescência diminuem até atingir o valor de 0,15.

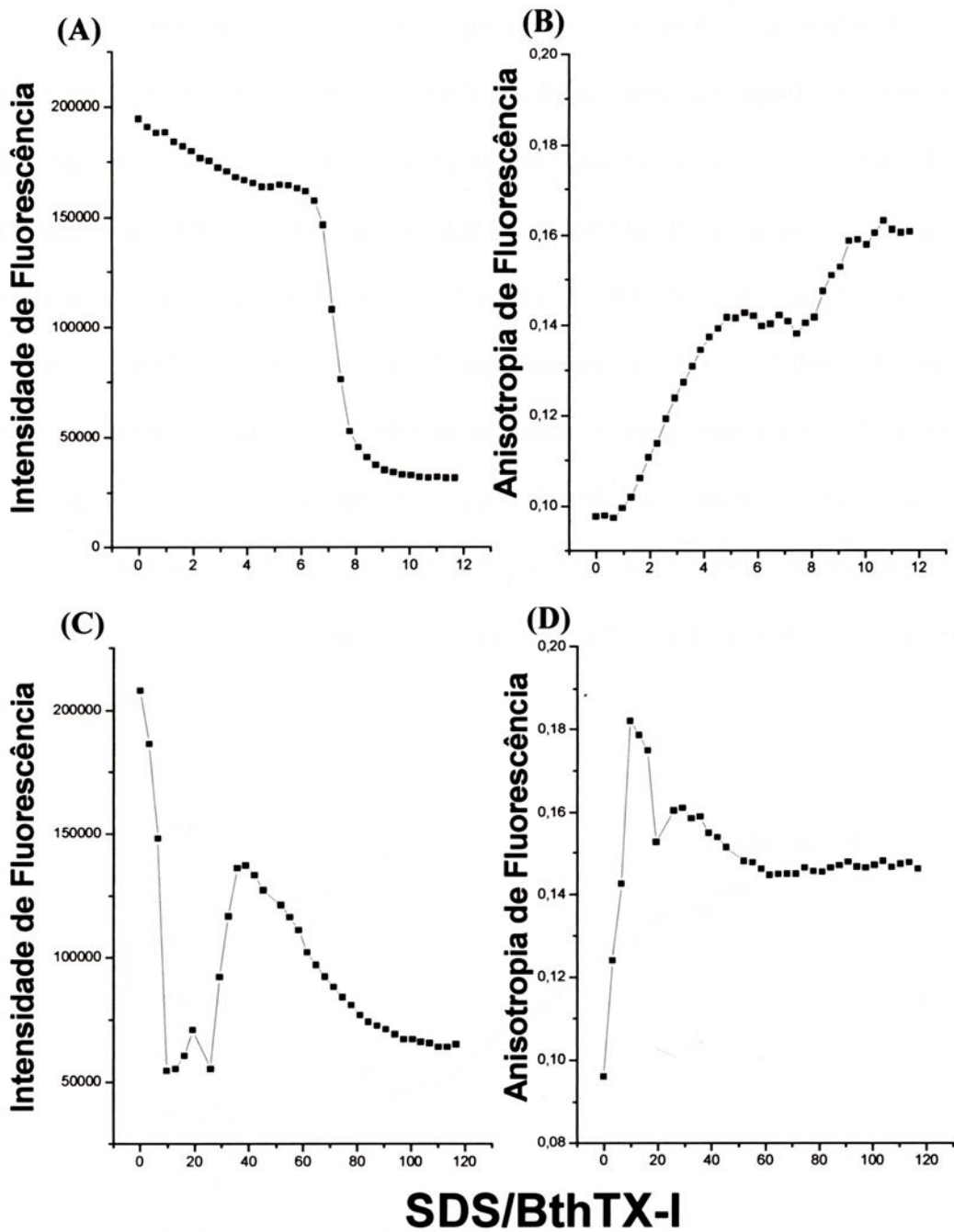


Figura 4.14: Intensidade de emissão de fluorescência em unidades arbitrárias (A e C) e em (B e D) valores da anisotropia de fluorescência para os valores da razão molar SDS/BthTX-I por unidade monomérica de BthTX-I. Os experimentos foram realizados em 25 mM de Tris-HCl pH 7,0, 150 mM NaCl e 37 μ M BthTX-I (22 °C).

A figura 4.15 representa os valores do centroíde para os valores da razão molar para o sistema SDS/BthTX-I. Verifica-se que para os valores da razão molar entre zero e 10 moléculas de SDS por monômero de BthTX-I, há um aumento significativo nos valores do centroíde. Os valores do centroíde permanecem praticamente constante, para valores da razão molar entre 10-25 moléculas de SDS por proteína. Para valores da razão molar próximos de 30 moléculas de SDS por monômero de BthTX-I, há uma diminuição dos valores do centroíde e com a adição de monômeros de SDS, os valores do centroíde voltam a aumentar. O aumento no valor do centroíde corresponde a um deslocamento da emissão de fluorescência do triptofano para frequências maiores ("blue shift"). Para valores da razão molar entre 10-20 moléculas de SDS por proteína, o deslocamento do sinal de fluorescência do triptofano é acompanhada pelo espalhamento adicional de luz visível.

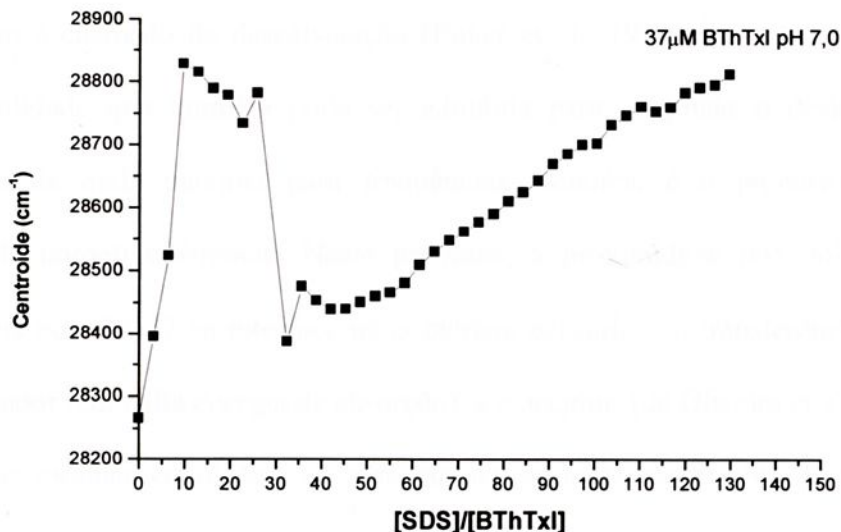


Figura 4.15: Valores do centroíde para valores da razão molar SDS/BthTX-I por unidade monomérica. Os experimentos foram feitos com 37 μ M de BthTX-I em solução tampão 25 mM de Tris-HCl pH 7,0, 150 mM NaCl, (22°C).

Para valores da razão molar entre 25-60 moléculas de SDS por monômero de BthTX-I, os valores da intensidade de fluorescência atingem 70 % da intensidade inicial e para valores da razão molar acima de 60 moléculas de SDS/BthTX-I, o valor do centroíde volta a aumentar. Nestas condições, o aumento nos valores do centroíde não é acompanhado do efeito do espalhamento visível de luz.

O aumento no valor do centroíde para o valor de razão molar de 5 moléculas de SDS por BthTX-I, sugere que a interação inicial das moléculas de SDS, deve estar ocorrendo na interface dos monômeros. O deslocamento do comprimento de onda máximo de emissão do triptofano para frequências maiores, está associado a menor exposição do grupo indol do triptofano ao solvente. O posicionamento do triptofano nesta região, onde a disponibilidade de água é mínima, faz com que a água ali presente seja expulsa, confinando os estados excitados dos elétrons π do triptofano. O confinamento faz com que o comprimento de onda máximo de emissão correspondente ao triptofano, diminua. Este processo é chamado de dessolvatação (Baker et al., 1998; Gelb et al., 1999). Uma outra possibilidade que também pode ser admitida para explicar o deslocamento do comprimento de onda máximo para frequências menores, é o processo de energia ressonante de homotransferência. Neste processo, a proximidade dos dois triptofanos localizados na posição 77 na interface monomérica, permitiria a transferência de energia entre um doador (com alta energia de absorção) e o acceptor (de Oliveira et al., 2001).

Nestas mesmas condições, o aumento do valor da anisotropia de fluorescência sugere que a ligação de 5 monômeros de SDS por monômero de proteína, é o suficiente para afetar o microambiente do triptofano. No intervalo correspondente a aproximadamente 10-25 moléculas de SDS por monômero é possível verificar que tanto a posição do centroíde, como da intensidade de fluorescência permanecem praticamente

constantes. Este resultado deve estar relacionado ao fato das moléculas adicionais de SDS serem adsorvidas nos 2 sítios hidrófobicos, alterando muito pouco o microambiente do triptofano. Neste mesmo intervalo, a solução aquosa composta por proteína e SDS, apresenta o espalhamento adicional da luz que pode ser detectado visualmente na cubeta e sua intensidade aumenta a medida que se aumenta o número de moléculas de SDS por monômero de BthTX-I. Tal espalhamento, ao menos visualmente, desaparece por completo quando o sistema atinge valores de razão molar por volta de 35 moléculas de SDS por monômero de BthTX-I (para a concentração de 150 mM de NaCl). Acima deste valor de razão molar, quando o sistema atinge a cmc, o sinal de IFTI não retorna completamente ao sinal correspondente a BthTX-I na ausência de SDS; e os resultados para a anisotropia de fluorescência e centroíde permanecem com seus valores aumentados. Estas evidências sugerem que existem moléculas de SDS remanescentes ligadas à interface monomérica da proteína. O conjunto de modificações detectadas nos resultados de IFTI, sugerem que a ligação inicial de 5 moléculas de SDS/BthTX-I alteram a estrutura terciária da proteína. Infere-se que esta ligação, favoreça a modificação da estrutura quaternária da proteína. Esta mudança conformacional é permitida, segundo dados cristalográficos. Admite-se uma certa flexibilidade na superfície de contato entre os monômeros devido ao sistema de dobradiça existente nesta fosfolipase. Segundo dos dados cristalográficos a proteína, dependendo das condições de cristalização, pode sofrer mudanças conformacionais para a forma mais aberta ou fechada (da Silva Giotto et al., 1998).

4.2. Medidas para o sistema CHAPS, SDS e BthTX-I

Com a finalidade de investigar como as propriedades de outros surfatantes afetam o comportamento do sistema BthTX-I/surfatante, foram feitos experimentos com o surfatante zwitteriônico CHAPS.

O *3-Cholamidipropyldimetyl-ammonio-1-propane sulfonate* 615 (CHAPS) é um surfatante zwitteriônico derivado do sal biliar com propriedades não desnaturantes, isto é, mantém intacta a estrutura secundária e terciária da proteína. O valor de sua concentração micelar crítica em água é de aproximadamente 6,5 mM e número de agregação próximo de 10, com carga total zero no intervalo pH entre 2 e 12. A figura 4.16 representa a fórmula estrutural do CHAPS (Neugebauer J., 1990).

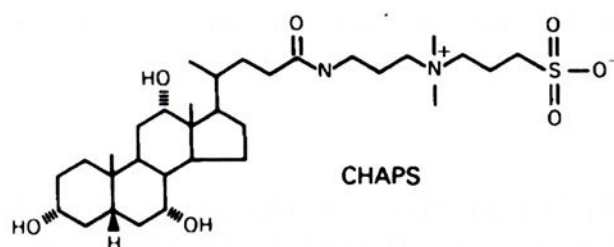


Figura 4.16: Fórmula estrutural do surfatante zwitteriônico CHAPS (Neugebauer J., 1990).

A figura 4.17 representa o resultado da titulação da BthTX-I com CHAPS. No intervalo monitorado, não foi possível detectar mudanças na estrutura secundária da proteína. A proteína nestas condições experimentais, apresenta um excesso de cargas positivas, é de se esperar que a interação eletrostática (blindada) ocorra com anfifílicos negativos. Foi realizado um segundo experimento com a finalidade de verificar a validade da hipótese na qual a interação inicial corresponde a razão molar de 5 moléculas de um

anfílico aniônico por monômero de proteína, seria suficiente para a proteína modificar sua estrutura quaternária.

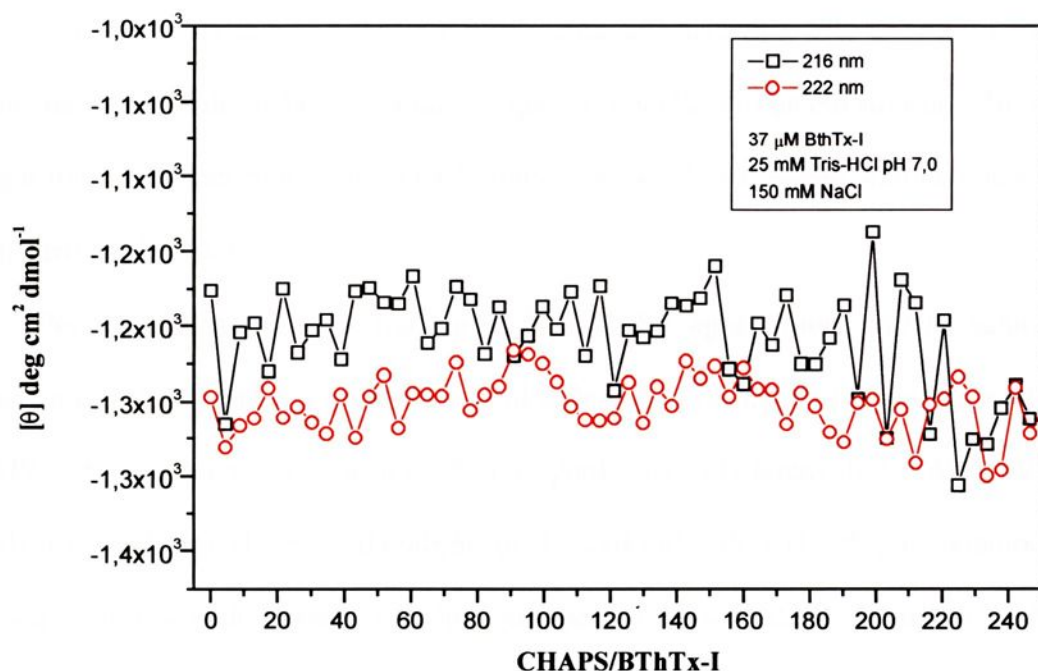


Figura 4.17: Elipiticidade molar da titulação de CHAPS para 37 μM de BthTX-I em solução aquosa com 25 mM Tris-HCl pH 7,0, 150 mM NaCl. Foi feita uma varredura de 203 a 250 nm e o gráfico corresponde apenas ao comprimento de onda da α -hélice (222 nm) e folha- β (216 nm). As medidas foram realizadas a 25 °C em cubeta de quartzo de caminho óptico de 0,2 cm, no espectropolarímetro Jasco modelo 710 nas seguintes condições: 3 acumulações, velocidade de varredura 20 nm/min; largura da banda de 1,0 nm e tempo de resposta de 1segundo.

