

Carla Cristina Biazi Lorenzi

Estudo Estrutural de Mastoparanos
Isolados de Vespas Solitárias



*

1910001073



Carla Cristina Biazzi Lorenzi

**ESTUDO ESTRUTURAL DE MASTOPARANOS
ISOLADOS DE VESPAS SOLITÁRIAS**



T 1073/02

Dissertação para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular, área de concentração em Biofísica Molecular, apresentada ao Departamento de Física do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Unesp.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Walter Filgueira de Azevedo Jr.

CO-ORIENTADOR:

Prof. Dr. João Ruggiero Neto

**São José do Rio Preto
2002**

Xerocada

577.112
L869e

20801017



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"

Carla Cristina Biazzi Lorenzi

ESTUDO ESTRUTURAL DE MASTOPARANOS
ISOLADOS DE VESPAS SOLITÁRIAS

Lorenzi, Carla Cristina Biazzi.

Estudo estrutural de mastoparanos isolados de vespas solitárias /

Carla Cristina Biazzi Lorenzi. – São José do Rio Preto : [s.n.], 2002

142 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Walter Filgueira de Azevedo Júnior.

Co-Orientador: João Ruggiero Neto.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.

1. Proteínas - Estrutura. 2. Biofísica molecular. 3. Mastoparanos. 4. Cristalografia. 5. Dicroísmo circular. I. de Azevedo Jr., Walter Filgueira. II. Ruggiero Neto, João. III. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 577.112



Data da Defesa: 30 de abril de 2002.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Walter Filgueira de Azevedo Jr. (Orientador)

Prof. Dr. Mário Sérgio Palma

Prof. Dr. Salvatore Giovanni de Simone



Este trabalho foi realizado junto ao Departamento de Física do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", com o auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Bolsa de Mestrado, processo nº 00/03821-5).



Agradecimentos...

Ao Prof. Dr. Walter Filgueira de Azevedo Júnior, pela orientação dedicada desde a Iniciação Científica e pelo pronto e irrestrito apoio, que me proporcionaram um amadurecimento científico.

Ao Prof. Dr. João Ruggiero Neto, pela co-orientação valiosa, pela paciência em todos os momentos e, sobretudo, pela amizade e dedicação a esse trabalho.

À Fapesp, pelo auxílio financeiro.

Aos Profs. Drs. Marcelo Andrés Fossey e Marinônio Cornélio Lopes, pela colaboração crítica e atenciosa no Exame de Qualificação.

Aos demais professores do Departamento de Física, por todos os ensinamentos transmitidos e pelo acolhimento.

Aos funcionários do Departamento de Física, pela pronta ajuda e paciência.

Ao Departamento de Química, pelo uso dos equipamentos.

À Direção do Instituto, pela disposição das condições materiais.

Ao Prof. Dr. Mário Sérgio Palma e Prof. Katsuhiro Konno, pela valiosa colaboração na execução deste trabalho.

Aos colegas do Grupo de Biocristalografia, Janaína, Valmir, Fernanda, Henrique, João, Nelson, Renato, Patrícia, Denis, Plínio, pela ajuda em vários momentos e pela amizade em todos.

Aos colegas de sala, e grandes amigos, Janaína e Valmir, pelos momentos de alegria, pelas discussões e pela ajuda sem limites que jamais será esquecida.

Às amigas Sabrina, Luciana e Janaína, pelos almoços maravilhosos, pelos lamúrios, pelo riso, por tudo o que fortaleceu nossos laços.

Aos amigos Gláucia, Ocimar, Ricardo Hildebrand, Renato, Flávio, Fátima, Norma, Osmar, Alexandre, Bernadete, Fausto, Giovani, Marcelo, Lessandra, Luiz, Márcia, Milton, Leandra, Luis Paulo, Priscila, Sidney, Fernanda, Raquel, Ricardo, Sérgio, Shirley, Teresa, Ceci, Fábio, Hamilton e Gel, pelo companheirismo e harmoniosa convivência.

Às amigas Alessandra, Ana Cláudia e Juliane, pelos maravilhosos momentos que dividimos desde a Graduação.

Aos meus amigos da Legião de Maria, pelo amparo e pelo carinho tão importantes na minha caminhada.

À minha família, pela confiança plena e, acima de tudo, pelo amor dedicado e sem limites, sem o qual nada disso seria possível.

A Deus, por tudo.



Certeza.

De tudo ficaram três coisas

A certeza de que estamos começando.

A certeza de que é preciso continuar.

A certeza de que podemos ser interrompidos
antes de terminar.

Fazer da interrupção um caminho novo

Fazer da queda um passo de dança

Do medo uma escola.

Do sonho uma ponte.

Da procura um encontro.

Certeza...

De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos começando...

A certeza de que é preciso continuar...

*A certeza de que podemos ser interrompidos
antes de terminar...*

Fazer da interrupção um caminho novo,

Fazer da queda um passo de dança,

Do medo uma escola...

Do sonho uma ponte...

Da procura um encontro...

E assim, terá valido a pena existir.

(Fernando Sabino)

ÍNDICE GERAL

RESUMO	1
ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO	5
Veneno de Himenópteros	5
Mastoparanos Isolados de Vespas Sociais	8
Mastoparanos Isolados de Vespas Solitárias	14
Interação de Peptídeos com Membranas Lipídicas	20
OBJETIVO	31
MATERIAIS E MÉTODOS	32
Cristalização	32
Cristalização do Anoplin	33
Cristalização do EMP-AF	34
Cristalização do EMP-AF 2	34
Coleta de Dados de Difração de Raios X	34
Dicroísmo Circular	36
Fluorescência	38
Preparo dos Lipossomos	39
Liberação de Carboxifluoresceína	42
RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
Cristalização de Mastoparanos	43
Coleta de Dados de Difração de Raios X	46
Análise da Estrutura Secundária por Dicroísmo Circular	48
Espectros de CD de EMP-AF	49
Espectros de CD de EMP-AF1	53
Espectros de CD de EMP-AF2	56
Espectros de CD de EMP-AF3	59
Espectros de CD de Anoplin	62
Espectros de CD de outros mastoparanos	66



Experimentos de Liberação de Carboxifluoresceína	68
Estrutura Secundária e Terciária dos Modelos	74
CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
APÊNDICE A - CRISTALIZAÇÃO	91
Introdução	91
Princípios da Cristalização	93
Solubilidade e supersaturação	94
Diagramas de fase de macromoléculas biológicas	95
Técnicas de cristalização	97
O Método da Matriz Esparsa (Fatorial)	99
Referências Bibliográficas	100
APÊNDICE B - DICROÍSMO CIRCULAR	103
Introdução	103
Polarização da Luz	103
Características do Dicroísmo Circular	105
Resultados para Estruturas Secundárias	106
Dicroísmo circular de peptídeos	109
Referências Bibliográficas	110
APÊNDICE C - FLUORESCÊNCIA	111
Princípios Básicos	111
Fluorescência de Proteínas	113
Referências Bibliográficas	114
APÊNDICE D - ARTIGOS	115

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fotomicrografias eletrônicas de um mastócito.	10
Figura 2. Elementos de estrutura secundária da melitina.	11
Figura 3. Representação do potencial eletrostático de superfície da melitina.	12
Figura 4. Elementos de estrutura secundária do mastoparano X.	13
Figura 5. Representação do potencial eletrostático de superfície do mastoparano X.	14
Figura 6. A vespa <i>Anterhynchium flavomarginatum</i> micado.	15
Figura 7. A vespa <i>Anoplius samariensis</i> .	16
Figura 8. Estrutura secundária prevista dos Mastoparanos	17
Figura 9. Gráfico da liberação de histamina pela atividade dos mastoparanos.	19
Figura 10. Gráfico da atividade hemolítica dos mastoparanos sobre eritrócitos.	19
Figura 11. Desenhos esquemáticos do modelo "barril" (superior) e "toroidal" (inferior).	24
Figura 12. Ilustração dos modelos "barril" e "carpete".	25
Figura 13. Outros modelos da interação peptídeo-membrana.	27
Figura 14. Esquema da formação de um poro transiente.	29
Figura 15. Representação esquemática do método gota pendurada.	32
Figura 16. Diagrama representativo da formação de lipossomos.	40
Figura 17. Fotomicrografia dos primeiros cristais do Anoplin.	43
Figura 18. Fotomicrografia dos cristais do Anoplin após as melhorias.	44
Figura 19. Fotomicrografia dos cristais de EMP-AF.	45
Figura 20. Fotomicrografias dos cristais de EMP-AF2.	46
Figura 21. Espectros de CD das estruturas secundárias.	49
Figura 22. Espectros de CD de EMP-AF em várias concentrações de TFE.	50
Figura 23. Espectros de CD de EMP-AF: (a) em SDS; (b) em TFE e SDS.	51
Figura 24. Espectros de CD de EMP-AF em lipossomos neutros e aniônicos.	52
Figura 25. Espectros de CD de EMP-AF1 em várias concentrações de TFE.	53
Figura 26. Espectros de CD de EMP-AF1: (a) em SDS; (b) em TFE e SDS.	54
Figura 27. Espectros de CD de EMP-AF1 da dependência da elipticidade em SDS.	55
Figura 28. Espectros de CD de EMP-AF1 na presença de lipossomos ácidos.	56
Figura 29. Espectros de CD de EMP-AF2 em várias concentrações de TFE.	57
Figura 30. Espectros de CD de EMP-AF2: (a) em SDS; (b) em TFE e SDS.	58
Figura 31. Espectros de CD de EMP-AF2 em lipossomos aniônicos.	59
Figura 32. Espectros de CD de EMP-AF3: (a) em SDS; (b) evidenciando a não-dependência da elipticidade pela concentração do peptídeo.	60



Figura 33. Espectros de CD de EMP-AF3 em lipossomos neutros e aniônicos.	61
Figura 34. Espectros de CD de Anoplin nos máximos de TFE e SDS.	62
Figura 35. Espectros de CD de Anoplin em várias concentrações de SDS.	63
Figura 36. Espectros de CD de Anoplin, evidenciando a dependência da elipticidade pela concentração, em SDS.	64
Figura 37. Espectros de CD de Anoplin em lipossomos neutros e aniônicos.	65
Figura 38. Espectros de CD em TFE para EMP-ER.	66
Figura 39. Espectros de CD em TFE para EMP-EM1.	67
Figura 40. Espectros de CD em TFE para EMP-EM2.	67
Figura 41. Curvas da cinética de liberação de carboxifluoresceína pelo EMP-AF.	70
Figura 42. Liberação de carboxifluoresceína de lipossomos de fosfatidilcolina por EMP-AF e Anoplin.	71
Figura 43. Liberação de carboxifluoresceína de lipossomos de fosfatidilcolina pelos eumenines mastoparanos.	73
Figura 44. (a) Modelo estrutural do EMP-AF. (b) Representação do potencial eletrostático de superfície do modelo de EMP-AF.	75
Figura 45. (a) Modelo estrutural do Anoplin. (b) Representação do potencial eletrostático de superfície do modelo do Anoplin.	76
Figura 46. Gráficos do potencial de liberação de histamina pelos mastoparanos.	80
Figura 47. Gráficos do potencial hemolítico dos eumenines mastoparanos.	81
Figura 1A. Descrição esquemática de um diagrama bidimensional da solubilidade de uma macromolécula biológica.	97
Figura 2A. Representação esquemática da gota pendurada, gota sentada e gota sanduíche.	99
Figura 1B. superior: Vetores campo elétrico e magnético de uma onda eletromagnética; inferior: Luz circularmente polarizada à direita.	104
Figura 2B. Ilustração esquemática do dicroísmo circular.	104
Figura 3B. Esquema de um espectropolarímetro.	105
Figura 4B. Ilustrações esquemáticas das transições em peptídeos.	106
Figura 5B. Ilustração de uma ligação peptídica e os ângulos Φ e Ψ .	107
Figura 6B. Espectros de CD de estruturas secundárias "puras".	108
Figura 7B. Desenhos esquemáticos de uma α -hélice e folha- β .	109
Figura 1C. Diagrama de Jablonski.	112
Figura 2C. Etapas envolvidas no processo de fluorescência.	113
Figura 3C. Espectros de emissão de fluorescência dos aminoácidos aromáticos.	114

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de mastoparanos com suas seqüências primárias.	8
Tabela 2. Estatística detalhada dos dados de difração de raios X.	48
Tabela 3. Frações α -hélice de EMP-AF obtidas em diversas condições.	53
Tabela 4. Frações α -hélice de EMP-AF1 obtidas em diversas condições.	56
Tabela 5. Frações α -hélice obtidas em diversas condições para EMP-AF2.	57
Tabela 6. Frações α -hélice obtidas em diversas condições para EMP-AF3.	62
Tabela 7. Frações α -hélice obtidas em diversas condições para Anoplin.	65
Tabela 8. Porcentagem de liberação de carboxifluoresceína por EMP-AF em uma razão de 35 lipídeos/peptídeo.	69
Tabela 9. Porcentagem de liberação de carboxifluoresceína por EMP-AF em uma razão de 10 lipídeos/peptídeo.	69
Tabela 10. Porcentagem de liberação de carboxifluoresceína por Anoplin em uma razão de 35 lipídeos/peptídeo.	72
Tabela 11. Porcentagem de liberação de carboxifluoresceína por Anoplin em uma razão de 10 lipídeos/peptídeo.	72
Tabela 12. Resumo dos resultados conformacionais e de atividade biológica.	82
Tabela 1A. Alguns parâmetros que afetam a cristalização de macromoléculas biológicas.	94
Tabela 2A. Soluções de Cristalização.	101

LISTA DE ABREVIações

- CD:** Dicroísmo Circular (*Dichroism circular*)
- cmc:** Concentração molar crítica
- DPPC:** Dipalmitoil-fosfatidilcolina
- DPPG:** Dipalmitoil-fosfatidilglicerol
- EMP-AF:** Eumenine Mastoparano-AF
- f_H :** Fração de α -hélice
- FIT:** Fluorescência Intrínseca do Triptofano
- HFIP:** Hexafluoroisopropanol
- LNLS:** Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
- MCD:** Peptídeo degranulador de Mastócitos (*Mast Cell Degranulating peptide*)
- MMB:** Macromolécula Biológica
- MP:** Mastoparano
- ND:** Não determinado
- PC:** Fosfatidilcolina
- PCr:** Estação de Cristalografia de Proteínas do LNLS
- PDB:** *Protein Data Bank*
- PEG:** Polietilenoglicol
- PG:** fosfatidilglicerol
- RMN:** Ressonância Magnética Nuclear
- SDS:** Dodecil Sulfato de Sódio
- TFE:** Trifluoretanol
- UV:** Luz Ultravioleta
- V_M :** Volume de Mathews

RESUMO

Os venenos de vespas caracterizam-se por apresentarem um grande número de peptídeos biologicamente ativos. Dentre estes, destacam-se os mastoparanos, tetradecapeptídeos que degranulam mastócitos. Há um grande interesse a respeito destas toxinas, uma vez que são, em grande parte, responsáveis pela atividade farmacológica conferida pelo veneno, incluindo neurotoxicidade, atividade hemolítica, liberação de histamina de mastócitos e atividade antibacteriana. Dessa forma, fazendo uso de técnicas de difração de raios X, dicroísmo circular e fluorescência, procurou-se fazer um estudo estrutural sistemático a respeito dos mastoparanos para, posteriormente, entender-se as bases moleculares das diferentes atividades biológicas.

Neste projeto de Mestrado, foram estudados o eumenine mastoparano-AF e análogos, extraídos do veneno da vespa solitária *Anterhynchium flavomarginatum micado*, e Anoplin, isolado do veneno da vespa *Anoplius samariensis*.

Vários mastoparanos foram cristalizados, mas os cristais resultantes foram inadequados aos ensaios de difração de raios X, com exceção do EMP-AF, que difratou a 2Å de resolução. Utilizou-se, então, técnicas espectroscópicas para acessar a estrutura secundária destes peptídeos em ambientes que mimetizam a hidrofobicidade da membrana biológica.

Todos os mastoparanos apresentaram-se em uma conformação aleatória em tampão. Na presença de TFE, apresentaram conformação helicoidal dependente da sequência de aminoácidos e da proteção do C-



terminal. Porém, em SDS, houve a formação de prováveis estruturas β , dependentes da concentração dos peptídeos. Na presença de lipossomos neutros, todos os mastoparanos apresentaram estrutura aleatória. Mesmo nesta situação, foram capazes de romper os lipossomos. Em lipossomos aniônicos, apenas EMP-AF e Anoplin formaram estrutura secundária definida, porém EMP-AF apresentou uma conformação próxima de folha- β e os espectros de Anoplin indicaram uma conformação helicoidal.



ABSTRACT

Wasps venoms present a large number of biologically active peptides, mastoparans-like, mast cell degranulating tetradecapeptides. There is a great interest regarding these toxins, since they are largely responsible for the pharmacological activity of the venom, including neurotoxicity, hemolytic activity, histamine releasing activity and antimicrobial activity. Making use of X-ray diffraction, circular dichroism and fluorescence, it was attempted to do a systematic structural study regarding the mastoparans to understand the molecular basis of the different biological activities.

In this project, it was studied EMP-AF and analogs, extracted from the venom of the solitary wasp *Anterhynchium flavomarginatum micado* and Anoplin, isolated from the wasp *Anoplius samariensis*.

Several mastoparans were crystallized, but the resulting crystals were unsuitable to the X-ray diffraction essays. It was used spectroscopy techniques to access the secondary structure of these peptides in environments that mimic the hydrophobicity of biological membranes.

In buffer all the mastoparans adopt a random conformation. In TFE, they presented a helical conformation dependent of the amino acid sequence and the C-terminal protection. However in SDS probably occur the formation of β structures, dependent of the peptide concentration. In the presence of neutral liposomes, all the mastoparans presented random structure. Even in this situation they were capable to cause rupture of these liposomes.

Abstract

In acidic liposomes, EMP-AF and Anoplin formed a defined secondary structure, however EMP-AF presented a β conformation and the spectra of Anoplin indicated a helical conformation.



INTRODUÇÃO

VENENO DE HIMENÓPTEROS

Aproximadamente 75% das espécies de animais do mundo são artrópodes. Enquanto a maioria destas espécies não tem nenhuma interação apreciável com humanos, algumas causam problemas médicos e agrícolas significantes. Entre os artrópodes venenosos mais importantes estão os aracnídeos (aranhas, escorpiões) e insetos da ordem *Hymenoptera* (que significa "asas membranosas"), uma das maiores ordens dentro da classe dos insetos. É composta por, pelo menos, 200.000 espécies de abelhas, vespas e formigas envolvidos, direta ou indiretamente, na vida humana. Em particular, a apicultura realizada com abelhas e os acidentes médicos ocorridos devido ao veneno de vespas são bem conhecidos. Assim, devido a esse relacionamento tão próximo com os humanos, é natural que os himenópteros sejam alvo de intensa pesquisa (Vetter & Visscher, 1998).

Reações alérgicas à ferroada de insetos são conhecidas desde a antiguidade. O incidente mais antigo que se têm notícia está gravado num quadro de ébano, descoberto na tumba vazia do Rei Menes do Egito. De acordo com a tradução dos hieróglifos, Menes teve um final trágico resultante de uma ferroada de vespa, durante uma expedição marítima no século 26 a.C. (Cohen & Bianchine., 1995).

Embora a maioria das mortes seja devido a reações imunológicas, algumas se devem à toxicidade direta. Reações anafiláticas severas



acontecem quando as toxinas estimulam diretamente os mastócitos. Os sintomas mais comuns são: inchaço, edema, dor, urticária, ulceração, vasodilatação, aumento da permeabilidade dos vasos, tonturas, taquicardia e morte (Park, 2002).

Embora o veneno de abelhas e vespas varie de espécie à espécie, geralmente é composto de proteínas, peptídeos, e aminas. As aminas biogênicas causam dor, são vasodilatadoras e aumentam a permeabilidade dos vasos, permitindo que o veneno se espalhe pelo corpo da vítima. Peptídeos básicos e fosfolipases têm atividade hemolítica, citotóxica e neurotóxica. Enzimas e outras moléculas de peso molecular alto são os principais alergênicos. As reações anafiláticas são causadas principalmente pelos mastoparanos e outros peptídeos degranuladores de mastócitos (MCD). O tamanho das moléculas e a presença de proteínas determinadas aumentam as propriedades de antígeno do veneno, transformando-o num potente ativador do sistema imune (Vetter & Visscher, 1998).

Entre os himenópteros, existem dois comportamentos de vida: social e solitário. Himenópteros sociais incluem abelhas, vespas e formigas, enquanto que os solitários são as vespas solitárias e vespas parasitas (extremamente benéficas à agricultura como agentes de controle biológico de insetos causadores de pestes agrícolas) (Vetter & Visscher, 1998). Uma das diferenças entre os dois grupos é a maneira como dispõem de seu veneno.

O veneno de himenópteros sociais é usado para defesa própria e de suas larvas, contra o ataque de predadores e invasores. A ferroada destes insetos geralmente produz dor severa, danos locais, ocasionalmente levando à



morte. Os constituintes químicos desses venenos têm sido muito estudados e uma série de substâncias agem juntas, produzindo os efeitos biológicos decorrentes da ferroada (Habermann, 1972; Nakajima *et al.*, 1986).

Dentre as toxinas de vespas sociais melhor caracterizadas, destacam-se os peptídeos anfipáticos de caráter inflamatório, tais como, a melitina, presente no veneno de abelhas, e mastoparanos, no veneno de vespas (Banks *et al.*, 1986; Nakajima, 1986). Todos eles mostram potente degranulação de mastócito, hemólise e atividade antimicrobiana. Além disso, podem adotar uma estrutura secundária em α -hélice anfipática, sob condições apropriadas, o que é importante para seus efeitos farmacológicos.

Vespas solitárias usam seu veneno para capturar presas: elas injetam-no em aranhas e insetos que, paralisados, servem de alimento para suas larvas. Por esta razão, o veneno de vespas solitárias deve conter uma variedade de neurotoxinas (Piek, 1986). Até recentemente, contudo, apenas um estudo superficial dos componentes químicos do veneno das vespas solitárias havia sido empreendido. É provável que isso se deva à extrema dificuldade em se coletar um número suficiente dessas vespas para análise bioquímica. Estudos prévios revelaram que realmente o veneno de himenópteros solitários contém várias substâncias bioativas, como neurotoxinas e peptídeos inflamatórios similares aos encontrados no veneno de himenópteros sociais.



MASTOPARANOS ISOLADOS DE VESPAS SOCIAIS

Diversos peptídeos bioativos foram isolados de venenos de vespas e abelhas em geral. Tais peptídeos são classificados, segundo suas atividades biológicas e estruturas moleculares, em diversas famílias, como por exemplo, a dos mastoparanos e das cininas de vespas (Nakajima *et al.*, 1985; Dohtsu *et al.*, 1993).

Os mastoparanos fazem parte de uma classe de peptídeos que degranulam mastócitos e geralmente são formados por 10 a 14 resíduos de aminoácidos (Nakajima, 1984). Na Tabela 1 são apresentados vários mastoparanos extraídos de veneno de vespas sociais.

Tabela 1. Exemplos de mastoparanos, com suas seqüências primárias e himenópteros de origem.

Nome (Seqüência de aminoácidos)	Vespa
Mastoparano (INWKKMAATALKMI-NH ₂)	<i>Parapolybia indica</i>
Mastoparano X (INWKGIAAMAKLL-NH ₂)	<i>Vespa xanthoptera</i>
Mastoparano-MCD (INLKAIAALVKKVL-NH ₂)	<i>Vespa orientalis</i>
Mastoparano M (INLKAIAALAKKLL-NH ₂)	<i>Vespa mandarinia</i>
Mastoparano C (INLKALLAVAKKIL-NH ₂)	<i>Vespa crabro</i>
Mastoparano (INLKALAALAKKIL-NH ₂)	<i>Vespula lewisii</i>
Mastoparano B (LKLKSIVSWAKKVL-NH ₂)	<i>Vespa basalis</i>
Mastoparano <i>Polistes</i> (VDWKKIGGHILSVL-NH ₂)	<i>Polistes jadvigae</i>
Crabrolin (FLPLILRKIVTAL-NH ₂)	<i>Vespa crabro</i>

Uma das propriedades dos mastoparanos é realizar interações com biomembranas (Katsu *et al.*, 1989), provocando aumento da permeabilidade das mesmas, através da liberação de fosfolipídeos. Visto que são muito pequenos para atravessar as membranas como α -hélices anfipáticas,

configuração que geralmente assumem quando em contato com as mesmas, os mastoparanos associam-se, formando poros passageiros que acabam por aumentar a permeabilidade das bicamadas lipídicas a solutos hidrofílicos (Arbuzova & Schwarz, 1999).

Em experimentos de liberação de marcador fluorescente, verificou-se que os mastoparanos aumentam a permeabilidade de lipossomos formados por fosfatidiletanolamina e fosfatidilglicerol. Estes lipídios são os principais constituintes da membrana citoplasmática de *Escherichia coli*. Porém mostraram fraca atividade contra lipossomos compostos de fosfatidilcolina e colesterol. Estes resultados indicam que mastoparanos são translocados para o interior de lipossomos compostos principalmente de fosfolípidos ácidos (Katsu *et al.*, 1990). Estas observações sugerem que o mecanismo envolvido na liberação de histamina por mastócitos seja devido à ação de peptídeos da família dos mastoparanos. Mastócitos são células de defesa de muitos organismos, que contêm grânulos de serotonina e histamina, desencadeadores das reações alérgicas. É provável que esta liberação siga um mecanismo no qual inicialmente a membrana celular é perturbada (com conseqüente rompimento), o peptídeo é translocado e as proteínas-G dos mastócitos são ativadas (Dohtsu *et al.*, 1993). A Figura 1 ilustra fotomicrografias de um mastócito antes e depois de ter liberado seus grânulos de histamina.