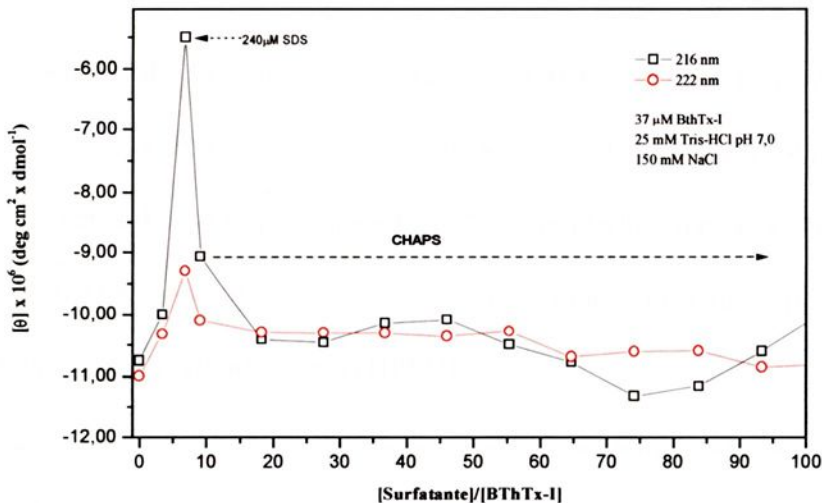
A adição de 240 μl e 700 μl de SDS (correspondente aproximadamente aos valores da razão molar de 7 e 20 moléculas de SDS por monômero de BthTX-I), respectivamente figuras 4.18A e 4.18B, provoca a modificação do sinal de CD para valores mais positivos. Após a adição de CHAPS o sinal de CD é modificado para ambas as concentrações de SDS, retornando praticamente ao valor inicial. Os resultados sugerem que é necessária a ligação de surfatante entre os monômeros da proteína permitindo a coleta dos anfílicos

disponíveis no meio aquoso pelos centros hidrofóbicos. Quando o número de moléculas de surfatantes CHAPS/SDS atinge um número tal que favorece o agrupamento em micelas, os anfífilicos aniônicos e *zwitteriônicos* ligados à proteína são liberados e se agrupam em micelas mistas formadas por CHAPS e SDS. Como as intensidades do CD retornam a dos iniciais na ausência de surfatante, infere-se que as micelas mistas em solução, têm menor energia livre permanecendo poucas moléculas residuais de surfatante aniônico adsorvidas no dímero da BthTX-I.

Pode-se admitir que as moléculas de CHAPS agem como agente aglutinador formando estruturas estáveis com as moléculas de SDS. As micelas mistas formadas por CHAPS e SDS são estáveis e a titulação com moléculas adicionais de CHAPS não mais modifica o sinal de CD depois da adição de 12 moléculas de CHAPS por monômero de proteína. Este resultado permite concluir que mesmo após a adição de mais CHAPS no sistema, não há condição de modificar a estrutura secundária da proteína (vide figura 4.18) ainda que eventualmente estas moléculas de CHAPS se alojem em sua superfície.

Pode-se concluir que a adição de moléculas de CHAPS ao sistema quer na situação caracterizada pelo valor da razão molar de 7 ou 20 moléculas de SDS/BthTX-I (240 μM ou com 700 μM de SDS), leva à formação de micelas mistas estáveis.

(A)



(B)

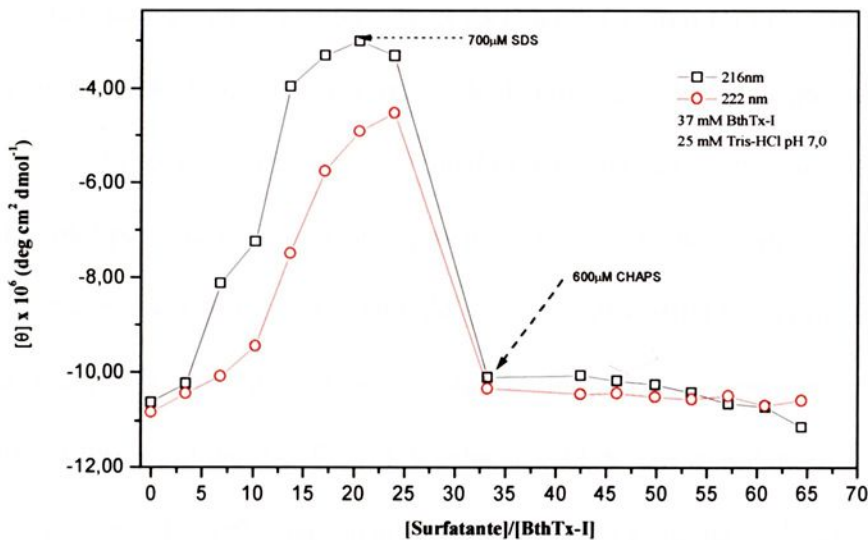


Figura 4.18: Elipiticidade molar em função da titulação de CHAPS para 35 μM de BthTX-I em solução aquosa com 25 mM Tris-HCl pH 7,0, 150 mM NaCl na presença de 7 moléculas de SDS (A) e de 20 moléculas de SDS (B). Foi feita uma varredura de 203 a 250 nm e os gráficos correspondem ao valor de θ nos comprimentos de onda da α -hélice (222 nm) e folha- β (216 nm). As medidas foram realizadas a 25 °C em cubeta de quartzo de caminho óptico de 0,2 cm, no espectropolarímetro Jasco modelo 710 nas seguintes condições: 3 acumulações, velocidade de varredura 20 nm/min; largura da banda de 1,0 nm e tempo de resposta de 1 segundo.

4.3. Medidas do sistema BthTX-I na presença de lipossomos

zwiteriônicos

Os resultados obtidos com o sistema SDS/CHAPS/BthTX-I, sugeriram que a ligação inicial de 5 moléculas de SDS por monômero da proteína, é necessária para a proteína reconhecer substratos zwiteriônicos. Nos resultados apresentados, o anfifílico zwiteriônico CHAPS foi substituído por lipossomos formados por fosfolípido *zwiteriônico* dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC).

A figura 4.19 representa os valores da elipiticidade, em um intervalo, de comprimento de onda, para diferentes concentrações de SDS conforme indicado na figura. A BthTX-I foi pré-incubada com concentrações distintas de SDS. A figura 4.19A apresenta os resultados na ausência de SDS. O espectro inicial e final diferem pouco, indicando que não houve interação detectável da BthTX-I com o DPPC. Na figura 4.19B quando o valor da razão molar no sistema é de 4 moléculas de SDS por monômero de BthTX-I, é possível observar mudanças no sinal de CD que são atribuídas a interação da proteína com os lipossomos compostos por fosfolípidos *zwiteriônicos*. A técnica de CD não permite concluir se o resultado da interação BthTX-I com o lipossomo, danificou a membrana. Na figura 4.19C, estão representados os espectros da BthTX-I para o valor da razão molar de 8,5 moléculas de SDS por monômero de BthTX-I. Verificam-se também alterações na estrutura secundária da proteína atribuídas a interação da BthTX-I com o lipossomo. Na figura 4.19D, para o valor da razão molar de 12 moléculas de SDS por monômero de BthTX-I, os resultados são semelhantes aos anteriores. Os resultados permitiram detectar modificações do sinal de CD somente para as condições nas quais foram adicionadas moléculas de SDS. A interação SDS e lipossomo existe, porém nas condições experimentais, admite-se que quase todo o SDS estaria ligado

à proteína e somente uma pequena quantidade estaria livre ou ligado ao lipossomo. Além disso, o CD monitora apenas moléculas opticamente ativas e tanto o lipossomo como o SDS são moléculas sem atividade óptica.

Estudos envolvendo lipossomos mimetizando membranas na interação das fosfolipases Lys-49 demonstram que as miotoxinas, como a BthTX-I, provocam a ruptura de vesículas unilamelares e multilamelares (Diaz et al., 1991; Ruffini et al., 1992). As membranas carregadas negativamente são atacadas preferencialmente, o que sugere o envolvimento de resíduos básicos na atividade de romper membranas (Diaz et al., 1991). A atividade catalítica das fosfolipases Lys49 em membranas *zwitteriônicas* é praticamente descartada. Tentativas de propor a ação da fosfolipase Lys49 em membranas *zwitteriônicas* sugerida por Maraganore & Heinrikson, (Maraganore & Heinrikson, 1986) foi atribuído a um contaminante com alta afinidade por membranas *zwitteriônicas* como por exemplo, as fosfolipases Asp49.

Os substratos examinados em sistemas artificiais não são capazes de reproduzir a complexidade dos sistemas biológicos presentes nos seres vivos. Assim, podem existir um grande número de co-fatores, peptídeos, íons entre outros substratos naturais capazes de interagir com proteínas e que são essenciais na sua atividade enzimática (Fletcher et al., 1997).

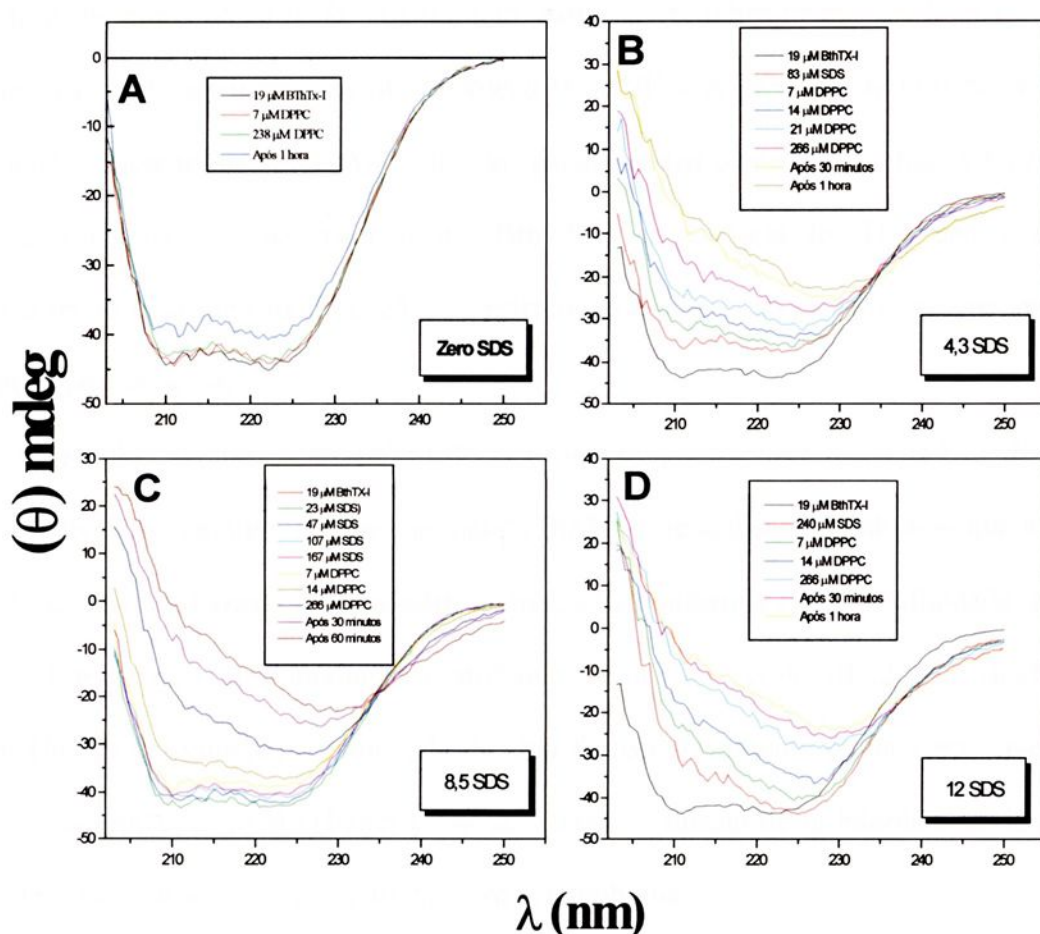


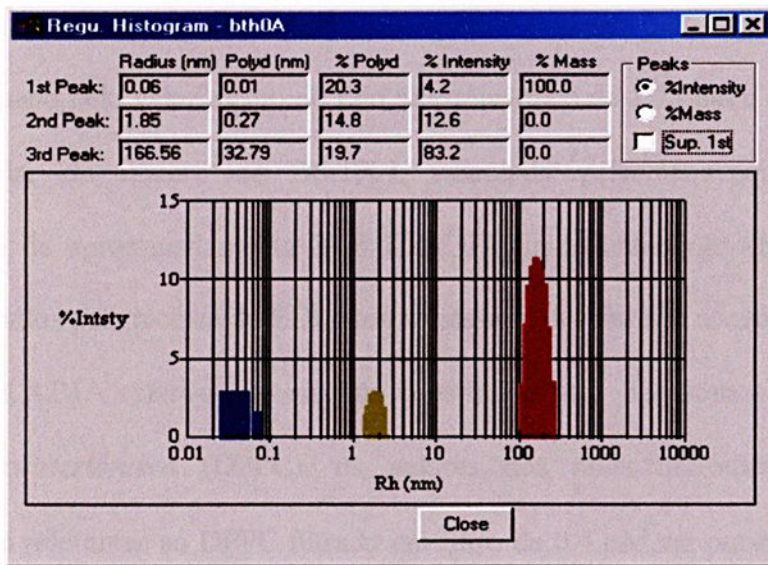
Figura 4.19: Espectros de CD para BthTX-I para diferentes valores de razão molar de SDS por monômero de BthTX-I na presença de concentrações constantes de lipossomos zwitteriônicos : (A) na ausência de SDS; (B) na presença de 83 μM de SDS (4,3 moléculas de SDS por monômero de BthTX-I); (C) na presença de 163 μM SDS (8,5 moléculas de SDS por monômero de BthTX-I) e (D) na presença de 240 μM SDS (12 moléculas de SDS por monômero de BthTX-I). As medidas foram feitas em solução tampão 25 mM Tris-HCl pH 7,0; 150 mM NaCl.

Os resultados apresentados permitem concluir que o valor mínimo da razão molar para que a BthTX-I assuma a forma ativa ou seja, aquela razão de SDS capaz de modificar a estrutura quaternária permitindo assim o reconhecimento de lipossomos *zwitteriônicos*, é de aproximadamente 4 moléculas de SDS. A presença de uma proteína contaminante é descartada pelos resultados dos experimentos controles. A figura 4.19A, representa o resultado do sistema para a BthTX-I na ausência de SDS não sendo possível detectar quaisquer modificações na estrutura secundária da proteína mesmo após a incubação por 24 horas.

O estudo da interação BthTX-I com lipossomos *zwitteriônicos* utilizando a técnica de dicroísmo circular sugere que para a BthTX-I reconhecer membranas que não dispõe de cargas negativas, é necessário a mudança conformacional. A afinidade das PLA2Lys49 por membranas aniônicas é atribuído a um cinturão de 10-12 aminoácidos positivos (lisinas e argininas) denominado de sítio de reconhecimento da interface que é conservado em todas as Lys49 (Pieterse et al., 1974). A função desta interface seria de reconhecer e facilitar a interação da PLA2 com a membrana.

O histograma da figura 4.20 mostra o valor do raio hidrodinâmico para BthTX-I (60 μ M) em solução tampão. Na figura 4.20A o primeiro pico é atribuído a solução tampão cujo raio hidrodinâmico tem valor médio de 0,06 nm. O segundo pico corresponde a população de proteína com raio hidrodinâmico de 1,85 nm e o terceiro pico está sendo atribuído a bolhas de ar. As bolhas estão sempre presentes nos experimentos.