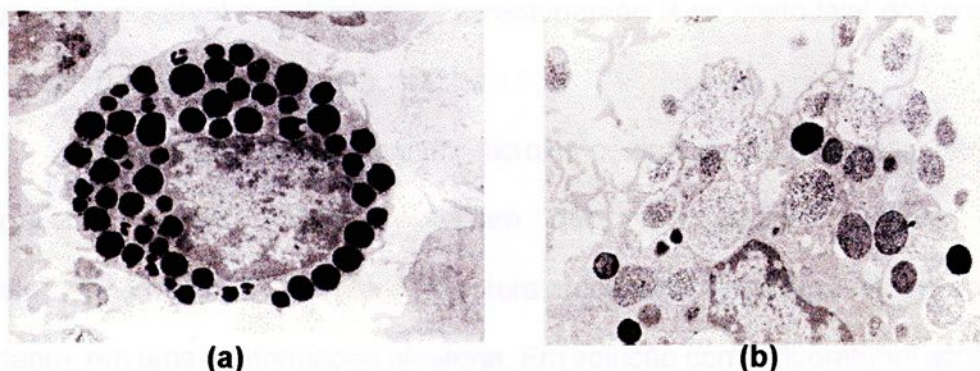


Figura 1. Fotomicrografias eletrônicas de um mastócito. **(a)** Os grânulos de secreção de histamina estão intactos. **(b)** Grânulos de secreção já foram liberados, a superfície da célula é irregular e o conteúdo dos grânulos está em dissolução.

Aumento de 20.000 x. (Junqueira, 1990).

Além da atividade de degranulação de mastócitos, descobriu-se que mastoparanos podem induzir um aumento na atividade fosfolipásica. As fosfolipases A_2 , catalisadoras da liberação de ácido aracdônico, são, talvez, as enzimas mais estudadas do ponto de vista estrutural, sendo encontradas nas mais diversas fontes: desde venenos de serpentes, lagartos e abelhas até pâncreas de mamíferos. Os mastoparanos apresentam a capacidade de aumentar em 12, 15 e 50 vezes a produção de ácido aracdônico, catalisada pelas fosfolipases A_2 do veneno de abelha, veneno de cascavel e de pâncreas porcino, respectivamente (Argiolas & Pisano, 1983). Estes resultados sugerem que mastoparanos e outros peptídeos presentes em venenos de insetos atuam, ao menos em parte, como estimulantes da atividade fosfolipásica. Tal mecanismo ainda está para ser elucidado do ponto de vista estrutural.

Os mastoparanos apresentam forte atividade hemolítica, comprovada por experimentos realizados com o mastoparano B, isolado de *Vespa basalis*. Esta hemólise atua por sinergismo com a proteína do veneno da vespa, o que

sugere um possível envolvimento do mastoparano B no efeito letal do veneno de *Vespa basalis* (Ho & Hwang, 1991).

Estudos estruturais usando dicroísmo circular (CD) e ressonância magnética nuclear (RMN) revelaram que, em solução aquosa, os mastoparanos não apresentam estrutura secundária mensurável, estando, portanto, em uma conformação aleatória. Em solução com trifluoretanol adotam uma conformação em α -hélice anfipática (Chuang *et al.*, 1996), cujos grupos positivamente carregados (grupo NH_2 do amino terminal e três resíduos de lisina ou outros aminoácidos positivamente carregados) localizam-se em um dos lados da hélice, enquanto que os resíduos hidrofóbicos ocupam a outra face da hélice. Tal conformação é considerada como de grande relevância para a ação tóxica do mastoparano (Katsu *et al.*, 1990, Nakajima *et al.*, 1985, Konno *et al.*, 2000).

A melitina (27 resíduos de aminoácidos), toxina extraída do veneno da abelha *Apis mellifera*, também interage com membranas. Sua estrutura tridimensional, resolvida por cristalografia (Terwilliger & Eisenberg, 1982a, b; Código de acesso no PDB: 2MLT), apresenta a forma de um bastão curvado composto por dois segmentos de α -hélice em cada cadeia (Figura 2).

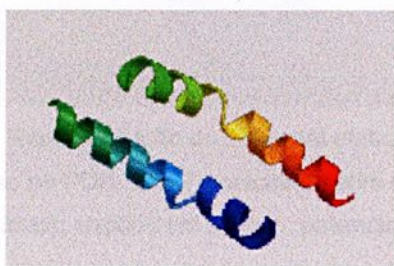


Figura 2. Elementos de estrutura secundária da melitina (código no PDB: 2MLT).

Na estrutura da melitina, os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos estão localizados no lado oposto aos resíduos hidrofílicos. Este peptídeo induz uma vasta gama de atividades bioquímicas, incluindo hemólise de eritrócitos (Bernheiner & Rudy, 1986; Habermann, 1972), pois tem a habilidade de estimular a liberação de fragmentos de membranas de hemácias (Katsu *et al.*, 1988). Devido à semelhança estrutural de alguns mastoparanos com a melitina, propôs-se que os mesmos atuem sobre biomembranas através de um mecanismo similar ao dela (Katsu *et al.*, 1990). A Figura 3 ilustra a superfície molecular da melitina, colorida de acordo com o potencial eletrostático, usando o programa GRASP (Nicholls *et al.*, 1991). Nesta figura, nota-se claramente a concentração de cargas positivas (cor azul) em um dos lados da molécula.

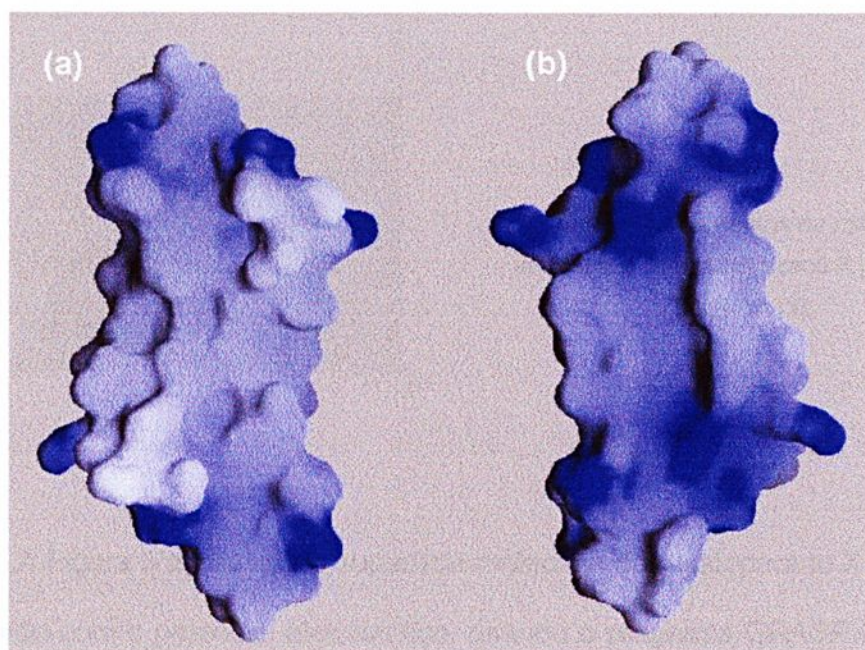


Figura 3. Representação do potencial eletrostático de superfície molecular da melitina (código de acesso no PDB: 2MLT), calculado com o programa GRASP. Regiões em azul: potenciais positivos; regiões em branco: potenciais neutros. **(a)** vista frontal e **(b)** vista dorsal.

A estrutura do mastoparano B de *Vespa basalis*, em solução, também indicou a presença de uma α -hélice anfifílica entre os resíduos 3 a 14, com os resíduos hidrofílicos Lys-4, Ser-5, Ser-8, Lys-11 e Lys-12 localizados de um lado e os resíduos hidrofóbicos Leu-3, Ile-6, Trp-9, Ala-10, Val-13 e Leu-14 localizados do outro lado da molécula (Chuang *et al.*, 1996).

Tanto os resultados estruturais de melitina, quanto de mastoparano B são similares aos observados para a estrutura em solução do mastoparano X (código no PDB: 1A13), isolado de *Vespa xanthoptera* (Wakamatsu *et al.*, 1992; Kusunoki *et al.*, 1998), ilustrada na Figura 4. No PDB (*Protein Data Bank*), está depositada a estrutura deste mastoparano X ligado à proteína-G, resolvida por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

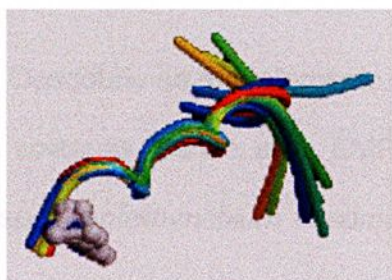


Figura 4. Elementos de estrutura secundária do mastoparano X (código no PDB: 1A13).

A Figura 5 apresenta a superfície molecular do mastoparano X colorida de acordo com o potencial eletrostático, usando o programa GRASP (Nicholls *et al.*, 1991). É ilustrada a concentração de cargas positivas (cor azul) em um dos lados da molécula.

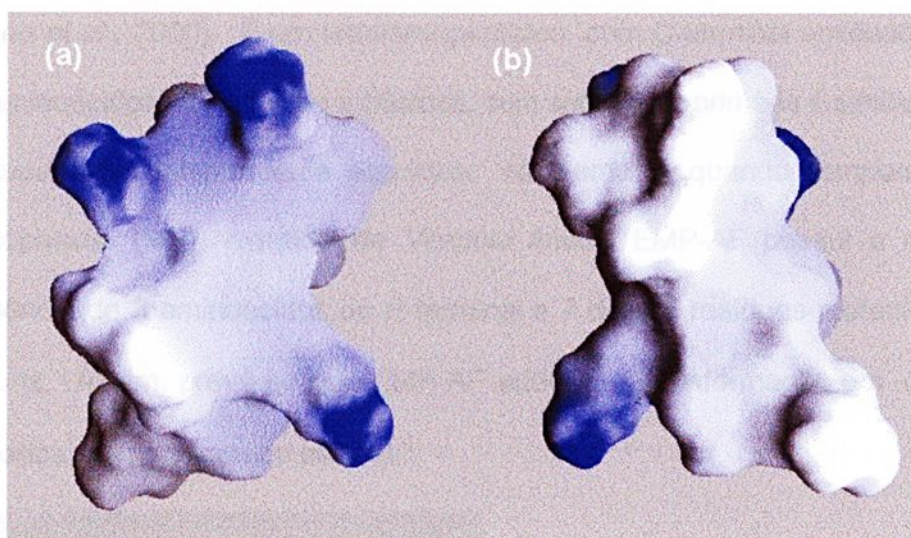


Figura 5. Representação do potencial eletrostático de superfície do mastoparano X (código de acesso no PDB: 1A13), calculado com o GRASP. Regiões em azul: potenciais positivos; regiões em branco: potenciais neutros. **(a)** vista frontal e **(b)** vista dorsal.

MASTOPARANOS ISOLADOS DE VESPAS SOLITÁRIAS

Descobriu-se recentemente a presença de mastoparanos no veneno de vespas solitárias, dentre eles, EMP-AF e Anoplin, extraídos respectivamente das vespas *Anterhynchium flavomarginatum micado* e *Anoplius samariensis*. Experimentos bioquímicos realizados com esses mastoparanos indicaram que a sequência primária, estrutura e atividade biológica dos mesmos, incluindo degranulação de mastócitos, são parecidas com as apresentadas pelos peptídeos anfipáticos inflamatórios de himenópteros sociais (Konno *et al.*, 2000; Nakajima, 1984).

EMP-AF, conhecido como eumenine mastoparano-AF, é o principal peptídeo que compõem o veneno extraído da vespa *Anterhynchium flavomarginatum micado* (Figura 6), a vespa solitária mais abundante do Japão

(Konno *et al.*, 2000). É um tetradecapeptídeo, com C-terminal amidado e rico em aminoácidos hidrofóbicos e básicos, cuja sequência primária é similar a dos mastoparanos anteriormente descritos. Na verdade, quando comparado ao mastoparano (MP), extraído de *Vespula lewisii*, EMP-AF possui a mesma sequência de 3 aminoácidos do N-terminal e 7 dos 11 resíduos restantes são comuns. Assim, prevê-se que EMP-AF adote uma conformação em α -hélice anfipática, como acontece para MP.



Figura 6. A vespa *Anterhynchium flavomarginatum* micado com uma lagarta paralisada (Cortesia do Dr. K. Konno).

Além de EMP-AF, outros três análogos, EMP-AF1~3, foram isolados do veneno de *Anterhynchium flavomarginatum* micado, provavelmente devido à digestão enzimática, durante a estocagem das vespas coletadas e procedimentos de dissecação (Konno *et al.*, 2000). Quando a temperatura aumenta, as enzimas contidas no veneno podem clivar EMP-AF, resultando nos peptídeos EMP-AF1~3, com N-terminal truncado e/ou C-terminal hidroxilado. Os análogos são importantes para a investigação da relação estrutura-função desses mastoparanos. EMP-AF1, possui 14 aminoácidos, como EMP-AF, porém seu C-terminal é hidroxilado. EMP-AF2 e 3 possuem 11 resíduos de aminoácidos, mas apenas o primeiro possui C-terminal carboxiamidado, como EMP-AF.

Similarmente ao EMP-AF, uma conformação secundária em α -hélice anfipática é esperada.

Experimentos bioquímicos realizados com EMP-AF e Anoplin, indicaram que ambos apresentam atividade de degranulação de mastócito, característica dos mastoparanos isolados de veneno de vespas sociais.

A Figura 8 mostra as estruturas em α -hélice anfipáticas previstas para mastoparano, EMP-AF e Anoplin.

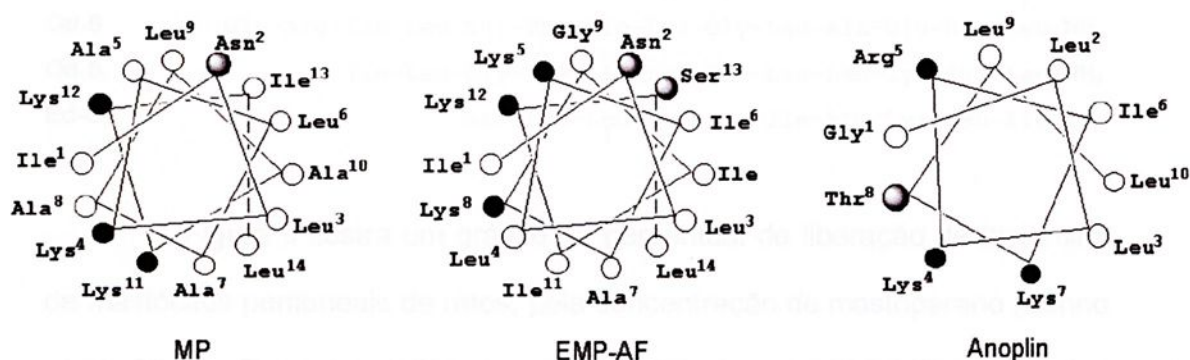


Figura 8. Estrutura secundária prevista dos Mastoparanos

(● resíduos hidrofílicos; ○ resíduos hidrofóbicos).

Outros mastoparanos extraídos do veneno de vespas solitárias são: EMP-EM1~4, extraídos de *Eumenes micado*, EMP-ER, extraído de *Eumenes rubronotatus*, Eu-5 e Eu-6, ambos extraídos de *Eumenes rubrofemoratus*, Ef-10 e Ef-11, de *Eumenes fraterculus*, Ed-6, isolado de *Oreumenes decoratus*, e Od-6 e Od-8, extraídos de *Orancistroceros drewseni*. As seqüências primárias desses peptídeos são apresentadas à seguir (preto: resíduos hidrofóbicos;

azul: resíduos carregados positivamente; vermelho: resíduos carregados negativamente; verde: resíduos polares).

EMP-EM 1	Leu-Lys-Leu-Met-Gly-Ile-Val-Lys-Lys-Val-Leu-Gly-Ala-Leu-NH ₂
EMP-EM 2	Leu-Lys-Leu-Leu-Gly-Ile-Val-Lys-Lys-Val-Leu-Gly-Ala-Leu-NH ₂
EMP-EM 3	Phe-Asp-Ile-Gly-Ile-Ile-Ile-Lys-Lys-Val-Val-Ser-Gly-Leu-NH ₂
EMP-EM 4	Phe-Asp-Leu-Gly-Ile-Ile-Ile-Lys-Lys-Val-Val-Ser-Gly-Leu-NH ₂
EMP-ER	Leu-Asn-Leu-Lys-Gly-Ile-Phe-Lys-Lys-Val-Ala-Ser-Leu-Leu-Thr
Eu-5	Leu-Asn-Leu-Lys-Gly-Leu-Ile-Lys-Lys-Val-Ala-Ser-Leu-Leu-NH ₂
Eu-6	Phe-Asp-Ile-Met-Gly-Leu-Ile-Lys-Lys-Val-Ala-Gly-Ala-Leu-NH ₂
Ef-10	Leu-Asn-Leu-Lys-Gly-Leu-Phe-Lys-Lys-Val-Ala-Ser-Leu-Leu-NH ₂
Ef-11	Phe-Asp-Val-Met-Gly-Ile-Ile-Lys-Lys-Ile-Val-Ser-Ala-Leu-NH ₂
Od-6	Gly-Arg-Ile-Leu-Ser-Phe-Ile-Lys-Gly-Leu-Ala-Glu-His-Leu-NH ₂
Od-8	Ile-Leu-Gly-Ile-Ile-Thr-Ser-Leu-Leu-Lys-Ser-Leu-NH ₂
Ed-6	Ser-Leu-Leu-Ser-Leu-Ile-Arg-Lys-Leu-Ile-Thr

A Figura 9 ilustra um gráfico do percentual de liberação de histamina de mastócitos peritoneais de ratos, pela concentração de mastoparano (Konno *et al.*, 2000). Por este gráfico, é possível inferir que o poder inflamatório dos peptídeos isolados de vespas solitárias (Anoplin e EMP-AF, por exemplo) é proporcional ao apresentado pelos mastoparanos extraídos de vespas sociais (MP, por exemplo).

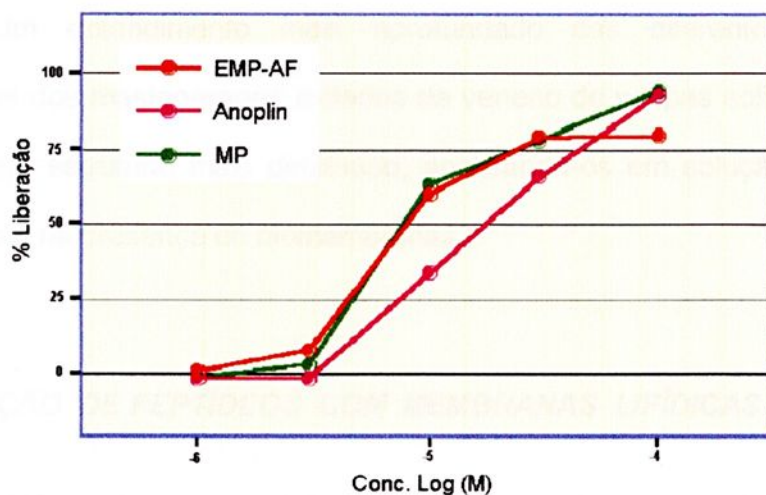


Figura 9. Gráfico da liberação de histamina devido à ação dos mastoparanos sobre mastócitos.

EMP-AF é tão potente quanto MP e Anoplin apresenta um potencial 2/3 menor que o apresentado por MP (Konno *et al.*, 2000).

Já a Figura 10 apresenta um gráfico da atividade hemolítica dos mastoparanos sobre eritrócitos humanos (Konno *et al.*, 2000). Nota-se que EMP-AF possui potencial de hemólise celular proporcional a de MP e maior que de Anoplin.

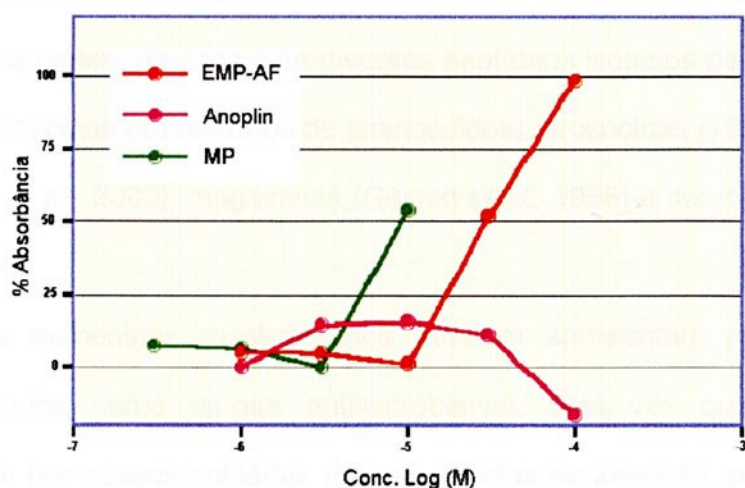


Figura 10. Gráfico da absorbância medida como consequência da quebra de eritrócitos humanos pelos mastoparanos. EMP-AF apresenta um potencial 1/3 menor que MP e Anoplin praticamente não apresenta atividade hemolítica (Konno *et al.*, 2000).

Um entendimento mais aprofundado das diferentes atividades biológicas dos mastoparanos isolados de veneno de vespas solitárias, requer um estudo estrutural mais detalhado, analisando-os em solução, no estado cristalino e na presença de biomembranas.

INTERAÇÃO DE PEPTÍDEOS COM MEMBRANAS LIPÍDICAS

Vários organismos, tais como fungos, plantas, insetos, anfíbios e mamíferos, incluindo os seres humanos, produzem peptídeos anfifílicos que possuem atividade antibacteriana, anti-fúngica, hemolítica, anti-virótica e anti-tumoral. Mesmo bactérias possuem peptídeos antibacterianos, neste caso, contra bactérias especificamente competidoras (Baba & Schneewind, 1998).

As indústrias farmacêuticas vêm mostrando grande interesse no estudo destes peptídeos, principalmente devido ao aparecimento das superbactérias, resistentes aos antibióticos sintéticos disponíveis no momento. Entre os novos potenciais agentes, destacam-se diversos peptídeos isolados de venenos, tais como, apidaecinas (18 resíduos de aminoácidos), drosocinas (19 aminoácidos) (Otvoš Jr. *et al.*, 2000), magaininas (Gibson *et al.*, 1986) e cecropinas (Steiner *et al.*, 1981).

Os eumeníneos mastoparanos também apresentam potencial para serem usados como drogas antimicrobianas, uma vez que, as presas capturadas por vespas solitárias não são mortas de imediato, permanecendo paralisadas até servirem de alimento para as larvas da vespa (Konno *et al.*,



2000). Isto indica que o veneno das mesmas também possui componentes antimicrobianos que impedem a decomposição dos animais capturados.

A necessidade de se compreender o mecanismo de ação destes peptídeos, abriu um vasto campo para pesquisas das estruturas secundárias e terciárias, e também das funções desses compostos, tanto em meio aquoso, como ligados a membranas-modelo ou biológicas, objetivando a produção de novas drogas (Ibrahim *et al*, 2000).

Geralmente peptídeos antimicrobianos possuem uma estrutura anfifílica, com uma superfície altamente hidrofóbica e outra, hidrofílica. Porém, a classificação dos mesmos é bastante complicada, uma vez que existem peptídeos análogos, ou seja, com seqüências de aminoácidos parecidas, que possuem diferentes conformações, podendo ou não atuar pelo mesmo mecanismo (Epand & Vogel, 1999). Exemplos deste comportamento são a dermaseptina S4 (Ghosh *et al.*, 1997) e a cecropina LL-37 (Oren *et al.*, 1999) que, apesar de possuírem várias cargas positivas, ligam-se e penetram em vesículas compostas por fosfolípidos zwitteriônicos ou por fosfolípidos carregados negativamente.

O mesmo ocorre com peptídeos líticos. O fato de diastereômeros (possuem tanto L- quanto D-aminoácidos) de peptídeos líticos, apesar de possuírem uma estrutura anfipática alterada, serem capazes de provocar lise bacteriana, similarmente aos seus análogos formados apenas por L-aminoácidos, sugere que uma conformação helicoidal desse tipo não é necessária para a atividade (Shai, 1999).



Os peptídeos podem tanto estabilizar, quanto desestabilizar membranas (Epand *et al.*, 1995). É a desestabilização que leva à lise celular e é consequência de uma mudança na curvatura da bicamada. Peptídeos desestabilizadores de membranas causam uma perturbação na estrutura das mesmas por um aumento na tensão de curvatura. Já a estabilização de membranas parece ser uma consequência da diminuição da tensão negativa de curvatura da monocamada (Epand *et al.*, 1995).

As consequências da incorporação de hélices anfipáticas nas propriedades da membrana é dependente, ao menos em parte, do tamanho e da distribuição de cargas da face hidrofílica da hélice (Segrest *et al.*, 1990) e é muito mais consequência do arranjo conformacional do peptídeo na membrana, do que efeito do peptídeo nas propriedades da bicamada.

Uma vez que vários peptídeos possuem carga líquida positiva, tem-se levantado a hipótese de que seu modo de ação deva envolver a ligação a moléculas carregadas negativamente, o que inclui os fosfolipídeos das membranas. Essa ligação pode ser, então, devido a interações eletrostáticas ou hidrofóbicas, regidas pelo caráter anfifílico dos peptídeos, provocando a formação de canais ou de poros iônicos que atravessam a membrana, ou ocorrendo de forma paralela à membrana. Em ambos os casos, provoca um distúrbio letal no empacotamento dos lipídeos (Epand *et al.*, 1995).

Vários mecanismos foram propostos para descrever os passos detalhados envolvidos na permeabilização de membranas por peptídeos. Os principais são: modelo "barril" e modelo "carpete".



No modelo de barril (Yang *et al.*, 2001; Shai, 1999) ocorre a formação de poros ou canais transmembrânicos, pela associação de α -hélices anfipáticas (ou até mesmo folhas- β), de tal forma que a superfície hidrofóbica do peptídeo interaja com a região central, também hidrofóbica, da membrana e a superfície hidrofílica forme um poro aquoso (Figura 11, superior e Figura 12, à direita).

O seguinte critério deve ser preenchido de forma que uma molécula venha a formar um poro transmembrânico: a) ligação de monômeros do peptídeo, na forma de α -hélice, à membrana; b) os monômeros se reconhecem pela baixa densidade que ocorre na membrana; c) inserção da hélice na bicamada lipídica e d) agregação de mais monômeros, aumentando o tamanho do poro.