(A)



(B)

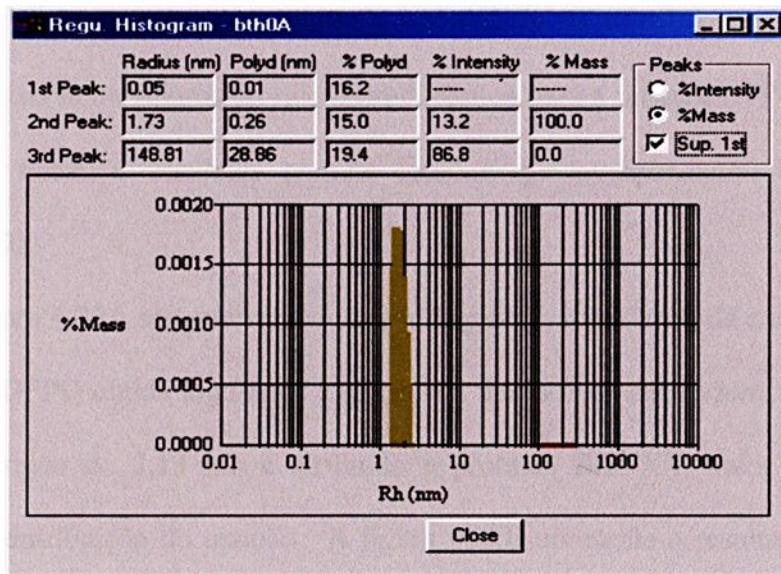


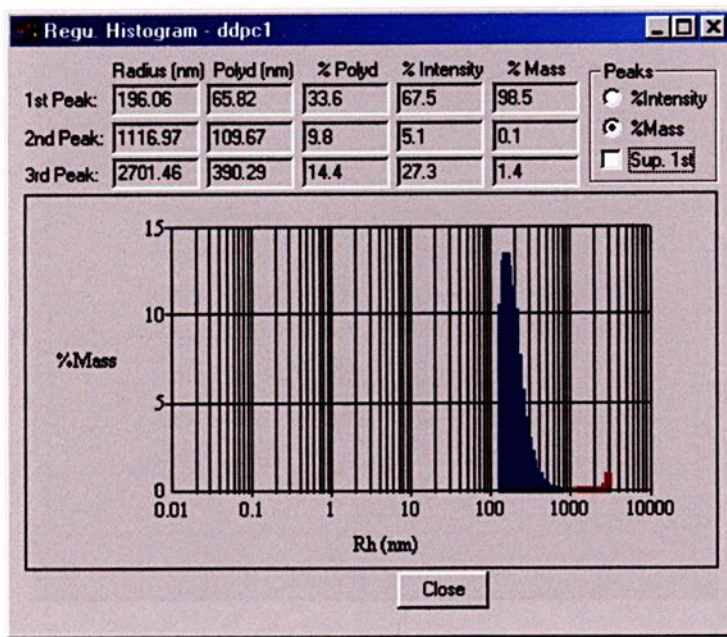
Figura 4.20: Histograma representativos do valor do raio hidrodinâmico (Rh); (A) O primeiro pico representa o raio hidrodinâmico corresponde ao tampão, o segundo pico representa o raio hidrodinâmico da proteína BthTX-I e o terceiro pico corresponde a bolhas de ar. (B) Valor do Rh da BthTX-I (1,73 nm) após a subtração da contribuição do tampão.

A figura 4.20B representa o raio hidrodinâmico para a proteína considerando o resultado após a subtração do tampão (contribuição do primeiro pico suprimida). A massa molecular estimado pelo valor médio do raio hidrodinâmico de 1,73 nm é de 28,3 KDa. A massa molecular do dímero da BthTX-I, calculado pela sequência primária de aminoácidos, é de aproximadamente 27,8 KDa (Honsi-Brandeburgo et al., 1988). Os valores encontrados pela técnica de EDL para a massa molecular são aceitáveis.

A figura 4.21A refere-se ao sistema constituído por lipossomos compostos por fosfolípidos *zwitteriônicos* (DPPC), os valores dos raios hidrodinâmicos médios encontrados são referentes ao DPPC filtrado em filtro de 0,4 μM , na presença de 240 μM de SDS. As medidas foram obtidas logo após a preparação da amostra. O pico do tampão não aparece, está mascarado pela intensidade de espalhamento do DPPC. Na figura 4.21B tem-se os valores do raio hidrodinâmico para a mistura DPPC com 240 μM SDS, após 24 horas. O resultado permite concluir que os lipossomos são estáveis na presença de SDS.

Na figura 4.22A são apresentados os histogramas resultantes da análise do sistema BthTX-I com DPPC obtida logo após a adição de lipossomos *zwitteriônicos*. O valor do raio hidrodinâmico de 2,13 nm é atribuído a proteína BthTX-I, valor obtido após a subtração da contribuição do tampão. A figura 4.22B apresenta o resultado para mesma amostra após 24 horas, o valor do raio hidrodinâmico correspondente a proteína não é mais detectado. Os resultados obtidos mostram que mesmo após um intervalo de tempo de 24 horas, a integridade dos lipossomos foi mantida e que a proteína deve estar provavelmente "ancorada" ao lipossomo.

(A)



(B)

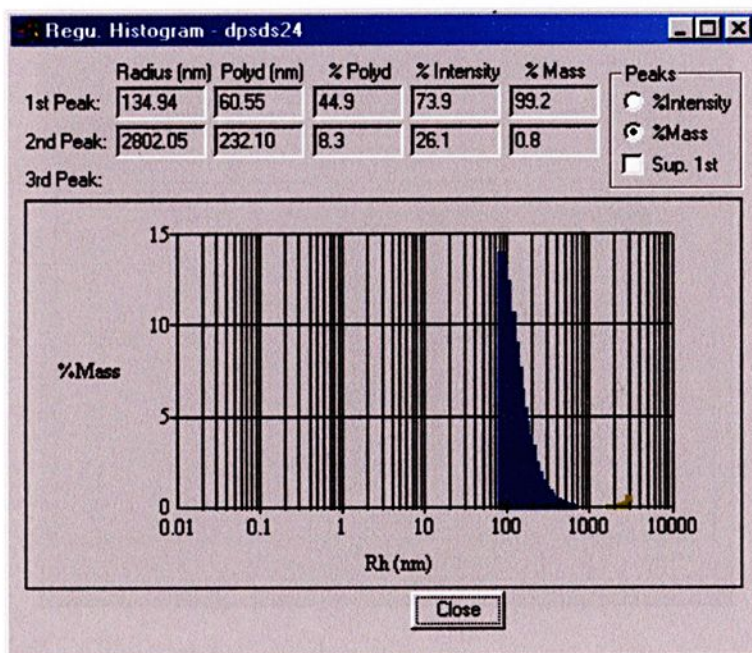
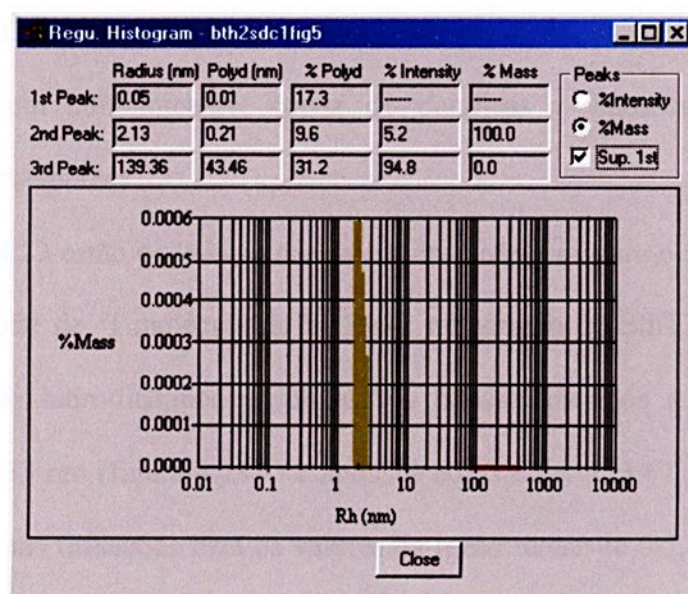


Figura 4.21 : Histogramas representativos dos valores dos raios Hidrodinâmicos para o sistema contendo DPPC : (A) DPPC filtrado com filtro de 0,4 μm em solução tampão com a presença de 240 μM de SDS. As medidas foram obtidas logo após o preparo da amostra; (B) Valor do Raio hidrodinâmico para a mesma amostra após 24 horas do preparo.

(A)



(B)

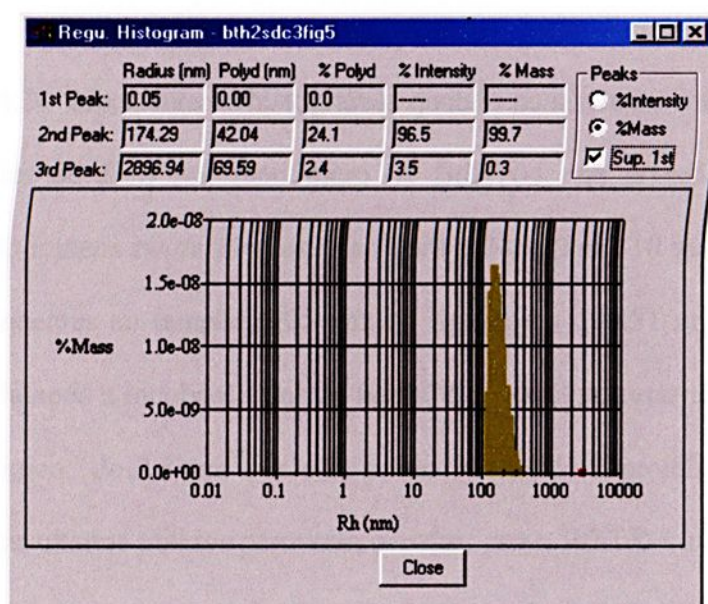


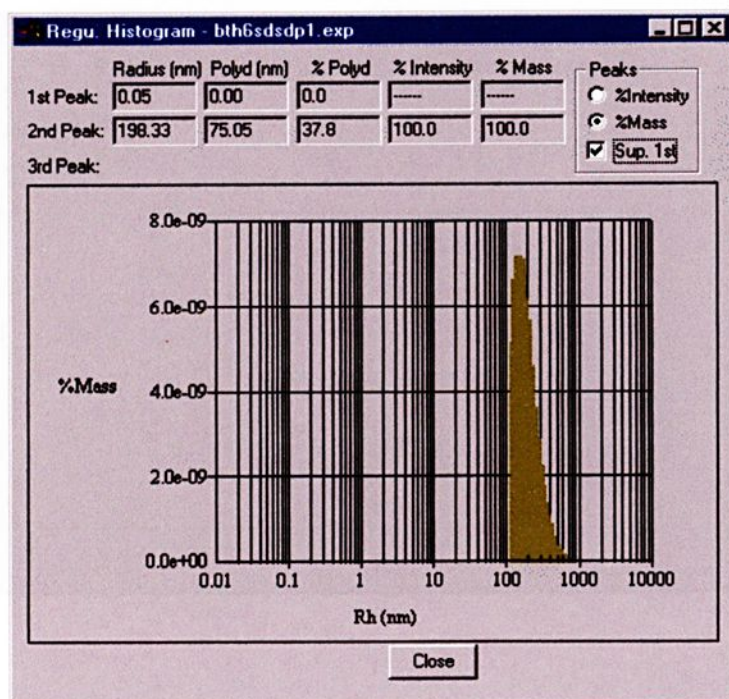
Figura 4.22: Histogramas representativos dos valores dos raios Hidrodinâmicos (Rh) para BthTX-I e DPPC filtrado em filtro de 0,4 μ m em solução tampão: (A) Valores para 60 μ M BthTX-I e DPPC após 10 minutos do preparo da amostra; (B) Resultados para a mesma amostra após incubação por 24 horas.

Tanto com a técnica de CD como EDL, não foi possível detectar a ação danificadora da BthTX-I no DPPC. Estes resultados permitem considerar pouco provável a existência de um contaminante, capaz de danificar o lipossomo composto por fosfolídeos *zwitteriônicos*.

Na figura 4.23 estão os valores dos raio hidrodinâmicos para o sistema contendo o valor da razão molar de 1 molécula de SDS por monômero de BthTX-I na presença de lipossomos. O raio hidrodinâmico atribuído aos lipossomos após a incubação por 10 minutos é de 198,33 nm (figura 4.23A) e após 24 horas é de 223,67 nm (figura 4.23B). Também foram feitas titulações para os valores da razão molar de 0,5 e 1,5 moléculas de SDS por monômero de BthTX-I, e os resultados encontrados não serão apresentados por estarem muito próximos aos resultados obtidos para o experimento apresentado na figura 4.23.

A figura 4.24 representa os histogramas quando no sistema o valor da razão molar é de 4 moléculas de SDS por monômero de BthTX-I na presença de lipossomos composto por fosfolídeos *zwitteriônicos*. Na figura 4.24A, (após 10 minutos), observam-se picos correspondentes ao tampão 0,05 nm, ao lipossomo 196,31 nm e as bolhas. Na figura 4.24B obtida após a incubação por 24 horas, é possível detectar um pico com valor do raio hidrodinâmico de 2,3 nm que está sendo atribuído a proteína e a micela dos fosfolídeos. Os resultados obtidos permitem concluir que a BthTX-I, uma PLA2 Lys-49, exerceu ação danificadora em um lipossomo formado por fosfolídeos *zwitteriônicos*.

(A)



(B)

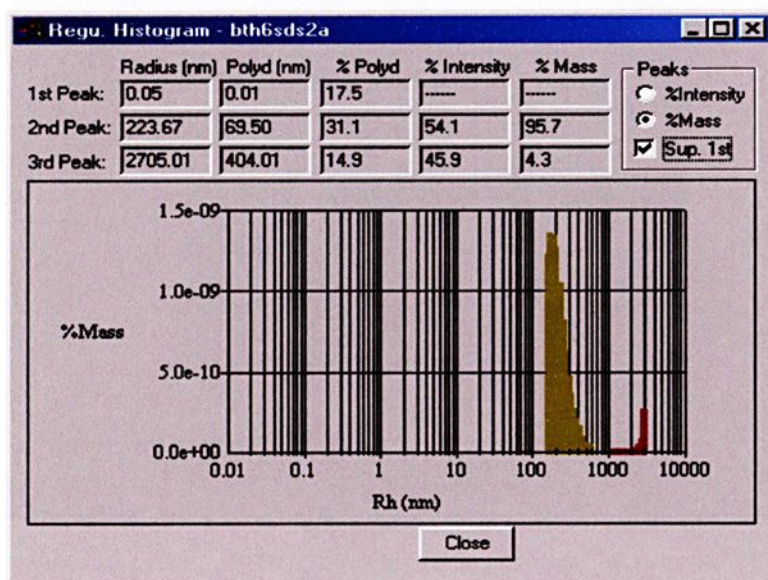
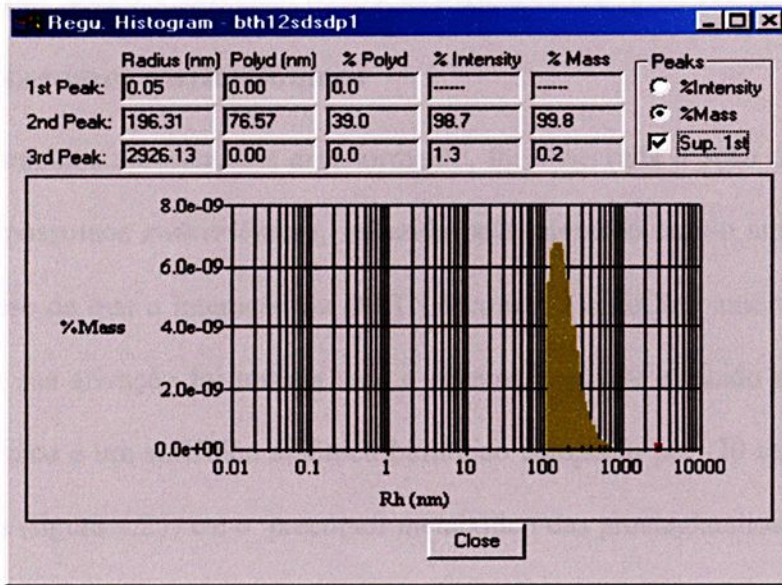


Figura 4.23: Histogramas representativos dos valores dos raios hidrodinâmicos (Rh) para o sistema BthTX-I e SDS para o valor da razão molar de 1 molécula de SDS por monômero de BthTX-I na presença de DPPC filtrado com filtro de 0,4 μm em solução tampão: (A) Valores encontrados para o sistema após a incubação por 10 minutos; (B) resultados obtidos para a mesma amostra incubada por 24 horas.

(A)



(B)

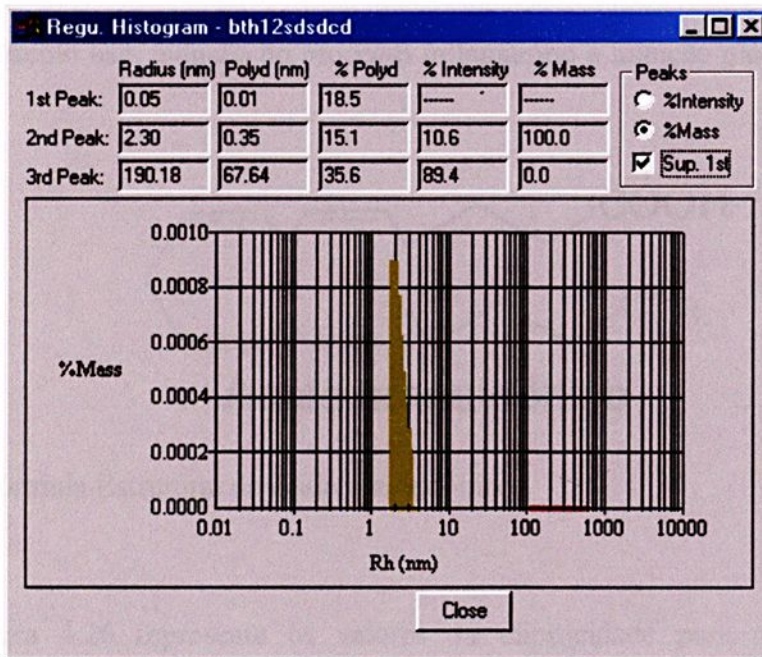


Figura 4.24: Histogramas representativos dos valores do raio hidrodinâmico para 60 μM BthTX-I e 170 μM SDS (valor da razão molar de 4 moléculas de SDS por monômero de BthTX-I) na presença de DPPC filtrado, com filtro de 0,4 μm em solução tampão: (A) Valores de Raio hidrodinâmico para a amostra após 10 minutos; (B) Valores de Raio hidrodinâmico para a mesma amostra após a incubação por 24 horas.

4.4. Medidas para o sistema ácido araquidônico/ BthTX-I na presença de lipossomos zwitteriônicos

Nos resultados apresentados anteriormente, foi observada a ação danificadora da BthTX-I em lipossomos *zwitteriônicos*, induzida pela interação com o anfifílico aniônico SDS. A hipótese de que a interação da BthTX-I com um anfifílico aniônico é suficiente para promover sua ativação foi testada com o sistema BthTX-I e ácido araquidônico. O ácido araquidônico é um anfifílico aniônico biológico composto por 20 carbonos e quatro ligações duplas (figura 4.25) e é o precursor metabólico das prostaglandinas e leucotrienos que são conhecidos como eicosanóides. É grande o interesse nos estudos envolvendo o ácido araquidônico, pois são os mediadores de vários efeitos fisiológicos como o estímulo muscular do músculo liso, indução do processo inflamatório e inibição plaquetária (Kehl et al., 1980).

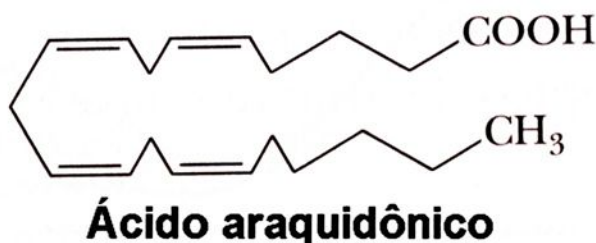


Figura 4.25: Fórmula Estrutural do ácido araquidônico.

A figura 4.26 representa os valores da elipiticidade para a variação do comprimento de onda para diferentes concentrações de ácido araquidônico na presença do lipossomo *zwitteriônico* composto por dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). O espectro da BthTX-I correspondente ao valor da razão molar de 1 molécula de ácido araquidônico por monômero é semelhante ao espectro da BthTX-I para o valor da razão molar de 4 a 6 moléculas de SDS. Quando se compara o sinal de CD para a proteína na ausência de SDS

e para valores da razão molar de 1 molécula de ácido araquidônico, é possível detectar diferenças, sugerindo que a interação de apenas uma molécula deste anfifílico por monômero de BthTX-I é o suficiente para provocar mudanças na estrutura da proteína.

A técnica de CD não permite concluir se ocorreu a decomposição dos lipossomos *zwitterionicos* decorrente da interação BthTX-I/ácido araquidônico. Para verificar a ação danificadora da proteína foi utilizada a técnica de espalhamento de luz.

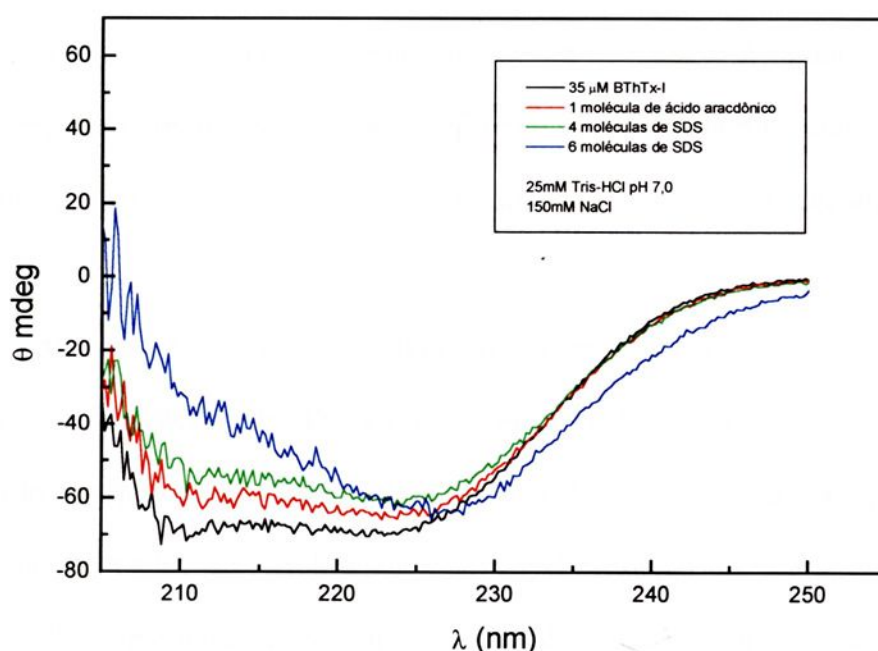


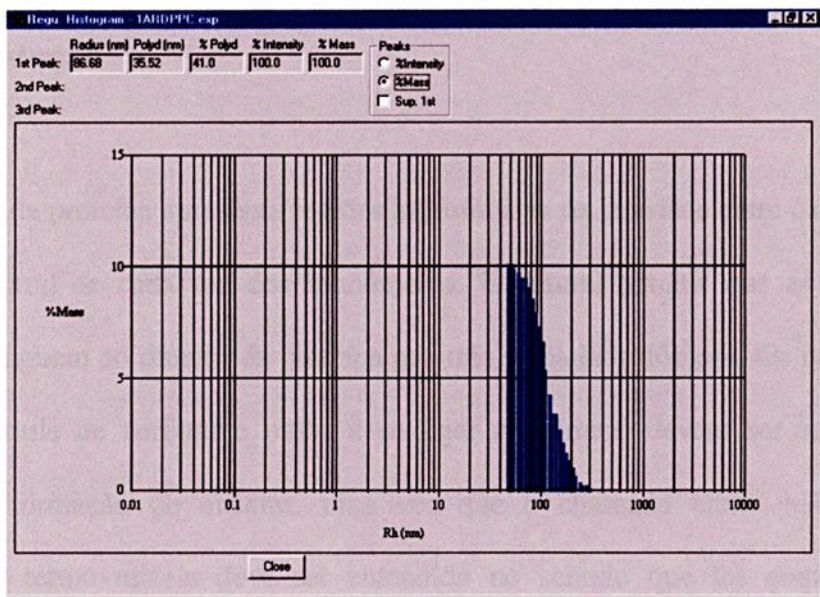
Figura 4.26: Valores da elipicidade para 35 μM BthTX-I em função do comprimento de onda. Condições experimentais: valor da razão molar de 1 molécula de ácido araquidônico, 4 moléculas e 6 moléculas de SDS conforme indicado na figura. As medidas foram feitas em solução tampão 25 mM Tris-HCl pH 7,0; 150 mM NaCl.

Os resultados de EDL apresentados a seguir referem-se aos sistemas: BthTX-I com moléculas de ácido araquidônico; BthTX-I com lipossomos, BthTX-I com ácido araquidônico e lipossomos.

A figura 4.27A representa o resultado obtido para o sistema constituído para o valor da razão molar de 1 molécula de ácido araquidônico, lipossomos compostos por fosfolipídeos zwitteriônicos (DPPC) e 70 μ M de BthTX-I. Na figura 4.27A, está representado o valor do raio hidrodinâmico após 10 minutos da adição do lipossomo. O raio hidrodinâmico correspondente a BthTX-I está ausente. A proteína deve estar ligada ao ácido araquidônico, e provavelmente está ancorada ao lipossomo. A figura 4.27B, obtida após a incubação do sistema por 16 horas, apresenta um pico com raio hidrodinâmico de 2,3 nm atribuído a proteína e a micela dos fosfolipídeos decorrentes da decomposição dos lipossomos.

Os resultados obtidos para os valores da razão molar de 1 molécula de ácido araquidônico ou 4 moléculas de SDS por monômero de BthTX-I, produziram igualmente a decomposição do lipossomos *zwitteriônicos* em micelas. A diferença encontrada para a razão surfatante/proteína está relacionada principalmente ao tamanho da cadeia de carbono: o SDS apresenta 12 carbonos e o ácido araquidônico é composto por 20 carbonos, e também as propriedades inerentes aos anfifílicos como concentração micelar crítica, tamanho da cadeia e grau de hidrofobicidade. Detectou-se em lipossomos formados por fosfolipídeos *zwitteriônico*, a ação danificadora da BthTX-I – uma PLA₂Lys49. O valor da razão molar de 1 molécula do anfifílico ácido araquidônico por monômero da proteína foi suficiente para deixa-la na "forma ativa".

(A)



(B)



Figura 4.27: Histogramas representativos para os valores do raio hidrodinâmico (Rh) para o valor da razão molar de 1 molécula de ácido araquidônico após 10 minutos da adição do DPPC (A) e em (B) a mesma amostra após 16 horas de incubação a 37 °C. As medidas foram feitas em solução tampão 25 mM Tris-HCl pH 7,0; 150 mM NaCl a 25 °C.

4.5. Termodinâmica da micelização e da ligação de surfatante à proteína

4.5.1. Introdução

O dímero da proteína apresenta regiões hidrofóbicas na interface entre os monômeros e na região central de cada um dos monômeros. É natural admitir que as moléculas de surfatante se liguem ao dímero da proteína nos três sítios hidrofóbicos. Os processos pelos quais a molécula de surfatante passa a se ligar ao dímero devem ser semelhantes ao processo da formação de micelas, uma vez que o chamado efeito hidrofóbico está envolvido. O termo micela deve ser entendido no sentido que lhe empresta Tanford (Tanford, 1980), designando qualquer agregado de surfatante solúvel em água. A molécula de surfatante ao compartilhar o agregado ou se localizar no sítio hidrofóbico, libera as moléculas de água que a envolvem quando em solução e deve se arranjar de maneira que a parte polar permaneça em contato com as moléculas do solvente. Mesmo quando o meio não tem características hidrofóbicas como a superfície de um condutor, a tendência para a molécula de surfatante é minimizar a área de contato da cadeia alifática com a água conforme indicam os resultados dos experimentos de adsorção de surfatante em superfícies condutoras. Informações obtidas usando espectroscopia Raman (Villamil et al., 1999), sugerem que a molécula de surfatante "adsorvida", tem sua cadeia alifática em contato com a superfície condutora.

A tendência a micelização (formação de agregados) em temperaturas elevadas (até 166 °C) e em solventes como a hidrazina (N_2H_4) (Hunter, 1992) sugerem que o processo de micelização se deve a variação da entropia que resulta quando as moléculas do solvente

que envolvem a cadeia alifática em uma estrutura ordenada voltam com suas pontes de hidrogênio a situação normal do solvente puro.

A imagem de moléculas do surfatante aniônico conduzidas primeiro para a região entre os dímeros pela interação coulombiana blindada e posteriormente se localizando nos sítios hidrofóbicos na região central dos monômeros será utilizada no modelo para se estimar a energia livre envolvida na ligação de moléculas de surfatante a proteína.

4.5.2. Energia livre do processo de transferência de uma cadeia alifática entre os meios água e hidrocarbonetos

Tanford (Tanford, 1980) apresenta relações para estimar a energia livre por monômero, na transferência de uma cadeia alifática (ligações simples entre os carbonos) do meio aquoso (a), para a fase líquida constituído por hidrocarbonetos (HC). A temperatura em que foram realizados os experimentos é de 25 °C.

$$\mu_{HC}^0 - \mu_a^0 = -2102n_{CH_3} - 884n_{CH_2} \quad (4.1)$$

A relação acima refere-se a cadeia alifática. Para ácidos graxos:

$$\mu_{HC}^0 - \mu_w^0 = 4260 - 825n_c \quad (4.2)$$

Na transferência de álcoois alifáticos para a fase álcool puro

$$\mu_{-OH}^0 - \mu_a^0 = 833 - 821n_c \quad (4.3)$$

Os números nas relações 4.1, 4.2 e 4.3 tem a unidade de cal/mol. As relações apresentados estão baseadas em um grande número de experimentos e tratados pelo

método dos mínimos quadrados, n_c é o número de átomos de carbono na cadeia, n_{CH_2} número de grupos CH_2 e n_{CH_3} número de grupos CH_3 .

As relações apresentadas são derivadas a partir da expressão para o potencial químico do surfatante em um meio aquoso.

$$\mu_a = \mu_a^0 + RT \ln X_a + RT \ln f_a \quad (4.4)$$

e uma relação semelhante para o surfatante em um líquido de hidrocarbonetos.

$$\mu_{HC} = \mu_{HC}^0 + RT \ln X_{HC} + RT \ln f_{HC} \quad (4.5)$$

A contribuição μ^0 leva em conta a interação do surfatante com as moléculas do solvente. O termo $RT \ln f$ descreve a contribuição da interação entre as moléculas de surfatante. Na sequência, considerando os pequenos valores das frações molares do surfatante em solução o termo correspondente a atividade f não será levado em conta.