Uma vez que os peptídeos podem inserir-se no centro hidrofóbico da membrana, é provável que a ligação entre os dois seja feita através de interações hidrofóbicas. Consequentemente, os peptídeos podem se ligar a membranas fosfolipídicas independentemente de suas cargas (Shai, 1999).

Espera-se que esse modelo de ação seja proporcional à concentração do peptídeo, uma vez que, pelo menos 4 moléculas do peptídeo precisam ser agrupadas para formar um poro íon-permeável. O tamanho do poro também depende da concentração do peptídeo. E, por fim, a orientação das hélices depende da razão lipídeo/peptídeo (Epand *et al.*, 1995).



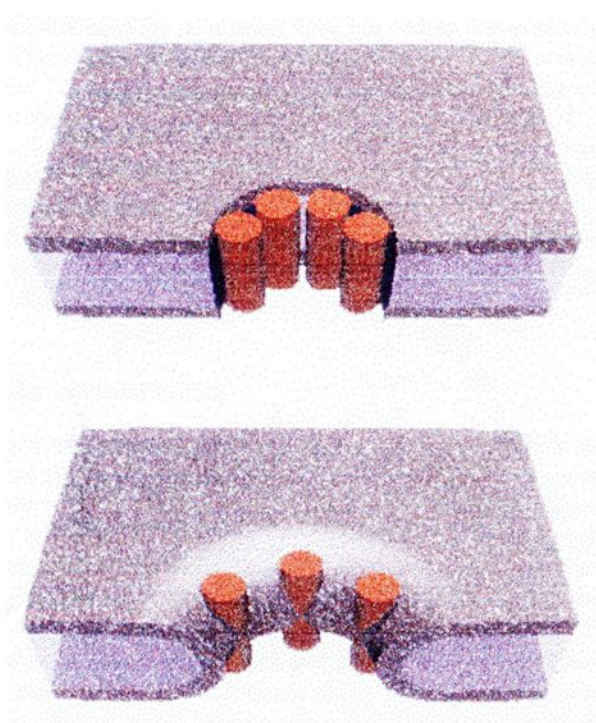


Figura 11. Desenhos esquemáticos do modelo "barril" (*superior*) e "toroidal" (*inferior*). A camada escura simboliza os grupos-cabeça da bicamada lipídica. Os monômeros do peptídeo estão representados pelos cilindros (Yang *et al.*, 2001).

O modelo de barril se aplica ao mecanismo de ação da alameticina (Sansom, 1993, Bechinger, 1999), cujos canais são reproduzíveis e bem definidos.

Alguns peptídeos alinham-se paralelamente à bicamada, o que levou ao surgimento de outros modelos, sendo o principal o modelo de "tapete" ou "carpete" (Pouny *et al.*, 1992; Oren & Shai, 1998; Shai, 1999), apresentado na Figura 12, à esquerda.

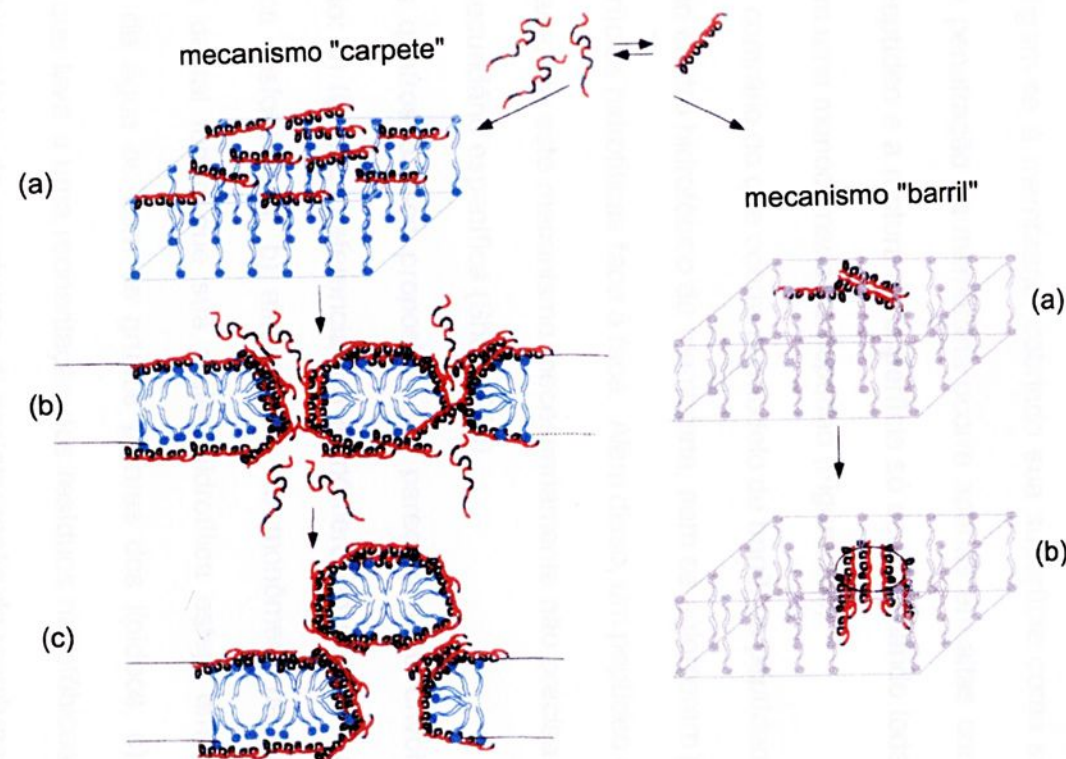


Figura 12. Ilustração dos modelos "barril" (à direita) e "carpete" (à esquerda), sugeridos para a penetração de membranas. No modelo "carpete": **(a)** os peptídeos se ligam a superfície da membrana com suas regiões hidrofóbicas em contato com a membrana e as regiões hidrofílicas, em contato com o solvente; **(b, c)** quando uma concentração limiar de monômeros é atingida, a membrana é rompida. No modelo "barril": **(a)** os peptídeos se agrupam na superfície da membrana; **(b)** se inserem no centro lipídico da membrana e ocorre o recrutamento de monômeros adicionais para a formação do poro permanente (Shai, 1999).

O modelo "carpete" foi proposto inicialmente para descrever o modo de ação de análogos da dermaseptina, cecropina e outros peptídeos antibióticos, e representa uma situação na qual o peptídeo está em contato com o grupo polar dos fosfolípidos durante todo o processo de permeabilização da membrana (Shai, 1999). De acordo com esse modelo, inicialmente os peptídeos ligam-se à membrana, cobrindo sua superfície como se fosse um carpete. A penetração da membrana ocorre apenas em altas concentrações locais de peptídeo e a ruptura da superfície só ocorre quando toda ela estiver coberta com uma monocamada de peptídeo (Figura 13c).

Ao contrário do que ocorre no modelo de barril, os peptídeos não estão inseridos no centro hidrofóbico da membrana, nem se aglomeram para manter suas superfícies hidrofílicas face à face. Além disso, um peptídeo que penetra na membrana, via este mecanismo, necessariamente não precisa adotar uma estrutura secundária específica (Shai, 1999).

Os quatro passos propostos que parecem estar envolvidos neste modelo são: a) ligação preferencial do monômero do peptídeo aos grupos-cabeça dos fosfolípidos; b) alinhamento do monômero na superfície da membrana de tal forma que sua região hidrofílica esteja em contato com moléculas de água ou com os grupos polares dos lipídeos; c) rotação da molécula, que leva a uma reorientação dos resíduos hidrofóbicos em direção do centro hidrofóbico da membrana; d) desintegração da membrana.



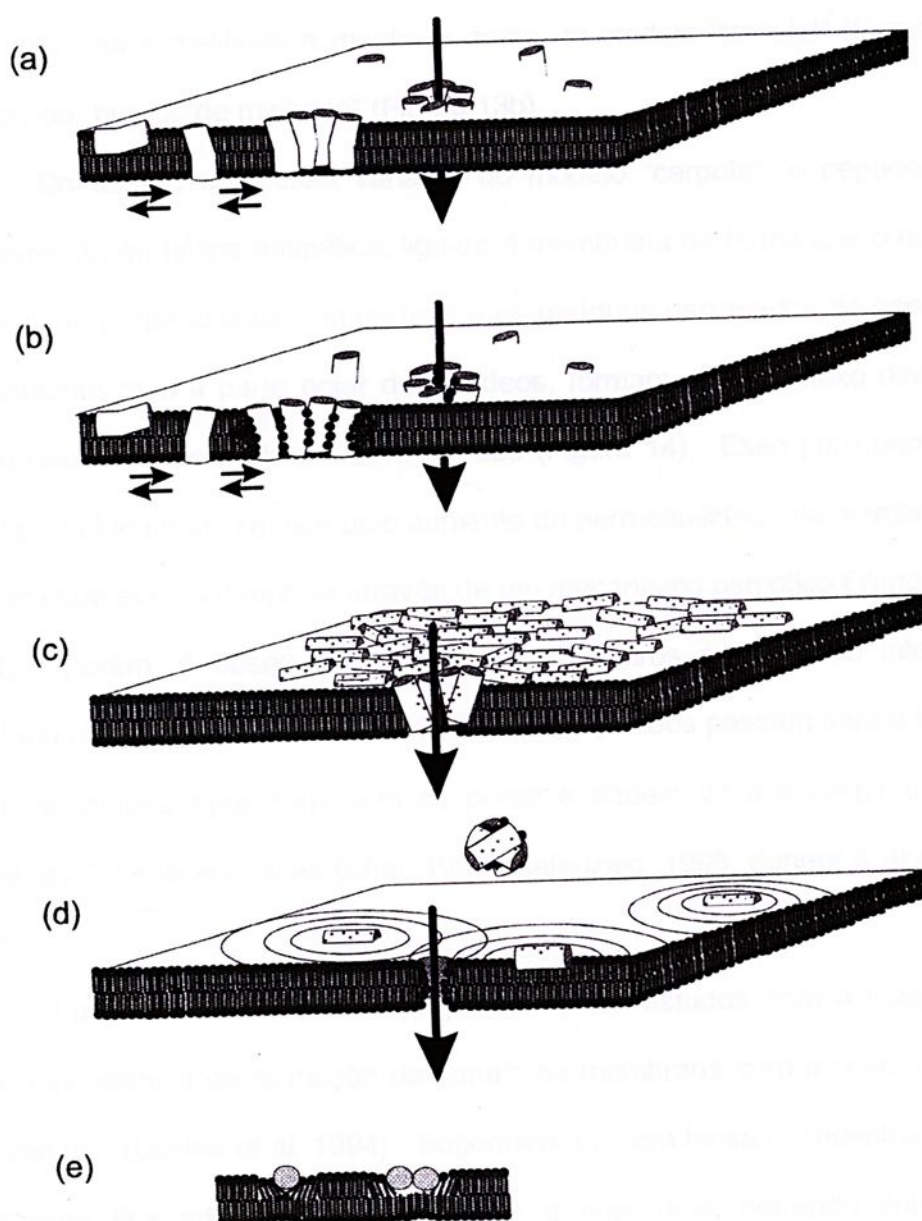


Figura 13. Modelos da interação peptídeo-membrana. **(a)** Hélice transmembrânica; **(b)** Modelo "buraco de minhoca"; **(c)** Modelo "carpete"; **(d)** Modelo da difusão no plano da superfície da bicamada; **(e)** Ilustração da diminuição do empacotamento da bicamada lipídica, devido à inserção de peptídeos (Bechinger, 1999).

Antes do colapso do empacotamento da bicamada pelo mecanismo "carpete", pode ocorrer a formação de poros transientes na membrana, que permitem a passagem de substâncias com baixo peso molecular. A formação de tais poros foi proposta para explicar o mecanismo de ação das magaininas, dermaseptinas e melitinas e recebe o nome de modelo "toroidal" (Figura 11, inferior) ou "buraco de minhoca" (Figura 13b).

De acordo com essa variante do modelo "carpete", o peptídeo, na conformação de hélice anfipática, liga-se à membrana de forma que o eixo da hélice fique perpendicular à superfície e os resíduos carregados do peptídeo, em conjunto com a parte polar dos lipídeos, formam um complexo dinâmico que delinea o interior de um poro aquoso (Figura 14). Esse poro permite a invasão da bicamada lipídica pelo aumento da permeabilidade da membrana e provoca sua eventual ruptura através de um mecanismo osmótico (Yang *et al.*, 2001). Porém, é observado apenas nos primeiros estágios da interação peptídeo-membrana (Epand *et al.*, 1995). Os peptídeos passam para o interior da monocamada após formarem os poros e podem vir a interagir com as proteínas-G citoplasmáticas (Shai, 1994; Matsuzaki, 1998; Kenner & Aboderin, 1971).

Ludtke e colaboradores propuseram, em estudos com a magainina, uma dependência da formação de canais na membrana com a concentração do peptídeo (Ludtke *et al.*, 1994). Sugeriram que, em baixas concentrações, a magainina fica adsorvida paralelamente à superfície, sofrendo flutuações térmicas que promovem o aparecimento esporádico de canais instáveis no



tempo, na forma e no tamanho. E, em altas concentrações, forma canais em maior número e tamanho, provocando lise celular.

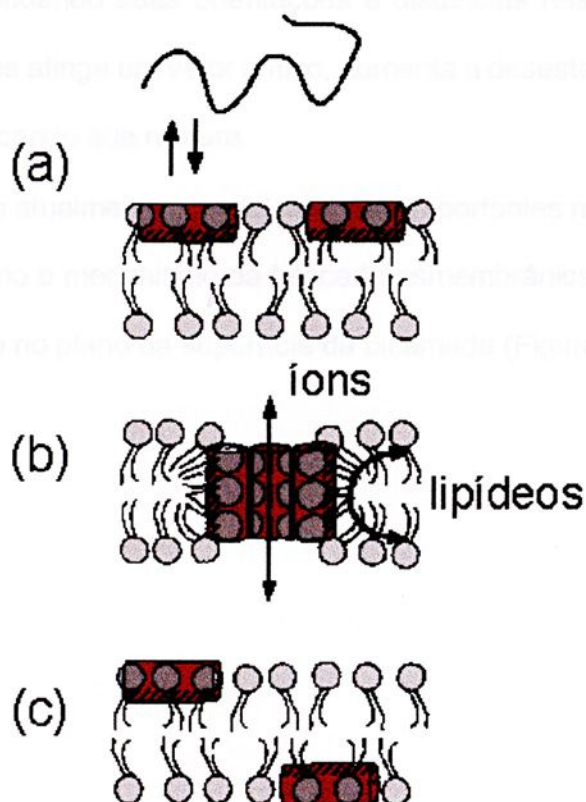


Figura 14. Esquema da formação de um poro transitente (modelo toroidal): **(a)** Ligação do peptídeo à membrana; **(b)** Formação do poro, composto por uma associação entre as moléculas de peptídeo e os grupos polares dos lipídeos; **(c)** Translocação do peptídeo para o interior da bicamada e desintegração do poro (Matsuzaki, 1998).

Bechinger (1997) sugere, baseado em estudos da cecropina, que os peptídeos altamente carregados destroem o empacotamento da bicamada lipídica. Normalmente, os peptídeos ligados difundem-se na membrana continuamente, mudando suas orientações e distâncias relativas. Quando a distância entre eles atinge um valor crítico, aumenta a desestabilização local da membrana, provocando sua ruptura.

Esses são atualmente os modelos mais importantes mas, além desses, temos outros, como o mecanismo da hélice transmembrânica (Figura 13a) e o modelo da difusão no plano da superfície da bicamada (Figura 13d).



OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi o estudo conformacional de mastoparanos, peptídeos extraídos do veneno de vespas solitárias e os principais responsáveis pela atividade farmacológica conferida por estes venenos, incluindo neurotoxicidade e atividades hemolítica, inflamatória e antibacteriana. Dessa forma, fazendo uso de técnicas de difração de raios X, dicroísmo circular e fluorescência, procurou-se fazer um estudo estrutural sistemático a respeito destes peptídeos para, posteriormente, entender-se as bases moleculares de suas diferentes atividades biológicas.

Este projeto tem um caráter multidisciplinar e faz parte de um projeto de pesquisa mais abrangente (CAT-CEPID/FAPESP), que objetiva o estudo estrutural de toxinas e envolve a colaboração do Grupo de Biocristalografia do Departamento de Física, Ibilce-Unesp (www.biocristalografia.df.ibilce.unesp.br) com o CEIS, IB-Unesp, Rio Claro-SP.



MATERIAIS E MÉTODOS

CRISTALIZAÇÃO

Para a determinação da estrutura tridimensional de uma proteína, por técnicas de difração de raios X, é imprescindível a obtenção de monocristais de tamanho apropriado para a coleta de dados. Existem várias técnicas de cristalização de proteínas, todas tendo como objetivo levar a solução da macromolécula biológica a um estado de supersaturação (Giegé & Ducruix, 1992) favorável à formação dos primeiros núcleos cristalinos (agregados organizados da macromolécula). A técnica mais utilizada nos experimentos de cristalização é a difusão de vapor, sendo possíveis pelo menos três implementações desta técnica: gota sentada, gota pendurada e gota sanduíche. O sistema utilizado para a cristalização dos mastoparanos foi difusão de vapor do tipo gota pendurada, como esquematizado na Figura 15.



Figura 15. Representação esquemática do método gota pendurada de difusão de vapor.

Neste método um volume determinado, geralmente 1,0ml, de cada uma das soluções que compõem o método da Matriz esparsa (Jancarick & Kim, 1991), é colocado nos reservatórios da placa de cristalização. As gotas, contendo o peptídeo já dissolvido e a solução de cristalização, são montadas em lamínulas siliconizadas em uma proporção de 1:1. Uma descrição sobre a técnica e os princípios de cristalização são discutidos no Apêndice A.

As amostras liofilizadas dos peptídeos foram fornecidas pelo Prof. K. Konno e Prof. Dr. Mário Sérgio Palma (CEIS, IB-Unesp, Rio Claro). Os mastoparanos submetidos aos experimentos de cristalização foram: Anoplin, EMP-AF e EMP-AF2.

CRISTALIZAÇÃO DO ANOPLIN

Experimentos de cristalização do Anoplin foram realizados usando os métodos já descritos e os primeiros cristais foram obtidos em uma solução contendo 0,1M de Citrato de Sódio, 20% de Isopropanol e 20% de PEG 400, em uma concentração peptídica de 14mg/ml, em 30% de trifluoretanol (TFE).

Tentativas de melhoria dos cristais foram realizadas visando a diminuição da quantidade de núcleos cristalinos e aumento do volume dos mesmos. Para isso, fez-se variações nas soluções de cristalização e do peptídeo.

Após várias modificações, os melhores cristais foram obtidos em gotas contendo 0,1M de Citrato de Sódio, 20% de PEG 400 e 10% de Isopropanol, em uma concentração de peptídeo de 3mg/ml, dissolvido em solução aquosa à 50% de TFE.



CRISTALIZAÇÃO DO EMP-AF

O EMP-AF foi dissolvido em solução aquosa a 50% de TFE. Cristais de EMP-AF se formaram em várias condições de cristalização usando os métodos já descritos, mas os melhores cristais foram obtidos após duas semanas de crescimento, em gotas que continham 2 μ l de solução de EMP-AF à 5mg/ml e 2 μ l de Formiato de Sódio 4,0M.

CRISTALIZAÇÃO DO EMP-AF 2

Este peptídeo é um análogo sintético do EMP-AF, diferindo deste apenas por ter o N-terminal hidrolisado.

Policristais de EMP-AF2, foram obtidos em gotas nas quais o peptídeo, dissolvido em solução aquosa contendo 50% de TFE, a uma concentração de 5mg/ml, foi misturado, em igual proporção, com solução de 0,1M de Acetato de Sódio (pH 4,6) e 2,0M de Formiato de Sódio.

COLETA DE DADOS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X

Estudos preliminares de difração de raios X mostraram que cristais de macromoléculas biológicas degradam-se rapidamente quando expostos ao raio X, à temperatura ambiente. Assim, procurou-se coletar os dados de difração a partir de criocristais congelados à 85K (-188°C), seguindo procedimentos descritos previamente (de Azevedo Jr., Mueller-Dieckmann *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1996; de Azevedo Jr., Leclerc *et al.*, 1997).



Apenas os cristais do Anoplin e EMP-AF foram submetidos aos experimentos de difração de raios X, uma vez que foram os melhores resultados obtidos na cristalização.

Antes do congelamento do cristal de EMP-AF, PEG 400 foi adicionado às gotas de cristalização, para crioproteção.

Os dados de difração de raios X foram coletados a um comprimento de onda de 1,535Å, usando fonte de luz síncrotron (Estação PCr, Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, LNLS, Campinas, Brasil) (Polikarpov, Oliva *et al.*, 1998; Polikarpov, Perles *et al.*, 1998) e placa de imagem MAR de 34,5cm, a uma distância cristal-detector de 150,43mm. Usando uma faixa de oscilação de 20°, 30 imagens foram coletadas e os dados de difração de raios X foram processados a uma resolução de 2,0Å, usando os programas DENZO e SCALEPACK (Otwinowski, 1993). Procedimentos de auto-indexação, combinados com as análises dos padrões de difração e cálculo das médias das intensidades equivalentes, foram usados na caracterização da simetria de Laue.

Valores estimados do volume de Mathews e do conteúdo de solvente do cristal foram calculados segundo a equação:

$$V_M = \frac{V_{\text{cela}}}{Z \cdot \text{PM}} \quad (1)$$

onde V_M é o Volume de Mathews (Mathews descobriu que, para muitos cristais, a razão do volume da cela unitária e o peso molecular estão entre 1,7 e 3,5 Å³/Da), Z é o número de moléculas por cela unitária, PM é o peso molecular da molécula em estudo e V_{cela} é o volume da cela unitária, encontrado a partir da equação 2:



$$V_{\text{cela}} = a.b.c\sqrt{1 - \cos^2 \alpha - \cos^2 \beta - \cos^2 \gamma + 2 \cos \alpha \cos \beta \cos \gamma} \quad (2)$$

sendo a , b , c , α , β e γ os parâmetros da cela unitária.

A densidade do cristal foi calculada segundo a equação 3:

$$\rho = \frac{Z.PM.m_H}{V_{\text{cela}}} + \rho_{\text{solv}} \cdot V_{\text{solv}} \quad (3)$$

onde m_H é $1,673.10^{-24}g$ e ρ_{solv} é a densidade do solvente ($1g/cm^3$).

Os cristais do Anoplin também foram submetidos a experimentos de difração de raios X na Estação de PCr do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron, LNLS, Campinas, Brasil (Polikarpov, Oliva *et al.*, 1998; Polikarpov, Perles *et al.*, 1998), usando técnicas de criocristalografia ou montados nos tubos capilares, mas não produziram dados de difração de raios X.

DICROÍSMO CIRCULAR

Os espectros de dicroísmo circular dos mastoparanos foram obtidos utilizando-se um espectropolarímetro Jasco-710 (JASCO International Co. Ltd., Tokyo, Japan). Foram coletados na região do UV distante, no intervalo de comprimento de onda de 190 à 250nm, à 25°C. A velocidade de varredura foi 20nm/min, utilizando uma largura de banda de 1,0nm, sensibilidade de 20miligraus, tempo de resposta de 1s e 0,1nm de resolução. Os espectros finais foram obtidos a partir da média de 6 acumulações e usou-se cubetas de quartzo de caminho óptico de 0,5cm ou 1cm.

Os espectros foram coletados em várias concentrações de 2,2,2-Trifluoretanol (TFE), adquirido da Merck, Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), da



Pharmacia, e em lipossomos zwitteriônicos e aniônicos, constituídos pelos fosfolípidos PC (L- α -fosfatidilcolina, PM=734) e PG (L- α -fosfatidil-DL-glicerol, PM=745), extraídos de gema de ovo. Alternativamente, foram utilizados os lípidos sintéticos DPPC (dipalmitoil-fosfatidilcolina) e DPPG (dipalmitoil-fosfatidilglicerol). Todos os lípidos foram adquiridos da Sigma Chemical Co. A montagem desses lipossomos será descrita a seguir.

Os mastoparanos foram dissolvidos em tampão Tris (Tris(hidroximetil)aminometano, Merck) 5mM, pH 8,0. Para EMP-AF1, EMP-AF3 e Anoplin, testou-se a dependência da elipticidade pela concentração do peptídeo, na presença de SDS.

Fazendo a correção da linha de base, a elipticidade observada, θ (miligraus), foi convertida em elipticidade molar média, $[\Theta]$ (graus cm²/dmol), usando a relação 4:

$$[\Theta] = \frac{100\theta}{lcn} \quad (4)$$

onde l é o caminho óptico da cubeta em centímetros, c é a concentração do peptídeo em milimolar e n é o número de resíduos do peptídeo.

Assumindo um modelo de dois estados, proposto por Rohl & Baldwin (Rohl & Baldwin, 1998), a elipticidade residual observada em 222nm (Θ_{222}^{obs} em graus cm²/dmol resíduo) foi convertida em porcentagem de α -hélice (f_H) usando a equação 5:

$$f_H = \frac{\Theta_{222}^{obs} - \Theta_{222}^C}{\Theta_{222}^H - \Theta_{222}^C} \quad (5)$$



onde $\Theta_{222}^C = +640$ graus cm^2/dmol resíduo (Rohl & Baldwin, 1998) corresponde à elipticidade em 100% de *random coil* (conformação aleatória). Θ_{222}^H (graus cm^2/dmol resíduo) (Rohl & Baldwin, 1998) corresponde à elipticidade residual para uma estrutura 100% helicoidal e é dada por:

$$\Theta_{222}^H = -42500(1 - (x/n)) \quad (6)$$

onde n é o número de resíduos de aminoácidos e x é o número de grupos carbonila não ligados por pontes de hidrogênio no peptídeo. Usou-se $x=3$ para peptídeos carboxiamidados (EMP-AF, EMP-AF2, Anoplin, EMP-EM1 e EMP-EM2) e $x=4$ para peptídeos não-carboxiamidados (EMP-AF1, EMP-AF3, EMP-ER) (Rohl & Baldwin, 1998).

Alguns detalhes sobre a técnica de dicroísmo circular são apresentados no Apêndice B.