Nas relações 4.1, 4.2 e 4.3 o primeiro termo é atribuído a interação da água com os terminais da cadeia; é negativo para o grupo CH_3 e positivo quando existe uma cabeça polar. O segundo termo permite inferir que cada grupo CH_2 da cadeia alifática contribui com a parcela de aproximadamente 821 cal/mol, quando passa do meio aquoso para o meio de hidrocarbonetos ou álcool puro. O valor de -821 cal/mol será usado como estimativa do valor da variação da energia livre de Gibbs por monômero na ligação da molécula de SDS a proteína, devendo ser acrescentado a contribuição devida as modificações estruturais na molécula da proteína. Esta última contribuição será avaliada usando os resultados experimentais obtidos com a técnica de Dicroísmo Circular. No procedimento que será utilizado, estão implícitas as hipóteses:

- 1) o carbono próximo a cabeça polar não contribui para a variação da energia livre pois permanece em contato com o solvente aquoso.

2) As regiões hidrofóbicas da proteína são semelhantes ao meio de hidrocarbonetos. O valor de $-821 \times 11 \text{ cal/mol} = -15,3 \text{ RT}$ ($T = 25^\circ\text{C}$), está próximo dos valores apresentados por Hunter (Hunter, 1992) e reproduzidos na última coluna da Tabela II que representam a variação da energia livre por monômero no processo de micelização em um pequeno intervalo de temperatura, próximo a temperatura de 25°C .

O uso das relações 4.4 e 4.5, sem o termo $RT \ln f$, para o meio aquoso e para a proteína permite escrever :

$$\mu_a = \mu_a^0 + RT \ln X_a \quad (4.6)$$

$$\mu_p = \mu_p^0 + RT \ln X_p \quad (4.7)$$

e em um processo de titulação de uma solução contendo proteína, admitindo equilíbrio:

$\mu_a = \mu_p$, resulta

$$\frac{\mu_p^0 - \mu_a^0}{RT} = \ln \left(\frac{X_a}{X_p} \right) = \ln \left(\frac{X_a/X_T}{X_p/X_T} \right) \cong -15 \quad (4.8)$$

X_p e X_a são as frações molares de surfatante na proteína e no meio aquoso, respectivamente e X_T é a fração molar total do surfatante. Usando $X_a/X_T + X_p/X_T = 1$ na relação 4.8, pode-se escrever:

$$\ln \frac{X_a/X_T}{1 - X_a/X_T} \cong -15$$

$$\text{ou } X_a/X_T \cong e^{-15} (1 - X_a/X_T) \text{ e}$$

$$X_a/X_T \cong 3 \times 10^{-7} \ll 1, \text{ ou seja } X_p \cong X_T$$

Tabela II : Concentração Micelar Crítica, número de agregação, grau efetivo de ionização da micela (p/n) e energia livre para formação da micela para o Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) (extraído do Hunter, 1992, pp. 598).

Solvente	CMC (M)	n	p/n	$\frac{\overline{\Delta G^0}}{RT}$
Água	$8,1 \times 10^{-3}$	80 (58)	0,18	-15,8
0,02M NaCl	$3,82 \times 10^{-3}$	94	0,14	-16,0
0,03M NaCl	$3,09 \times 10^{-3}$	100	0,13	-16,2
0,10M NaCl	$1,39 \times 10^{-3}$	112 (91)	0,12	-15,9
0,20M NaCl	$8,3 \times 10^{-4}$	118 (105)	0,14	-15,8
0,40M NaCl	$5,2 \times 10^{-4}$	126 (~129)	0,13	-15,7

Conclui-se que no início da titulação, praticamente todo surfatante acrescentado fica ligado a proteína. Consistentes com a conclusão acima se apresentam os resultados dos experimentos já discutidos e representados pelos gráficos da figura 4.9.

Uma análise mais detalhada dos experimentos, apresentados anteriormente requer o conhecimento da concentração micelar crítica do surfatante SDS. Os valores da concentração micelar crítica do SDS em solução de NaCl para várias concentrações, estão registradas na Tabela III. Os experimentos realizados no presente trabalho foram feitos na presença de NaCl e com solução tampão. Para verificar o efeito da solução tampão nas propriedades (concentração micelar crítica) do surfatante algumas medidas foram realizadas. Na próxima seção é feito uma recapitulação de alguns conceitos, baseada nas referências (Tanford, 1980; Hunter, 1992), e as medidas da concentração micelar crítica serão interpretados usando as relações a serem derivadas a seguir.



4.5.3. Concentração micelar crítica

Moléculas anfipáticas em solução aquosa tem a propriedade de formar aglomerados (micelas) desde que sua concentração seja suficientemente elevada. A concentração em que ocorre a formação de micelas é usualmente bem definida e pode ser identificada pela observação do comportamento de um grande número de propriedades da solução.

As moléculas de SDS que em concentrações abaixo da concentração micelar crítica se ligam a proteína em concentrações mais elevadas podem também formar micelas. A concentração micelar crítica do surfatante SDS para várias concentrações de NaCl e em solução tampão foi determinada usando a técnica de espalhamento de luz e é detectada pela variação do raio hidrodinâmico dos centros de espalhamento.

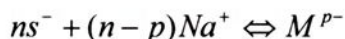
Os valores que podem ser inferidos dos gráficos e histogramas apresentados nas figuras 4.4 a 4.7, estão resumidos na tabela III. Pode-se notar que a presença do tampão pouco afeta o valor da concentração micelar crítica do surfatante.

Tabela III: Valores obtidos pela técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz para várias concentrações de NaCl (primeira coluna), concentração micelar crítica (segunda coluna)

Concentração NaCl (mM)	CMC (mM)
0	7,7
25	3,2
100	1,2
150	0,95

4.5.4. Termodinâmica de micelização

O processo de micelização para um surfatante aniônico como o SDS é representado por :



n representa o número de agregação, s o surfatante, p a carga efetiva da micela e $(n-p)$ o número de cátions "ligados" a micela. Adotando o modelo mais simples em que se considera um único número de agregação, a constante de equilíbrio é obtida por :

$$K = \frac{C_m}{C_s^n C_{Na^+}^{n-p}} \quad (4.9)$$

Para as concentrações molares valem as relações

$$C_T = C_s + nC_m \quad (4.10)$$

$$C_{Na^+} = x + C_s + pC_m \quad (4.11)$$

C_T representa a concentração molar total de surfatante C_m , a concentração molar de micelas com número de agregação n , C_{Na^+} , a concentração molar total de cátions, x a concentração do sal adicionado (NaCl), C_s concentração de surfatante livre.

A concentração micelar crítica é determinada considerando uma propriedade qualquer do sistema e é representada por ϕ . Para ϕ , usando as concentrações de surfatante C_s e de micelas C_m é escrita:

$$\phi = AC_s + BC_m \quad (4.12)$$

A e B não dependem das concentrações C_s e C_m . Analisando o comportamento de ϕ , a concentração micelar crítica (C_0) pode ser identificado usando o critério de Phillips (Hunter, 1992):

$$\left(\frac{d^3 \phi}{dC_T^3} \right)_{C_T=C_0} = 0 \quad (4.13)$$

De acordo com o critério acima a derivada segunda da função ϕ adquire um valor máximo em $C_T = C_0$. Para obter a relação entre a concentração micelar crítica e a concentração de sal, um trabalho algébrico é realizado se levar em conta que nas vizinhanças da concentração micelar crítica a concentração de micelas é pequena comparada com a do surfatante e pode-se tomar:

$$C_{Na^+} \cong x + C_S \quad (4.14)$$

para a relação (4.11), e para a relação (4.9)

$$C_m = KC_S^n (x + C_S)^{n-p} \quad (4.15)$$

que substituídas nas relações (4.10) (para C_T) e 4.15 (para ϕ) resultam em :

$$C_T = C_S + nKC_S^n (x + C_S)^{n-p} \quad (4.16)$$

Para duas situações limites há uma simplificação adicional no trabalho algébrico: quando não há sal adicionado ($x = 0$) e quando a concentração de sal adicionado é muito maior que a concentração de surfatante ($x + C_S \cong x$).

a) concentração micelar crítica na ausência de sal adicionado

Para $x = 0$

$$C_T = C_S + nKC_S^{2n-p} \text{ e}$$

$$\text{e } \frac{d\phi}{dC_T} = \frac{d\phi}{dC_S} \cdot \frac{dC_S}{dC_T} = \frac{A + B(2n-p)KC_S^{2n-p-1}}{1 + n(2n-p)KC_S^{2n-p-1}}$$

$$\text{pois } \frac{d\phi}{dC_S} = A + B(2n-p)KC_S^{2n-p-1}$$

$$\text{e } \frac{dC_S}{dC_T} = \left(\frac{dC_T}{dC_S} \right)^{-1} = \frac{1}{1 + n(2n-p)KC_S^{2n-p-1}}$$

Abreviando $(2n-p)KC_S^{2n-p-1}$ por f .

A derivada primeira é escrita:

$$\frac{d\phi}{dC_T} = \frac{A + Bf}{1 + nf}$$

e a derivada segunda:

$$\frac{d^2\phi}{dC_T^2} = \frac{B - nA}{(1 + nf)^3} \left(\frac{df}{dC_S} \right)$$

$$e \quad \frac{d^3\phi}{dC_T^3} = \frac{B - nA}{(1 + nf)^4} \left[\left(\frac{d^2f}{dC_S^2} \right) - \frac{3n}{1 + nf} \left(\frac{df}{dC_S} \right)^2 \right] = 0 \quad (4.17)$$

que deve ser igual a zero em $C_T = C_0$.

Substituindo $f = (2n - p)KC_S^{2n-p-1}$

$$\frac{df}{dC_S} = (2n - p - 1)(2n - p)KC_S^{2n-p-2}$$

$$e \quad \frac{d^2f}{dC_S^2} = (2n - p - 2)(2n - p - 1)(2n - p)KC_S^{2n-p-3}$$

nos termos entre as chaves em 4.17 encontra-se

$$\frac{1}{K} = \frac{n(2n - p)(4n - 2p - 1)C_0^{2n-p-1}}{2n - p - 2} \quad (4.18)$$

b) concentração micelar crítica no limite em que $x \gg C_S$

Nestas condições

$$C_T = C_S + nKC_S^n x^{n-p} \quad (4.19)$$

$$\phi = AC_S + BnKC_S^n x^{n-p} \quad (4.20)$$

Repetindo os passos:

$$\frac{d\phi}{dC_T} = \frac{A + Bn^2 KC_S^{n-1} x^{n-p}}{1 + n^2 KC_S^{n-1} x^{n-p}} = \frac{A + Bf}{1 + f}$$

$$f = n^2 Kx^{n-p} C_S^{n-1}$$

$$\frac{d^2\phi}{dC_T^2} = \frac{B-A}{(1+f)^3} \frac{df}{dC_S}$$

$$\text{e } \frac{d^3\phi}{dC_T^3} = \frac{B-A}{(1+f)^4} \left[\frac{d^2f}{dC_S^2} - \frac{3}{1+f} \left(\frac{df}{dC_S} \right)^2 \right] = 0 \quad (4.21)$$

e a substituição de f e de suas derivadas apresenta o resultado:

$$\frac{1}{K} = \frac{n^2(2n-1)}{n-2} C_0^{n-1} x^{n-p} \quad (4.22)$$

Uma relação aproximada para a constante de equilíbrio e a concentração micelar crítica, para todo intervalo de concentrações de sal adicionado apresentado por Hunter para $n \gg p \gg 1$ é :

$$\frac{1}{K} = 3n^2 C_0^{n-1} [x + C_0]^{n-p} \quad (4.23)$$

e a variação da energia livre por monômero na formação de micela lembrando que

$$n\Delta G = -RT \ln K$$

$$\frac{\Delta G}{RT} = L(n) + \left(1 - \frac{1}{n}\right) \ln C_0 + \left(1 - \frac{p}{n}\right) \ln(x + C_0)$$

e para $n \gg 1$

$$\frac{\Delta G}{RT} \cong \ln C_0 + \left(1 - \frac{p}{n}\right) \ln(x + C_0) \quad (4.24)$$

já que $L(n)$ tende a zero para valores grandes de n ($L(n) \sim \ln(n)/n$)

ou

$$\ln C_0 = \frac{\Delta G}{RT} - \left(1 - \frac{p}{n}\right) \ln(x + C_0) \quad (4.25)$$

A figura 4.28 construído com os pontos apresentados nas tabelas II e III e usando as frações molares, permite determinar que a energia livre por monômero na formação de micelas é aproximadamente $-15RT$, e o grau de ionização da micelas ($p/n=0,3$) é de 30%.

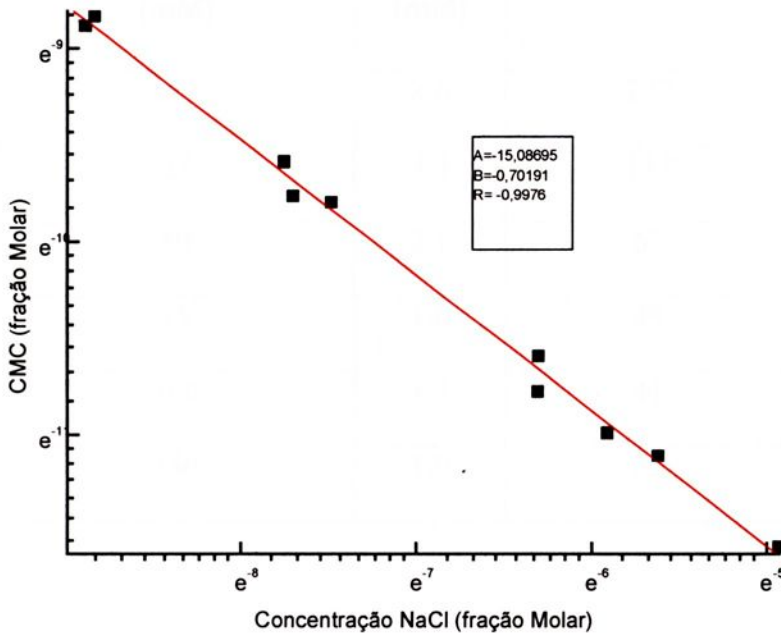


Figura 4.28: Gráfico construído a partir dos dados apresentados nas tabelas II e III.

O uso da relação $\ln cmc = -15,09 - 0,7019 \ln(cmc + x)$ com as concentrações expressas em fração molar, ou de $\ln[cmc] = -8,224 - 0,7019 \ln [cmc+x]$ para concentrações expressas em mol/litro a tabela IV é construída. Na terceira coluna estão os valores da razão molar em que a cmc seria atingida se todo SDS permanecesse livre e não ligados a proteína.

Tabela IV: Valores da concentração micelar crítica e razão molar SDS/monômero de proteína para as forças iônicas (concentração de NaCl) indicadas na primeira coluna. A concentração de proteína utilizada para construir a terceira coluna foi de 35µM para todas as forças iônicas, exceto para 25 mM NaCl onde foi utilizado 24 µM de BthTX-I.