FLUORESCÊNCIA

A espectroscopia de fluorescência foi utilizada para monitorar a liberação de moléculas fluorescentes (5-carboxifluoresceína) de lipossomos, induzida pelos peptídeos. Foi utilizado o fluorímetro Hitashi F4500 (Spectronic Inc., Rochester NY) do Departamento de Química, Ibilce-Unesp. Os espectros de emissão da carboxifluoresceína foram obtidos na região do visível, no intervalo de comprimento de onda de 500 à 600nm, com máxima fluorescência em 520nm. A amostra foi excitada em 490nm e a abertura da fenda de excitação foi de 5nm e de emissão, 2,5nm. A velocidade usada foi 60nm/min e a voltagem da fotomultiplicadora foi 900V.

Nestes experimentos, alíquotas de lipossomos foram adicionadas, sob agitação, a uma solução de peptídeo, cuja concentração inicial era de 10 μ M, dissolvido em tampão Tris 5mM. Os espectros foram coletados em cubetas de quartzo de caminho óptico de 1cm. A composição lipídica dos lipossomos foi 100% de fosfatidilcolina, extraída da gema de ovo. As concentrações de lipídeo variaram de 600 μ M à 900 μ M. Os valores da intensidade de fluorescência foram medidos durante uma hora, em intervalos de 5 minutos, nas proporções de 35 e 10 lipídeos/peptídeo. Após o término de cada medida, adicionou-se 0,1% do detergente Triton X-100, para obter-se a intensidade de fluorescência máxima da carboxifluoresceína encapsulada.

As curvas de liberação de carboxifluoresceína foram apresentadas em termos de porcentagem de liberação máxima pela equação 7:

$$\text{Porcentagem de Liberação (\%)} = \frac{100(F_{\text{pep}} - F_{\text{min}})}{(F_{\text{max}} - F_{\text{min}})} \quad (7)$$

onde F_{pep} é a fluorescência obtida após determinado tempo de observação, na presença do peptídeo, F_{max} é a fluorescência obtida após a adição de Triton X-100 e F_{min} é a fluorescência inicial do lipossomos intactos.

Detalhes sobre a técnica de fluorescência são descritos no Apêndice C.

PREPARO DOS LIPOSSOMOS

Lipossomos são microesferas ocas compostas de uma ou várias bicamadas lipídicas e suas propriedades físico-químicas podem permanecer estáveis de horas e até anos. Essas estruturas são escolhidas para os estudos



de propriedades de sistemas biológicos que envolvem membranas, por mimetizarem sua organização estrutural e algumas de suas funções. A manipulação da composição fosfolipídica e a adição de componentes naturais facilitam o direcionamento e escolha dos métodos experimentais do estudo a ser realizado (New, 1990). Os lipossomos têm sido usados em estudos de sistemas, de proteínas de membranas, transporte de substâncias e de interação de toxinas de membrana (Freer, 1980; Lasic, 1988).

Os lipossomos foram preparados pela técnica de evaporação de fase reversa (Szoka e Papahadjopoulos, 1978), conforme ilustrado na Figura 16. Esta técnica permite a manipulação da composição fosfolipídica da bicamada artificial através da espécie e da razão dos fosfolípeos.

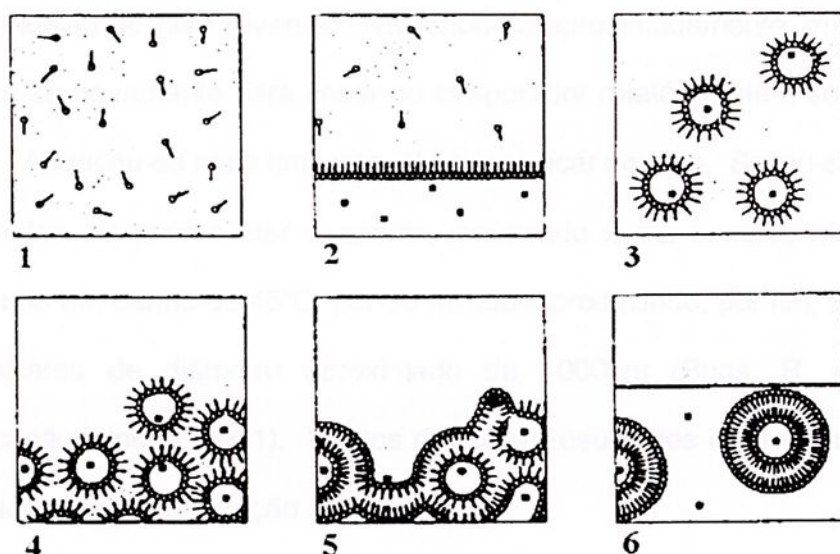


Figura 16. Diagrama representativo da formação de lipossomos pelo método de evaporação de fase reversa. **(1)** Os lipídeos estão dissolvidos em solventes apropriados. **(2)** Fixação na superfície do frasco. **(3)** Formação de micelas na fase reversa. **(4, 5 e 6)** Após a sonicação, os lipossomos são formados pela fusão das micelas.

Os fosfolípidos foram dissolvidos, a uma concentração de 5mg/ml, em éter etílico anidro (Merck) nas seguintes proporções: 100% de PC, no caso de lipossomos neutros, e 70%PC/30%PG, para lipossomos aniônicos. Estes lipossomos mimetizam membranas bacterianas.

As soluções de fosfolípidos foram secas por evaporação rotativa (Evaporador Rotativo MA 120, Marconi, Brasil), à vácuo, por cerca de 15 minutos, aderindo na parede do frasco na forma de um filme. Para ressuspendê-las novamente, adicionou-se 1ml de tampão Tris 25mM, pH 8,0, contendo NaCl 150mM. Sonicou-se em ponta de titânio (Sonicador Virsonic 475, Virtis Co., Inc. NY) por um minuto, no gelo, e depois aqueceu-se o frasco por um minuto, até retorná-lo à temperatura ambiente. Repetiu-se esse processo até o filme de lipossomos descolar-se totalmente do frasco, formando uma emulsão de fase reversa. Adicionou-se aproximadamente 2ml de éter e colocou-se novamente para secar no evaporador rotatório, até a solução ficar densa. Aqueceu-se mais uma vez, até a fase ficar aquosa. Secou-se por mais 10 minutos até todo o éter evaporar, resultando numa camada multilamelar. Deixou-se em banho de 45°C, por 30 minutos, produzindo, por fim, lipossomos unilamelares de diâmetro aproximado de 1000nm (Bugs, R. *exame de qualificação*, Unesp, 2001). Restos de titânio resultantes da sonicação foram removidos por centrifugação.



LIBERAÇÃO DE CARBOXIFLUORESCEÍNA

Para os experimentos de fluorescência, preparou-se uma solução de carboxifluoresceína (5-carboxifluoresceína - $C_{21}H_{12}O_7$ - $PM=376,3$), da Sigma Chemical Co., numa concentração de 50mM, dissolvida em tampão Tris 25mM NaCl 150mM, pH 7,0, que foi encapsulada nos lipossomos de PC e DPPC. Essa solução é acrescentada ao filme de lipídeos antes da sonicação. Para extrair o excesso de carboxifluoresceína, os lipossomos, já contendo a solução encapsulada, são separados, em uma coluna de filtração em gel (Sephadex G-25, 1x10cm), da solução não encapsulada, deixando a amostra pronta para os experimentos de liberação do conteúdo interno.

Quando encapsulada nos lipossomos, a auto-supressão da carboxifluoresceína é grande, devido à transferência de energia entre as moléculas que estão muito próximas. Desta maneira, o sinal de fluorescência é baixo. Quando liberada dos lipossomos, diluindo-se na cubeta, a auto-supressão diminui, devido ao afastamento das moléculas e a intensidade de emissão aumenta cerca de 10 vezes. Ao adicionar-se uma solução contendo o agente que danifica a membrana dos lipossomos, como os mastoparanos, a carboxifluoresceína é liberada e o sinal de fluorescência torna-se mais intenso.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

CRISTALIZAÇÃO DE MASTOPARANOS

A Figura 17 ilustra os cristais do Anoplin obtidos em uma solução contendo 0,1M de Citrato de Sódio, 20% de Isopropanol e 20% de PEG 400, em uma concentração peptídica de 14mg/ml, em 30% de trifluoretanol (TFE). Esses cristais aculiformes não são adequados aos ensaios de difração de raios X, por isso procurou-se melhorá-los, otimizando as condições de cristalização.

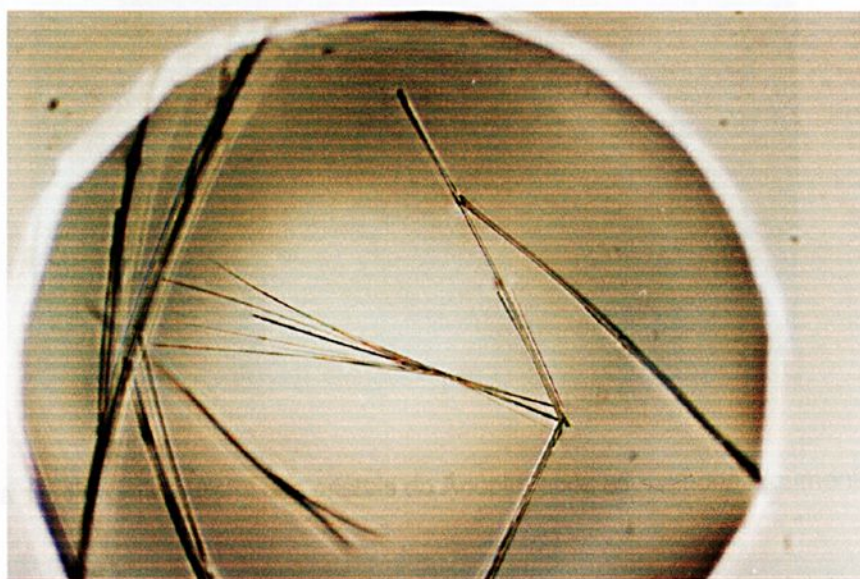


Figura 17. Fotomicrografia dos primeiros cristais do Anoplin (aumento de 134 x).

A Figura 18 ilustra os cristais do Anoplin obtidos após as modificações nas condições de cristalização, visando a melhoria dos resultados. Estes cristais foram obtidos em gotas contendo 0,1M de Citrato de Sódio, 20% de

PEG 400, 10% de Isopropanol e cuja concentração de peptídeo era 3mg/ml, dissolvido em solução aquosa à 50% de TFE. Apresentaram um volume maior, quando comparados aos anteriores e arestas melhor definidas, por isso foram submetidos à coleta de dados de raios X. Entretanto, não resultaram em imagens de difração.

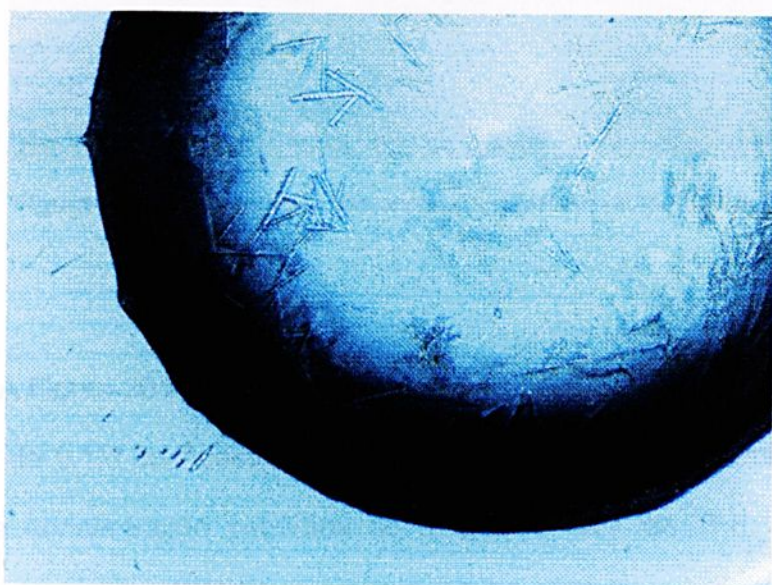


Figura 18. Fotomicrografia dos cristais do Anoplin após as melhorias (aumento de 43 x).

A Figura 19 ilustra os cristais de EMP-AF submetidos aos experimentos de criocristalografia. Foram obtidos em gotas contendo 2 μ l de solução de EMP-AF à 5mg/ml e 2 μ l de Formiato de Sódio 4,0M e, por serem bem formados, possuindo volume suficiente e arestas definidas, foram submetidos aos experimentos de difração de raios X.