Concentração NaCl (mM)	CMC (mM)	SDS/Monômero
0	8,0	227
25	3,3	137
50	2,1	63
75	1,6	49
100	1,3	41
150	1,0	33

**4.5.5. Estimativa da energia livre envolvida nas transformações
conformacionais da proteína**

Os resultados dos experimentos usando a técnica de dicroísmo circular mostram que a proteína volta a configuração semelhante a configuração em que há 5 moléculas de surfatante ligados para relações de concentração SDS/BthTX-I bem abaixo do valor que corresponde a concentração micelar crítica quando não há sal adicionado e quando a concentração de sal adicionado é 25 mM. Para os outros valores de força iônica a relação SDS/BthTX-I está próxima do valor correspondente a concentração micelar crítica,

conforme a tabela IV. Para estas últimas situações os gráficos dos experimentos mostram um comportamento linear do sinal de dicroísmo circular em relação ao valor de $[SDS]/[BthTX-I]$ para valores da relação superiores ao valor correspondente a concentração micelar crítica, estas circunstâncias permitem estimar o valor da variação da energia livre por monômero que se liga a proteína nos sítios hidrofóbicos.

A estimativa da energia livre é feita admitindo o equilíbrio e levando em conta que a concentração de monômeros livres em solução é igual a concentração micelar crítica.

O potencial químico é escrito

$$\mu_a = \mu_a^0 + RT \ln X_a$$

$$\mu_p = \mu_p^0 + RT \ln X_p$$

$$\mu_m = \mu_m^0 + RT \ln X_m$$

Os índices *a*, *p*, *m* representam os meios água, proteína e micela. X_i representa a fração molar correspondente ao meio *i*.

No equilíbrio os três valores acima são iguais e pode-se escrever

$$\mu_p^0 + RT \ln X_p = \mu_m^0 + RT \ln X_m$$

e o valor da variação da energia livre padrão por monômero na transferência do monômero da micela para a proteína

$$\mu_m^0 - \mu_p^0 = RT \ln \left(\frac{X_p}{X_m} \right) = RT \ln \left(\frac{\Delta X_p}{\Delta X_m} \right)$$

ΔX_p representa a fração molar que se liga a proteína, ΔX_m a fração molar de surfatante que forma micela. Na situação de equilíbrio $\Delta X_p + \Delta X_m$ é igual a quantidade de SDS acrescentado no processo de titulação, uma vez que a concentração de monômeros em solução aquosa é constante é igual a concentração micelar crítica.

A partir dos valores apresentados na tabela IV e voltando a figura 4.12, os experimentos nos quais se pode observar a competição entre a proteína e a micela para a ligação do SDS são os com força iônica superior a 50 mM de NaCl. Do conjunto de gráficos da figura 4.12 são lidos os valores das constantes da tabela V, com a última coluna apresentando o valor da variação da energia livre. O gráfico 4.29 apresenta um exemplo de como foi construída a tabela V. Considerando os valores apresentados na tabela IV para os valores da cmc, foi feita uma extrapolação deste valor, para os valores iniciais da titulação de SDS. Subtraindo o valor final do inicial da razão molar SDS/BthTX-I, tem-se uma estimativa da número de moléculas de SDS que permaneceram ligadas à proteína.

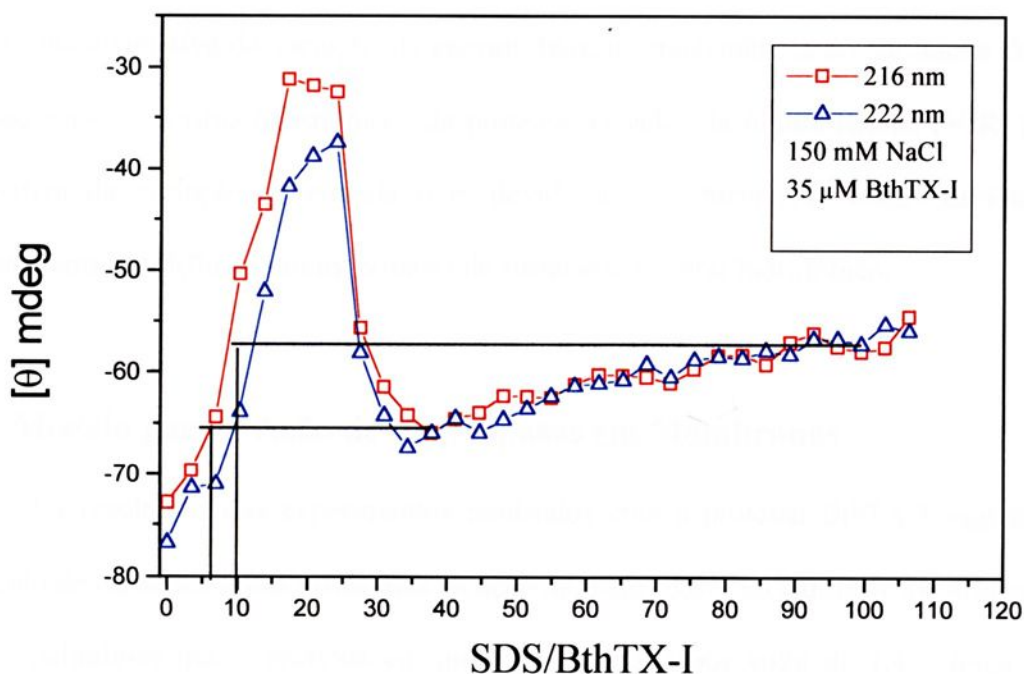


Figura 4.29: Espectro de CD em função da razão molar SDS/BthTX-I para 150 mM de NaCl, exemplificando a construção da tabela V.

Tabela V : Valores para a fração molar total de SDS ΔX_T (segunda coluna); fração molar que se liga a proteína ΔX_p (terceira coluna); ΔX_m fração de SDS que se liga a micela e a variação da energia livre de Gibbs na última coluna para as várias forças iônicas indicadas na primeira coluna.

Concentração NaCl (mM)	ΔX_T proporcional a	ΔX_p proporcional a	$\frac{\Delta X_p}{\Delta X_m}$	$\frac{\Delta G^0}{RT}$
50	27,65	1,58	$6,02 \times 10^{-2}$	-2,8
75	50,01	2,04	$4,25 \times 10^{-2}$	-3,2
100	55,80	2,08	$5,35 \times 10^{-2}$	-2,9
150	64,92	3,64	$5,94 \times 10^{-2}$	-2,8

Observando os resultados, pode-se considerar o valor de $-12RT = [-15 - (-3)] RT$ como uma estimativa da variação da energia livre na transferência do surfatante do meio aquoso para os centros hidrofóbicos da proteína. O valor da última coluna ($\sim 3RT$) é um estimativa da variação da energia livre devido as transformações conformacionais da proteína com a adição de um monômero de surfatante no sítio hidrofóbico.

4.6. Modelo para a Ação de Fosfolipases em Membranas

Os resultados dos experimentos realizados com a proteína BthTX-I sugerem um conjunto de transformações estruturais na ação de fosfolipases ao danificar membranas.

Admite-se que a proteína em um meio com pH por volta de 7,4 e força iônica correspondente à do fluido fisiológico extracelular se apresenta na forma dimérica com a configuração aberta e semelhante a configuração determinada por espalhamento de raio-X (da Silva Giotto et al., 1998). Quanto aos resíduos ácidos: ácido aspartico, ácido glutâmico e os básicos: lisina e arginina estão dissociados (ponto isoelétrico da proteína 9,3). O



surfatante encontrado no meio fisiológico, o ácido araquidônico (Kehl and Egan, 1980), apresenta um total de vinte átomos de carbono e pode se apresentar na configuração aberta ou dobrada. Devido a interação hidrofóbica a molécula de ácido araquidônico deve se alojar, na proporção de uma molécula de ácido por monômero, na interface entre os monômeros da proteína. A estimativa da variação de energia livre para o processo corresponde a 15,6 kcal por mol de ácido araquidônico, (usando o valor de 821 cal por mol de átomos de carbono).

A diferença de energia livre confere estabilidade ao dímero na "forma ativa". Os experimentos usando a técnica de dicroísmo circular mostram que com a presença da molécula de ácido araquidônico a estrutura secundária da proteína é pouco afetada. Consequência da inserção da molécula de ácido araquidônico entre os monômeros da proteína é acrescentar aos quatro pares de resíduos positivo-negativo, preexistentes na borda da face ventral do dímero da proteína mais dois pares formados pelos resíduos positivos de lisinas preexistentes na face ventral da proteína e pela cabeça polar negativa do ácido araquidônico. O excesso de resíduos de aminoácidos positivos na borda da face ventral do dímero: 12 no total, 6 por monômero deve manifestar-se via interação coulombiana blindada a distâncias da ordem de 10 Å da membrana. A distância é estimada pela relação para o comprimento de Debye (λ) $\lambda = \frac{3,04}{c^{1/2}}$, c representa a concentração

molar de um eletrólito aquoso com íons monovalentes, temperatura de 25 °C e admitindo para a constante dielétrica da água 78,5. O valor de 8 Å resulta da substituição para a concentração de $c \sim 0,15$ M, que corresponderia aproximadamente a força iônica do meio fisiológico.

A interação coulombiana blindada entre as cargas positivas e negativas da molécula de fosfolípido (difosfatidilcolina) e entre as lisinas e argininas da face ventral e na borda do dímero da proteína e os pares positivos e negativos sugerem a imagem putativa do dímero da proteína com a face ventral voltada para a membrana, e os resíduos negativos se aproximando dos grupos positivos das colinas da membrana, as lisinas levemente afastadas com os resíduos voltados para o interior do dímero onde se encontram ânions que serão aprisionados entre membrana e proteína; os grupos negativos da proteína se fixam em grupos positivos da colina e as lisinas terminam por alcançar os grupos fosfatos da colina. Os laços formados pelos aminoácidos entre as cisteínas que formam as pontes dissulfetos aderem a membrana auxiliados pelos aminoácidos hidrofóbicos existentes com os aminoácidos mais simples (alanina, glicina) contribuindo para uma maior flexibilidade do laço. Moléculas de água e íons hidratados confinados entre a superfície da membrana e o dímero da proteína escapam por uma abertura. Esta abertura pode ser um canal ou sulco constituído, na BthTX-I, pelos resíduos hidrofílicos S21, Y25, D39, T41, D42, T112, Y113, K116, Y117, Y119. Usando o modelo cristalográfico para a proteína constata-se que os resíduos acima envolvem uma abertura quase circular com diâmetro de 6 Å (centro de átomo a centro de átomo) unindo o interior do dímero a superfície externa. O maior número de resíduos com carga positiva localizada na borda da face ventral da proteína imerso em um meio cuja constante dielétrica é uma ordem de grandeza inferior ao do meio do eletrólito, faz com que as cargas positivas na borda ventral da proteína se afastem devido a repulsão eletrostática. Ao dímero é conferida uma configuração mais estendida e os fosfolípidos da membrana são arrastados pela borda e coletados pelo dímero da proteína. Como consequência a membrana é danificada localmente pelo desarranjo de dezenas de fosfolípidos que constituem a camada externa da bicamada que constitui a



membrana. O rearranjo dos fosfolípidos no dímero conduz a inversões da seus dipolos acarretando uma repulsão eletrostática devido aos dipolos dos fosfolípidos remanescentes na membrana e com a pressão das cadeias alifáticas, há o afastamento do dímero da proteína com a micela de fosfolípidos em seu interior. A constante dielétrica no meio afastado da membrana é maior e as interações entre as cargas são blindadas atenuando a repulsão entre as cargas do dímero resultando na liberação da micela de fosfolípido deixando o dímero da proteína em condições para atuar em outro segmento de membrana. Uma estimativa para o valor das variações da energia livre do dímero envolvida no processo ao adquirir uma conformação estendida, obtida das análises prévias é de 150kT. O valor não depende da força iônica do meio. A variação da energia potencial eletrostática envolvida no processo de coleta de fosfolípidos da membrana é estimada a seguir .

A separação inicial entre cargas de mesmo sinal é designada por r_i , e na forma estendida, por r_f , e a variação da energia eletrostática por par de cargas é dada por :

$$\frac{\Delta E_{el}}{kT} = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0\kappa} \frac{(r_f - r_i)}{r_i r_f} \frac{1}{kT} \quad (4.26)$$

$$\frac{E}{kT} = \frac{538}{\kappa} \frac{\Delta r}{r_i r_f} \quad (4.27)$$

κ é a constante dielétrica do meio onde residem as cargas.

A primeira coluna da tabela VI especifica os resíduos da borda da superfície ventral da proteína que contribuem no processo em consideração. A segunda coluna apresenta valores para a separação inicial entre os resíduos obtidos do modelo cristalográfico. Na terceira coluna o valor estimado para a distância entre as cargas na forma mais estendida. Este último valor é estimado considerando que para alojar 25 moléculas de SDS (experimentos de CD, fluorescência) cada um exigindo uma área de $\sim 40 \text{ \AA}^2$, para 25, são necessários 1000 $\text{\AA}^2$ adicionais.

Estimando a área inicial por πr_i^2

$$\pi(r_f + r_i)(r_f - r_i) = 1000 \quad (4.28)$$

Obtém-se $r_f = r_i + 8 = 23$ ($r_i = 15\text{\AA}$), para resíduos diametralmente opostos no monômero. A análise da estrutura cristalográfica da proteína e a verificação das posições das pontes dissulfetos (resíduos em laços distintos) constituem a base para as avaliações. A quarta coluna apresenta os valores para $\Delta r / r_f r_i$ em $\text{\AA}^{-1}$. O parâmetro fator leva em conta o número de resíduos em cada grupo e sua frequência no dímero. A parte superior da tabela VI refere-se a grupos em um mesmo monômero e a parte inferior refere-se a grupos em monômeros distintos. A última coluna da tabela fornece o valor de $\kappa E/kT$ de cada grupo. A variação da energia potencial eletrostática corresponde a 192 kT para um meio com constante dielétrica 2 (parafina) e 96 kT para o meio com constante dielétrica 4 (celulose). Que fique claro que as considerações feitas são argumentos de plausibilidade e não uma demonstração. A conclusão que se obtém é que para danificar membranas são necessários resíduos carregados em excesso e pares justapostos de aminoácidos positivos e negativos além de aminoácidos com propriedades hidrofóbicos para uma eficiente ancoragem na membrana. O que se espera de fosfolipases com ação de danificar membranas é que apresente resíduos com características que permitam funções específicas. Uma série de fosfolipases, homólogas a BthTX-I é apresentada e pode-se notar que além dos aminoácidos H48, Y52, D99 responsáveis pela ação hidrolítica (função enzimática) e das pontes dissulfetos, em número de 7 por monômero, muitos apresentam aminoácidos que conferem a proteína ação em membranas e que são conservados.

Da estrutura cristalográfica da BthTX-I, verifica-se que formam um canal ou sulco hidrofílico com propriedades hidrofílicas (polares ou dissociáveis) os aminoácidos S21, Y25, D39, T41, D42, T112, Y113, Y117, Y119.

A região do monômero, superfície de contato entre as moléculas na formação do dímero é constituído pelos aminoácidos hidrofóbicos W77, L10, M8, I82. Os aminoácidos que, em parte, são responsáveis pela ligação entre os monômeros, com característica de dobradiça e formando pontes salinas são os aminoácidos ácidos E12, D71 e os básicos K80, R107. Os aminoácidos polares T13, T81 também partilham o espaço da região entre os dímeros.

Os resíduos K7, K16, K20 situam-se na região da interface na face ventral do dímero (vista da membrana). Outros resíduos positivos, que de acordo com o modelo, estão envolvidos na ação miotóxica são os resíduos K70, K115, K116, R118. Estes resíduos estão localizados na borda da superfície ventral da proteína, como se depreende da análise da estrutura do dímero obtido por ensaios cristalográficos.

Tabela VI: Estimativa da variação da energia eletrostática envolvida na ação de danificar a membrana pela BthTX-I

Grupos	r_i (Å)	r_f (Å)	$\frac{r_f - r_i}{r_i r_f}$	fator	$\kappa \frac{Energia}{kT}$
K20,K69	30	46	$1,16 \times 10^{-2}$	2	13
K20,K123	15	23	$2,32 \times 10^{-2}$	2	25
K70, K115, K116, R118	30	46	$1,16 \times 10^{-2}$	6	37
K20, K115 K116,R118	10	20	5×10^{-2}	6	161
K70,K123	10	15	$3,3 \times 10^{-2}$	2	36



K70,K123, K70, K123	60	92	$5,8 \times 10^{-3}$	4	12
K70,K123, K115, K116,R118	50	60	$3,3 \times 10^{-3}$	6	21
K20, K115, K116,R118	30	46	$1,16 \times 10^{-2}$	6	37
K115 K116,R118 K115 K116, R118	35	51	$9,0 \times 10^{-3}$	9	43

Vinte sequências primárias de proteínas, componentes do veneno de serpentes, apresentadas na tabela VII apresentam 14 cisteínas com características comum. Os pares de cisteínas que formam as pontes dissulfetos são a primeira cisteína da sequência com a décima terceira, a segunda com a quarta; a terceira com a antepenúltima, a quinta com a última, a sexta com a décima primeira, a sétima com a nona; a oitava com a décima. Em todas as sequências apresentadas o número de aminoácidos entre as pontes dissulfetos é portanto praticamente o mesmo.

Os aminoácidos do sítio ativo são todos conservados. Os aminoácidos Y25, D39, T41, D42, T112, Y113, Y117, que formam o canal ou sulco hidrofóbico são conservados com a exceção do primeiro (S21 e o último Y119). Na região de interface são conservados os aminoácidos hidrofóbicos (M8, W77, I82) e o positivo K16.



As duas últimas proteínas apresentam igual número de resíduos positivos e negativos e portanto, conforme o modelo, não devem apresentar danos a membrana *zwitteriônicos* em pH neutro.

As outras sequências apresentam os aminoácidos K70, K115, K116 (da sequência da BthTX-I) com um certo grau de conservação. São conservados nas que apresentam maior número de aminoácidos positivos que negativos (de 7 a 12).



Tabela VII: Alinhamento das sequências primárias das fosfolipases.

sp P00593 PA21_BOVIN	MRLVLAAALLTVGAGQAGLNSRALWQFNGMIKCKIPSSSEPLLDNFNYGTCYGLGGSGTPV
sp P49121 PA2H_AKGCL	MRTLWIVALLLVGV-----EGSLLELGKMILOET-GKNAITSYSGSYGCNCGWGHRGQPK
tr Q92152	MRTLWIVAVLLVGV-----EGSLIQLGEMIFQEM-GKGAACKYGLYGCNCGMGRRGRPQ
tr Q9PVE3	MRTLWIMAVLLVGV-----EGSLVELGKMILOET-GKNPVTSYGAYGCNCGVLRGKPK
tr Q42187	-----SLLQFRKMIKKMT-GKEPVVSYAFYGCYCGSGGRGKPK
tr Q42188	-----NLIQFRKMIKKMT-GKEPVVSYAFYGCYCGSGGRGKPK
sp P04361 PA2H_AGKPI	-----SVLELGKMILOET-GKNAITSYSGSYGCNCGWGHRGQPK
sp P04417 PA21_AGKHA	-----HLLQFRKMIKKMT-GKEPVISYAFYGCYCGSGGRGKPK
sp P20381 PA2B_TRIFL	MRTLWIMAVLLLV-----DGSLLVQLWKMILOET-GKEAAKNYGLYGCNCGVLRGKPK
tr Q92118	MRTLWIMAVLLVGV-----EGGLWQFENMIKVV-KKSILSYSAFYGCYCGWGRGKPK
sp P22640 PA2B_TRIMU	-----SLIELGKMILOET-GKNPVKNYGLYLCNCGVNRGKPV
sp P06859 PA21_TRIFL	MRTLWIMAVLLVGV-----DGGLWQFENMIKVV-KKSILSYSAFYGCYCGWGRGKPK
sp P81165 PA22_CERGO	-----SHYQLWKMILOET-GKNAVPSYGLYGCNCGVSRGKPK
tr P82950	-----NLVQLWKMILOET-GKNAAPSFGYGCNCGVSRGKPK
tr P82287	-----SLFELGKMILOET-GKNPAKSYGAYGCNCGVLRGKPK
sp P24605 PA22_BOTAS	-----SLFELGKMILOET-GKNPAKSYGAYGCNCGVLRGKPK
tr P82114	-----SLVELGKMILOET-GKNPAKSYGAYGCNCGVLRGKPK
tr Q90249	-----SLFELGKMILOET-GKNPAKSYGAYGCNCGVLRGKPK
tr Q9IAT9	-----FELGKMILOET-GKNPAKSYGAYGCNCGVLRGQPK
tr Q9I834	-----KNPVKSYGVYGCNCGVGRGKPK
	* * * * *
sp P00593 PA21_BOVIN	DDLDRCCQTHDNCYKQAKKLDSCKVLVDNPYTNNSYSYSCSNEITCSSENNACEAFICNC
sp P49121 PA2H_AKGCL	DATDRCCFVHKCCY---KKLTDC---NHKTDYSYSWKNKAIICEEKNP-CLKEMCEC
tr Q92152	DATDRCCSVHKCCY---KKLTDC---DPKTDYSYSWENGDIVCGGDDP-CTKEVCEC
tr Q9PVE3	DATDRCCYVHKCCY---KKLTGC---NPKKDRYSYSWKDKTIVCGENNS-CLKELCEC
tr Q42187	DATDRCCFVHDCY---EKLTCG---DPKWDDYTSWKNGTIVCGGDDP-CKKEVCEC
tr Q42188	DATDRCCFVHNCY---EKVTGC---DPKWDDYTSWKNGTIVCGGDDP-CKKEVCEC
sp P04361 PA2H_AGKPI	DATDRCCFVHKCCY---KKLTDC---NHKTDYSYSWKNKAIICEEKNP-CLKEMCEC
sp P04417 PA21_AGKHA	DATDRCCFVHDCY---EKVTGC---KPKWDDYTSWKNGTIVCGGDDP-CKKEICEC
sp P20381 PA2B_TRIFL	DATDRCCYVHKCCY---KKVTGC---DPKMDYSYSWKNKAIIVCGEKNPPCLKQVCEC
tr Q92118	DATDRCCFVHDCY---GKVTGC---NPKLGKTYTSWNNGTIVCEGDDP-CK-EVCEC
sp P22640 PA2B_TRIMU	DATDRCCFVHKCCY---KKVTGC---DPKMDYSYSWKNKAIIVCGEKNPPCLKQVCEC
sp P06859 PA21_TRIFL	DATDRCCFVHDCY---GKVTGC---NPKLGKTYTSWNNGTIVCEGDDP-CK-EVCEC
sp P81165 PA22_CERGO	DATDRCCFVHKCCY---KKLTDC---SPKTDYSYSWKNKAIIVCGEKNPPCLKQVCEC
tr P82950	DATDRCCFVHKCCY---KALTDC---SPKTDYSYSWKNKAIIVCGEKNPPCLKQVCEC
tr P82287	DATDRCCFVHKCCY---KKLTGC---NPKKDRYSYSWKDKTIVCGENNP-CLKELCEC
sp P24605 PA22_BOTAS	DATDRCCYVHKCCY---KKLTGC---NPKKDRYSYSWKDKTIVCGENNP-CLKELCEC
tr P82114	DATDRCCFVHKCCY---KKLTNC---DPKMDYSYSWKNKAIIVCGEKNPPCLKQVCEC
tr Q90249	DATDRCCYVHKCCY---KKLTGC---DPKMDYSYSWKNKAIIVCGEKNPPCLKQVCEC
tr Q9IAT9	DATDRCCYVHKCCY---KKLTGC---DPKMDYSYSWKNKAIIVCGEKNPPCLKQVCEC
tr Q9I834	DATDRCCYVHKCCY---KKLTGC---DPKMDYSYSWKNKAIIVCGEKNPPCLKQVCEC
	* * * * * . * * : . * . . * * . * * . * * : *
sp P00593 PA21_BOVIN	DRNAAICFSK--VPYNKEHKN-----LDK---KNC
sp P49121 PA2H_AKGCL	DKAVAICLRENLDTYNKKYKA-YFKFKCK-KPETC
tr Q92152	DKAATICFRDNLDTYDKKYKI-FPKFLCK-KPEPC
tr Q9PVE3	DKAVAICLRKNLDTYNKKYKNNYLKPFCK-KADPC
tr Q42187	DKAAAICFRDNLKTY-KKRYMTYPNLCSSKSEK
tr Q42188	DKAAAICFRDNLKTY-KKRYMTYPNLCSSKSEK
sp P04361 PA2H_AGKPI	DKAVAICLRENLDTYNKKYKA-YFKFKCK-KPDTC
sp P04417 PA21_AGKHA	DRAAAICFRDNLKTY-KKRYMAYPDILCSSKSEK
sp P20381 PA2B_TRIFL	DKAVAICLRENLDTYNKKYTI-YPKPFCK-KADTC
tr Q92118	DRAAAICFRDNLDTYDRNKYWRYPASNCQEDSEPC
sp P22640 PA2B_TRIMU	DKAVAICLRENLDTYDKKHRV-TVKFLCK-APESC
sp P06859 PA21_TRIFL	DRAAAICFRDNLDTYDRNKYWRYPASNCQEDSEPC
sp P81165 PA22_CERGO	DKAVAICLRENLDTYNKNYKI-YPKPLCK-KADAC
tr P82950	DKAVAICLRDNLDTYNKNYKI-YPKPLCK-KADDC
tr P82287	DKAVAICLRENLDTYNKKYRY-HLKPFCK-KADDC
sp P24605 PA22_BOTAS	DKAVAICLRENLDTYNKKYRY-YLKPFLCK-KADAC
tr P82114	DKAVAICLRENLDTYNKKYRY-HLKPFCK-KADDC
tr Q90249	DKAVAICLRENLDTYNKKYRY-HLKPFCK-KADAC
tr Q9IAT9	DKAVAICLRENLDTYNKKYRY-HLKPFCK-KADPC
tr Q9I834	DKAVAICLRENLDTYNKKYRYNYLKPFLCK-KADPC
	* : . * * : . * : . *

1- **P00593**- Fosfolipase Bovina, Tanaka et al., 1989; 2-**P49121** *Agkistrodon contortrix laticinctus*, de Araujo et al., 1996(c); 3-**Q92152** *Trimeresurus okinavensis* (Hime-habu) (*Ovophis okinavensis*), Nobuhisa et al., 1996; 4-**Q9PVE3** Miotoxina de *Bothrops asper* (Terciopelo), Pescatori et al., 1998; 5-**O42187** *Agkistrodon halys pallas* (Chinese water mocassin), Pan et al., 1997; 6-**042188** *Agkistrodon halys pallas* (Chinese water mocassin) (*Gloydius halys pallas*), Pan et al., 1997; 7-**P04361** *Agkistrodon piscivorus piscivorus*; Maraganore et al., 1986; Holland et al.;1990; Scott et al., 1992; 8-**P04417** *Agkistrodon halys blomhoffi* (Mamushi) (*Gloydius blomhoffii*) Forst et al.,1986; 9-**P20381** *Trimeresurus flavoviridis* (Habu) Ogawa et al., 1992; Nakashima et al., 1993; Yoshizumi et al., 1990; Liu et al., 1991; 10-**Q92118** *Trimeresurus flavoviridis* (Habu) Nakashima et al.,1993; Nakashima et al.,1994; 11-**P22640PA2B_TRIMU** *Trimeresurus mucrosquamatus*, Liu et al., 1991; 12-**P06859PA21_TRIFL** *Trimeresurus flavoviridis* (Habu) Oda et al., 1990, Ogawa et al., 1992, Nakashima et al., 1993, Tanaka et al., 1986; 13-**P81165 PA22_CERGO** GODMT-II de *Cerrophidion godmani* (*Porthidium godmani*) (*Bothrops godmani*) de Sousa et al., 1998, Arni et al., 1999; 14-**P82950** myotoxina II de *Atropoides nummifer* (submetido FEB, Angulo et al., 2001; 15- **P82287** Piratoxina- II *Bothrops piraja*, Toyama et al., 2000; 16- **P24605** Miotoxina-II *Bothrops asper* Francis et al., 1991; Arni et al., 1999; 17- **P82114** Miotoxina-I de *Bothrops moojeni*, Soares et al., 2000; 18- **Q90249** BOTHROPSTOXINA I de *Bothrops jararacussu* (Jararacussu), Ward et al., 1995; 19- **Q9IAT9** Miotoxina *Bothrops neuwiedi*, Rodrigues et al., 1998; 20- **Q9I834** Myotoxina- II [Precursor] de *Bothrops moojeni* de Azevedo et al., 1997, Soares et al., 1998.



Conclusões

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSÕES

O modelo para descrever a ação da fosfolipase BthTX-I em membranas *zwitteriônicas* em meio com pH neutro e apresentando força iônica correspondente a 150 mM de NaCl e que pode ser estendido a fosfolipases semelhantes compreende as etapas (simultâneas ou não) de variação conformacional resumidas a seguir:

- a) O dímero da proteína adquire a forma ativa e é estabilizado pela interação hidrofóbica com anfifílicos que se localizam na interface dos monômeros.
- b) A interação coulombiana blindada atrai e orienta a molécula da proteína nas vizinhanças da membrana.
- c) A interação coulombiana repele os cátions e aprisiona alguns anions na região de contato proteína-membrana.
- d) Os anions hidratados e situados entre os aminoácidos hidrofóbicos tendem a voltar para a solução por um canal auxiliados também pela interação coulombiana das cargas de polarização (o meio apresenta uma constante dielétrica de valor maior que a do meio membrana proteína). Entende-se que o efeito hidrofóbico é dominante.

- e) O excesso de cargas positivas da borda ventral, da proteína mergulhada na membrana, lisinas próximas ao grupo fosfato das colinas da membrana e os resíduos negativos próximos ao grupo NH_2^+ , distende a proteína, permitindo o contato das cadeias alifáticas da membrana com o sítio hidrofóbico da proteína.
- f) A pressão do "fluido alifático" que constitui a membrana e a reorientação dos dipolos das moléculas com a fosfatidilcolina resultam em uma repulsão e consequente afastamento da proteína da membrana.
- g) Afastada da membrana a micela de fosfolípídeo é liberada; deixando a proteína pronta para se ligar em um outro segmento de membrana.

A imagem descrita acima é baseada na interpretação dos resultados do estudo das variações da conformação da proteína e sua interação com anfífilicos.



6. BIBLIOGRAFIA

- Arni, R.K. and Ward, R.J. (1996). Phospholipase A2 – A structural review. *Toxicon* **34**, 827-841.
- Arni R.K., Fontes M.R., Barberato C., Gutierrez J.M., Diaz C., Ward R.J. (1999) Crystal structure of myotoxin II, a monomeric Lys49-phospholipase A2 homologue isolated from the venom of Cerrophidion (Bothrops) godmani. *Arch. Biochem. Biophys.* **366**, 177-182.
- Arni, R.K., Ward, R.J., Gutiérrez, J.M., Tulinsky, A. (1995) Structure of a calcium independent phospholipase-like myotoxic protein from *Bothrops asper* venom"; *Acta Cryst.* **D51**,311-317 (a).
- Arni, R.W., Ward, R.J., Cintra, A.C.O, Giglio, J.M. (1995) Cristallization and preliminary diffraction data of bothropstoxin I isolated from the venom *Bothrops jararacussu*. *Toxicon* **33**, 383-386(b).
- Baker, F.S., Othman, R., Wilton, C.D. (1998) Tryptophan-containing mutant of human (group II) secreted phospholipase A₂ has a dramatically increases ability to hydrolyse phosphatidylcholine vesicle and cell membranes. *Biochemistry* **37**,13203-13211.
- Berne, B.J. and Pecora. (2000). *Dynamic Light Scattering with Applications to Chemistry, Biology and Physics*. Dover, Canada.
- Brockerhoff, H. and Jensen, R.G. (1974) *Lipolytic Enzymes*, 194-243 Academic, London.
- Cintra, A.C.O., Marangoni, S., Oliveira, B., Giglio, J.R. (1993) Bothropstoxin -I: amino acid sequence and function. *J. Prot. Chem.* **12**, 57-64.
- Christopher, K. Mathews, K.E. van Holde (1990) *Biochemistry* The Benjamin/Cummings Publishing Company.
- da Silva Giotto, M.T., Garrat, R.C., Oliva, G., Mascarenhas, Y.P., Giglio, J.R., Cintra, A.C.O., Azevedo, W.F., Arni, R.K., Ward, R.J. (1998) Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: conformational changes in Bothropstoxin I, a dimeric Lys-49 phospholipase A2 homologue. *Proteins: Struc. Function, and Genetics* **30**, 442-454.
- de Araujo H.S., White S.P., Ownby C.L. (1996) cDNA cloning and sequence analysis of a lysine-49 phospholipase A2 myotoxin from Agkistrodon contortrix laticinctus snake venom. *Arch. Biochem. Biophys.* **326**, 21-30(a).
- de Araujo, H.S., White, S.P., Owby, C.L.(1996) Sequence analysis of Lys49 phospholipase A2 myotoxins: a highly conserved class of proteins. *Toxicon* **34**, 1237-1242 (b).
- de Azevedo W.F., Ward R.J., Lombardi F.R., Giglio J.R., Soares A.M., Fontes M.R.M., Arni R.K. (1997) Crystal structure of myotoxin-II: a myotoxic phospholipase A2 homologue from Bothrops moojeni venom. *Protein Pept. Lett.* **4**, 329-334.
- de Oliveira A.H.C., Andrião-Escarso S.H., Ito A.S., Ward R.J. (2001) A pH induced dissociation of the dimeric form a lysine49 phospholipase abolishes Ca²⁺ independent membrane damage activity. *Biochemistry* **40**, 6912-6920.
- de Sousa M.V., Morhy L., Arni R.K., Ward R.J., Diaz C., Gutierrez J.M. (1998) Amino acid sequence of a myotoxic Lys49-phospholipase A2 homologue from the venom of Cerrophidion (Bothrops) godmani. *Biochim. Biophys. Acta* **1384**, 204-208.
- Dennis, E. A. (1994) "Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2 enzymes: Regulation and physiological role." ; *Biochem. Pharmacol.* **48**, 1-10.

- Dennis, E.A. (1997) History, classification, structure and function of phospholipase A₂. In: Uhl, W., Nevalainen, T.J., Bucheler, M.W. (Eds.), *Phospholipase: Basic and Clinical Aspects in Inflammatory Diseases*. Karger Ed, 1-10.
- Díaz, C., Alape, A., Lomonte, B., Olamendi, T., Gutiérrez, J.M. (1994) Cleavage of the N-terminal octapeptide of *Bothrops asper* myotoxic lysine-49 phospholipase A₂ reduces its membrane-destabilizing effect. *Arch. Biochem. Biophys.* **312**, 336-339.
- Díaz, C., Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., Gene, J.A. (1991) The effect of myotoxins isolated from *Bothrops* snake venoms on multilamellar liposomes: Relationship to phospholipase A₂, anticoagulant and myotoxic activities. *Biochem. Biophys. Acta* **1070**, 455-460.
- Fasman, G. (1996) *Circular Dichroism and the conformational analysis of biomolecules*. edited by Gerald D. Fasman Plenum Press, New York.
- Fletcher, J.E., de Araujo, H.S., Owby, C.L., (1997). Molecular events in myotoxic effects of phospholipase. In: Kini, R.M. (Ed.), *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism*. John Wiley and Sons, Chichester, pp. 455-497.
- Forst S., Weiss J., Blackburn P., Frangione B., Goni F., Elsbach P. (1986) Amino acid sequence of a basic *Agkistrodon halys blomhoffii* phospholipase A₂. Possible role of NH₂-terminal lysines in action on phospholipids of *Escherichia coli*."; *Biochemistry* **25**, 4309-4314.
- Francis, B., Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., Kaiser, I.I. (1991) Myotoxin II from *Bothrops asper* (Terciopelo) venom is a lysine-49 phospholipase A₂. *Arch. Biochem. Biophys.* **284**, 352-359.
- Gelb MH Cho, W, Wilson DC (1999) Interfacial binding of secreted phospholipase A₂: more than eletrostatic and a major role for Tryptophan. *Current Opinion in Structural Biology* **9**, 428-432.
- Gutiérrez, J.M., Lomonte, B. (1995) Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snakes venoms. *Toxicon* **33**,1405-1424.
- Han, S.K., Yoon, E.T., Scott, D.L., Sigler, P.B., Cho, W. (1997) Structural aspects of interfacial adsorption. A crystallographic and site-directed mutagenesis study of the phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*.", *J. Biol. Chem.* **272**, 3573-3582.
- Harvey L. Alan (1991) *Snake Toxins* Pergamon Press, New York.
- Heinrikson, R.L. Dissection and sequence analysis of phospholipase A₂. (1991) In "Methods in Enzymology" (E.A. Dennis, ed.) **197**, 201-215.
- Holland D.R., Clancy L.L., Muchmore S.W., Ryde T.J., Einspahr H.M., Finzel B.C., Heinrikson R.L., Watenpaugh K.D. (1990) The crystal structure of a lysine 49 phospholipase A₂ from the venom of the cottonmouth snake at 2.0-Å resolution. *J. Biol. Chem.* **265**, 17649-17656.
- Homsi-Brandenburg M.I., Queiroz L.S., Santo-Neto H., Rodrigues-Simioni L., Giglio J.R. (1988) Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: Partial chemical characterization and biological activity of Bothropstoxin. *Toxicon* **26**, 615-627
- Hunter R.J. (1992) "Foundations of Colloid Science" Clarendon Press.
- Kehl, F.A., e R.W. Egan. (1980) Prostaglandins, arachidonic acid and Inflammation. *Science* **210**, 978-984.
- Kudo, I., Murakami, M., Hara, S., Inoue, K.(1993) Mammalian non-pancreatic phospholipase A₂ *Biochem. Biophys. Acta* **117**, 217-231.
- Laemmli, U.K. (1970) *Nature (London)* **227**,680.
- Lakowicz, J.R. (1983) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press.



- Liu C.-S., Chen J.-M., Chang C.-H., Chen S.-W., Teng C.-M., Tsai I.-H. (1991) The amino acid sequence and properties of an edema-inducing Lys-49 phospholipase A2 homolog from the venom of *Trimeresurus mucrosquamatus*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1077**, 362-370.
- Lomonte, B., Gutiérrez, J.M. (1989) A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (teciopelo). *Toxicon* **27**, 725-733.
- Maraganore, J.M., Heinrikson, R.L. (1986) The lysine-49 phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*. Relation of structure and function to other phospholipase A₂."; *J. Biol. Chem.* **261**, 4797-4804.
- Nakashima K., Nobuhisa I., Ogawa T., Hattori M., Sakaki Y., Kihara H., Ohno M. (1994) Polymorphisms of *Trimeresurus flavoviridis* venom gland phospholipase A2 isozyme genes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 1510-1511.
- Nakashima K., Ogawa T., Oda N., Hattori M., Sakaki Y., Kihara H., Ohno M. (1993) Accelerated evolution of *Trimeresurus flavoviridis* venom gland phospholipase A2 isozymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 5964-5968.
- Neugebauer, M.J. (1990) Detergents: An Overview. in Deutscher P.M. - Guide to Protein Purification - Methods in Enzymology. Academic Press Ed, pp 239-282.
- Nobuhisa I., Nakashima K., Deshimaru M., Ogawa T., Shimohigashi Y., Fukumaki Y., Sakaki Y., Hattori S., Kihara H., Ohno M. (1996) Accelerated evolution *Trimeresurus okinavensis* venom gland phospholipase A2 isozyme-encoding genes. *Gene* **172**, 267-272.
- Oda N., Ogawa T., Ohno M., Sasaki H., Sakaki Y., Kihara H. (1990) Cloning and sequence analysis of cDNA for *Trimeresurus flavoviridis* phospholipase A2, and consequent revision of the amino acid sequence. *J. Biochem.* **10**, 816-821.
- Ogawa T., Oda N., Nakashima K., Sasaki H., Hattori M., Sakaki Y., Kihara H., Ohno M. (1992) Unusually high conservation of untranslated sequences in cDNAs for *Trimeresurus flavoviridis* phospholipase A2 isozymes."; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 855- 856.
- Ownby, L.C., de Araújo, H.S., White, P.S., Fletcher, E.J. (1999) Lysine 49 Phospholipases A₂ proteins. *Toxicon* **37**, 411-445.
- Pan H., Wu X.F., Ouyang L.L., Liu X.L., Yang, G. (1997) to the EMBL/GenBank/DBJ Databases.
- Pedersen, J.Z., de Arcuri, B.F., Moreno, R.D., Rufini, S. (1994) Phospholipase-like myotoxins induce rapid membrane leakage of non-hydrolyzable ether-lipid liposomes. *Biochem. Biophys. Acta.* **1190**, 177-180.
- Pescatori M., Grasso A., Rufini S. (1998) Molecular cloning of a K-49 PLA2-like myotoxin from the snake *Bothrops asper*."; to the EMBL/GenBank/DBJ databases.
- Pierson, W.A., Vidal, J.C., Volwerk, J.J., De Haas, G.H. (1974) *Biochemistry* **13**, 1455-1460.
- Rodger, A. and Nordén, B. (1997) "Circular Dichroism & Linear Dichroism" Oxford Chemistry Masters. New York.
- Rodrigues V.M., Soares A.M., Mancin A.C., Fontes M.R.M., Homs-Brandeburgo M.I., Giglio J.R. (1998) Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. *Comp. Biochem. Physiol.* **121A**:215-222(1998).



- Ruffini, S., Cesaroni, P., Desideri, A., Farias, R., Gubensek, F., Gutiérrez, J.M., Luly, P., Massoud, R., Morero, R., Pedersen, J.Z. (1992) Calcium ion independent membrane leakaged induced by phospholipase-like myotoxins. *Biochemistry* **31**, 12424-12430.
- Santos, C.N. and Castanho, A.R.B.M. (1996) Teaching Light Scattering Spectroscopy: The Dimension and Shape of Tobacco Mosaic Virus. *Biophysical Journal* **71**, 1641-1646.
- Schmitz, K.S. (1990) An introduction to Dynamic Light Scattering by Macromolecules. Academic Press, San Diego.
- Scott, D.L., Otwinowski, Z., Yuan, W., Gelb, H.G., Sigler, P.B. (1990) Interfacial catalysis: The mechanism of phospholipase A2. *Science* **250**, 1541-1546.
- Scott D.L., Achari A., Vidal J.C., Sigler P.B. (1992) Crystallographic and biochemical studies of the (inactive) Lys-49 phospholipase A2 from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*. *J. Biol. Chem.* **267**, 22645-22657.
- Scott D.L., Mandel A.M., Sigler P.B., Honig B. (1994) The eletrostatic basis for the interfacial binding of secretory phospholipase A2. *Biophys J.* **67**, 493-504.
- Soares A.M., Rodrigues V.M., Homsí-Brandeburgo M.I., Toyama M.H., Lombardi F.R., Arni R.K., Giglio J.R. (1998) A rapid procedure for the isolation of the Lys-49 myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. *Toxicon* **36**, 503-514.
- Soares A.M., Andriao-Escarso S.H., Augulo Y., Lomonte B., Gutierrez J.M., Marangoni S., Toyama M.H., Arni R.K., Giglio J.R. (2000) Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A2 homolog from *Bothrops moojeni* (Caissaca) snake venom. *Arch. Biochem. Biophys.* **373**, 7-15.
- Soares A. M. (2000) Estrutura, função e inibição de miotoxinas homólogas a fosfolipases A₂ isoladas de veneno de serpentes. Tese de Doutorado, Departamento de Bioquímica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.
- Szoka, J.R.F. and Papahadjopoulos, D. (1978) Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **75**, 4194-4198.
- Tanake T., Kimura S., Ota Y. (1987) Sequence of a cDNA coding for bovine pancreatic phospholipase A2. *Nucleic Acids Res.* **15**, 3178-3178.
- Tanaka S., Mohri N., Kihara H., Ohno M. (1986) Amino acid sequence of *Trimeresurus flavoviridis* phospholipase A2. *J. Biochem.* **99**, 281-289.
- Tanford, C. (1980) *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes* 2nd Ed. New York: Wiley.
- Thunnissen, M.M.G.M., Elso, A.B., Kalk, K.H., Drenth, J., Dijkstra, B.W., Kuipers, P., Dijkman, R., De Haas, G.H., Verheij, H.M. (1990) X-ray structure of phospholipase A2 complexed with a substrate derived inhibitor. *Nature* **347**, 689-691.
- Toyama M.H., Soares A.M., Lee H.-W., Polikarpov I., Giglio J.R., Marangoni S. (2000) Amino acid sequence of piratoxin-II, a myotoxic Lys49 phospholipase A2 homologue from *Bothrops piraja* venom. *Biochimie* **82**, 245-250.
- Tsai I.-H., Au L.-C., Liew Y.-F., Wang Y.-M., Chu Y.-F. (1998) Cloning and sequencing of phospholipases A2 variants from venom gland of *Calloselasma rhodostoma*. The EMBL/GenBank/DBJ databases.
- Van den Bergh, C.J., Slotboom, A.J., Verheij, H.M., de Haas, G.H. (1989) The role of Asp-49 and other conserved amino acids in phospholipase A2 and their importance for enzymatic activity. *J. Cell. Biochem.* **39**, 379-390.

- Verheij, H.M., Volweerk, J.J., Jansen E.H., Dijkstra, B.W. and de Haas, G.H. (1980) Methylation of histidine-48 in pancreatic phospholipase A₂. Role of histidine and calcium ion in the catalytic mechanism. *Biochemistry* **19**, 743-750.
- Verger, R. & De Haas, G.H.A. (1976) *Biophys. Bioeng.* **5**, 77-117.
- Villamil, F.V.R., Corio, P., Rubim, C.J., Agostinho M.L.S. (1999) Effect of sodium dodecylsulfate on copper corrosion in sulfuric acid media in the absence and presence of benzotriazole. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **472**, 112-119.
- Ward, R.J., Monesi, N., Arni, R.K., Larson, R.E., Paço-Larson, M.L. (1995) Nucleotides sequence of a cDNA encoding bothropstoxin I, a myotoxin from the venom of *Bothrops jararacussu*. *Gene* **156**, 305-306.
- Wells, M.A. (1974) *Biochemistry* **13**, 2248-2257.
- White, S. H. (1994) *Membrane Protein Structure*. Oxford University Press, New York.
- Wittcoff, H. (1951) *The Phosphatides*, pp. 99-115, Reinhold Publishing Corp., New York.