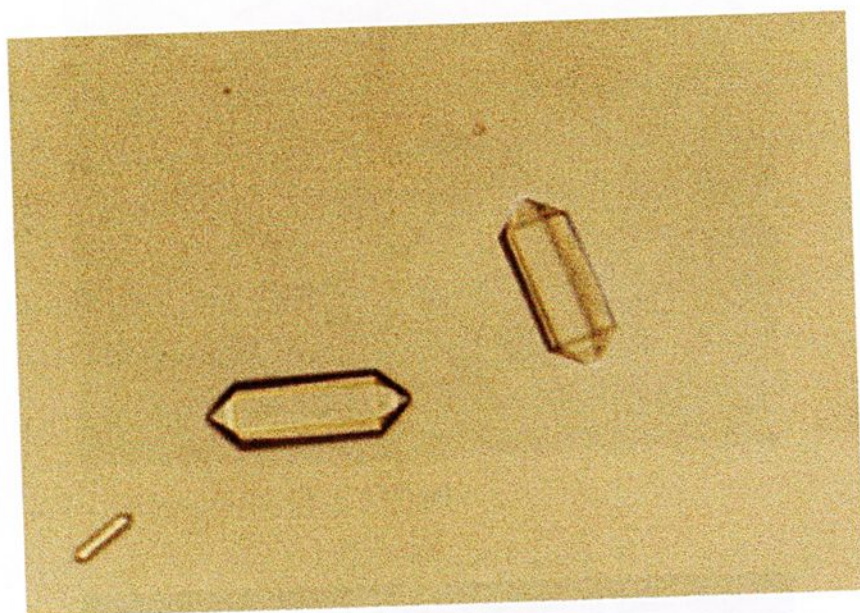
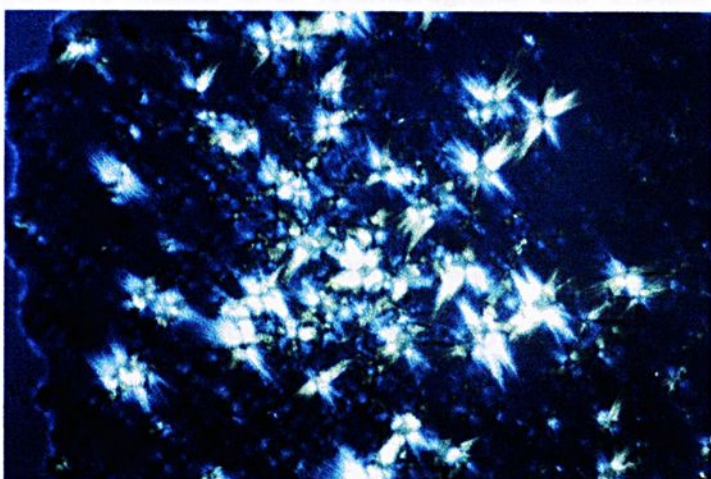


Figura 19. Fotomicrografia dos cristais de EMP-AF (aumento de 134 x).

A Figura 20 ilustra os cristais de EMP-AF 2 obtidos em gotas contendo solução de 0,1M de Acetato de Sódio (pH 4,6) e 2,0M de Formiato de Sódio, em uma concentração peptídica de 5mg/ml à 50% de TFE. Após várias tentativas de melhorias dos resultados, só foram obtidos policristais, os quais não são adequados aos experimentos de difração de raios X, por produzirem imagens superpostas.



(a)



(b)

Figura 20. Fotomicrografias dos cristais de EMP-AF 2 (aumento de 134 x): **(a)** sem polarização da luz; **(b)** com polarização da luz.

COLETA DE DADOS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X

Os cristais do Anoplin (Figura 18) foram submetidos a experimentos de difração de raios X na Estação de PCr do Laboratório Nacional de Luz

Resultados e Discussão

Sincrotron, LNLS, Campinas, Brasil (Polikarpov, Oliva *et al.*, 1998; Polikarpov, Perles *et al.*, 1998), usando técnicas de criocristalografia e também montados nos tubos capilares mas, em ambas técnicas, os cristais não produziram dados de difração. É provável que isto se deva ao fato dos cristais não possuírem um volume adequado. Também pode ser devido a uma desordem cristalina interna, ocorrida durante a formação do cristal. Sem os dados de difração de raios X é impossível resolver a estrutura de uma macromolécula biológica por cristalografia. Assim, procurou-se fazer um estudo conformacional deste peptídeo por técnicas de dicroísmo circular.

A Figura 19 ilustra uma fotomicrografia dos cristais de EMP-AF adequados aos experimentos de difração de raios X, com dimensões médias de 0,1x0,1x0,3mm. Análises preliminares mostraram que o cristal tem simetria de Laue do tipo trigonal primitivo, com parâmetros de cela de $a=43,3\text{\AA}$, $b=43,3\text{\AA}$ e $c=79,9\text{\AA}$. Após o congelamento, os parâmetros de cela diminuíram para $a=42,2\text{\AA}$, $b=42,2\text{\AA}$ e $c=79,9\text{\AA}$, uma redução de 5,02% do volume da cela unitária. Assumindo que a unidade assimétrica contenha 10 moléculas do peptídeo, de peso molecular 1,65kDa cada uma, o valor de V_M será $2,16\text{\AA}^3\text{Da}^{-1}$ (Mathews, 1968). Assumindo um valor de $0,74\text{cm}^3\text{g}^{-1}$ para o volume específico parcial da proteína, o volume de solvente calculado no cristal será de 43,05% e a densidade do cristal será de $1,27\text{gcm}^{-3}$. Estatísticas detalhadas dos dados de difração coletados no sincrotron são mostradas na Tabela 2.

Tentativas de resolver a estrutura de EMP-AF usando a técnica de substituição molecular (Navaza, 1994) não produziram uma solução razoável. É provável que isto se deva à pequena dimensão do modelo de busca, quando



comparado às dimensões da cela unitária. O modelo inicial usado foi o mastoparano X (Figura 4), isolado de *Vespa xanthoptera* (Kusunoki *et al.*, 1998) (código de acesso do PDB: 1A13) resolvido por Ressonância Magnética Nuclear, cujos resíduos foram modificados de acordo com a seqüência do EMP-AF.

Tabela 2. Estatística detalhada dos dados de difração de raios X coletados com fonte síncrotron (LNLS, Campinas).

Faixas de Resolução (Å)	Número de Reflexões Independentes	$I/\sigma(I)$	Redundância	Completeza (%)	Faixa de R_{merge}^1 (%)
10,00-4,33	1022	19,83	2,08	95,7	5,2
4,33-3,44	1052	20,93	2,07	98,8	4,7
3,44-3,00	1049	18,65	2,01	99,5	5,1
3,00-2,73	1059	16,78	2,00	99,0	6,9
2,73-2,53	1050	15,08	1,99	99,4	7,2
2,53-2,38	1053	14,67	1,98	98,3	7,8
2,38-2,26	1038	12,96	1,99	98,1	7,9
2,26-2,17	1062	12,01	1,96	97,5	9,8
2,17-2,08	985	10,25	1,96	96,6	11,8
2,08-2,01	1017	8,01	1,94	95,8	15,4
Total de Reflexões	10387	14,91	2,00	97,9	8,2

¹ $R_{\text{merge}} = 100 \times \sum_{hkl} [\sum_i (|I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle|)] / \sum_{hkl,i} (I_{hkl,i})$, onde $I_{hkl,i}$ corresponde à intensidade de uma medida individual de reflexão com índices h , k e l , e $\langle I_{hkl} \rangle$ corresponde à intensidade significativa desta reflexão.

ANÁLISE DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA POR DICROÍSMO CIRCULAR

A técnica de CD é muito usada nos estudos da estrutura secundária de proteínas e de peptídeos devido à sua alta sensibilidade, permitindo estimar a presença de α -hélices, folhas- β , bem como, estruturas desordenadas, seja em

Resultados e Discussão

solução aquosa, contendo um solvente específico ou, ainda, na presença de membranas-modelo.

Estudos prévios de CD mostraram que os mastoparanos tendem a adotar uma estrutura aleatória, com uma única banda negativa em 196nm, em solução tampão. Quando é introduzido solução aquosa de TFE, ou na presença de bicamadas fosfolipídicas, essa banda fica positiva e surgem duas bandas negativas, em 208nm e 220nm, e uma banda positiva à 195nm, indicando mudança conformacional de estrutura aleatória para uma estrutura rica em α -hélice (Chuang *et al.*, 1996). Os espectros característicos das estruturas secundárias são apresentados na Figura 21.

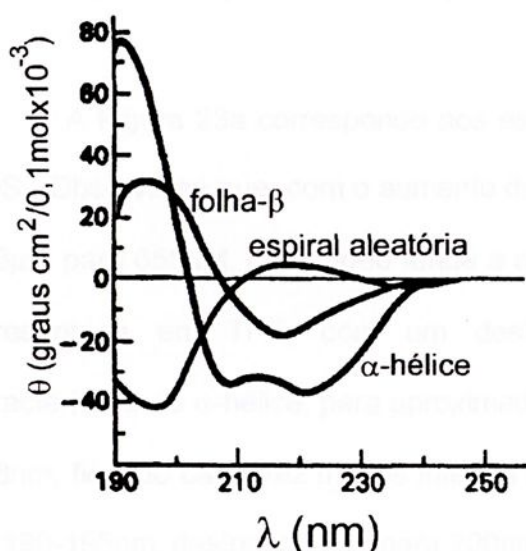


Figura 21. Espectros de CD das estruturas secundárias.

ESPECTROS DE CD DE EMP-AF

Na Figura 22 são apresentados os espectros de CD de EMP-AF em várias concentrações de TFE. Nessas condições, o máximo de fração de α -hélice obtida foi 57%, em 30% (4,5M) de TFE. Em tampão Tris, este peptídeo

adota uma conformação aleatória, também evidenciada pelo espectro contido na Figura 22.

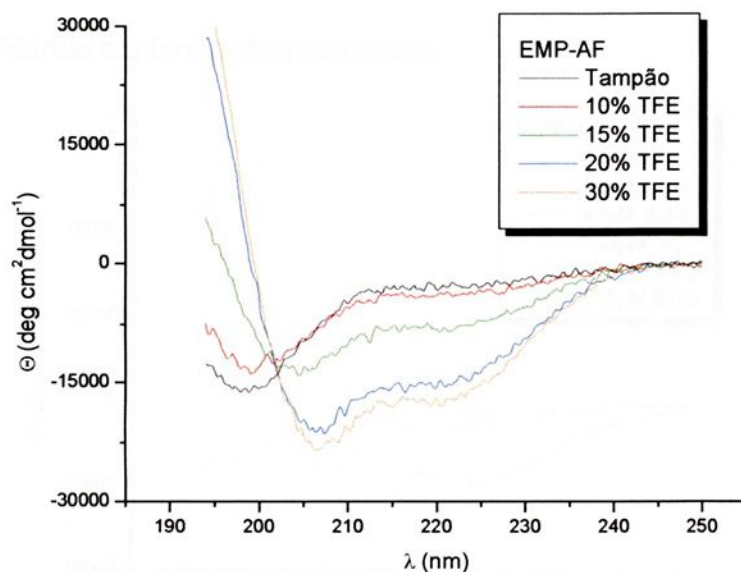
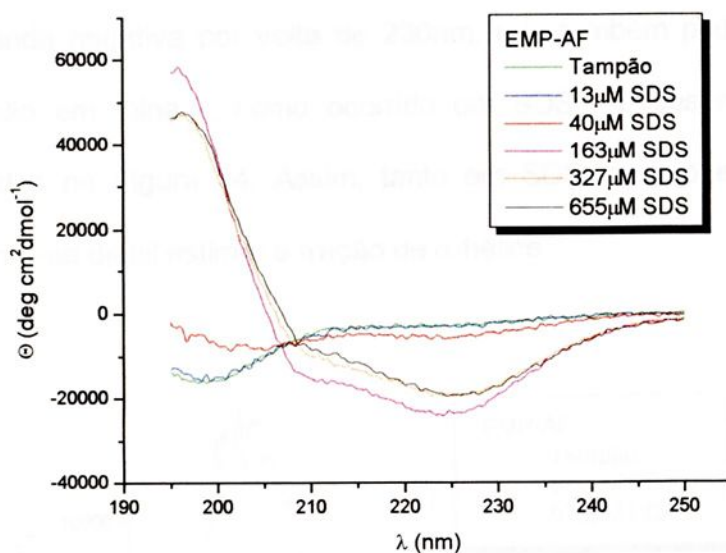


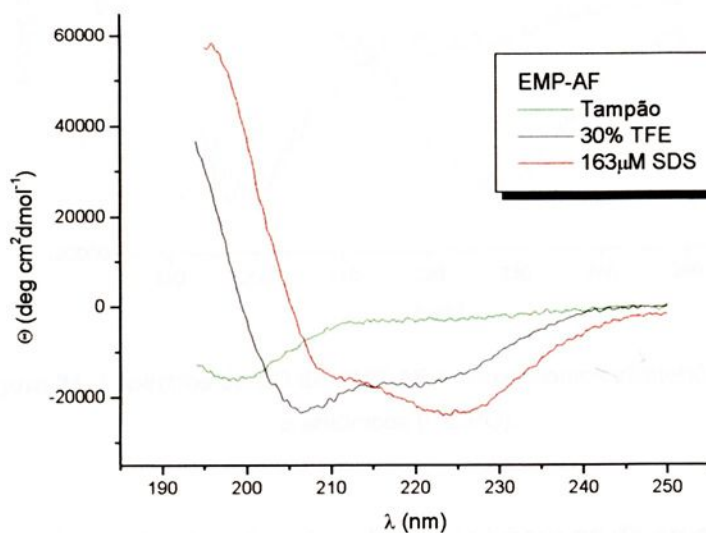
Figura 22. Espectros de CD de EMP-AF em várias concentrações de TFE.

A Figura 23a corresponde aos espectros de EMP-AF na presença de SDS. Observa-se que, com o aumento da concentração deste surfactante, de 163 μM para 655 μM , o peptídeo tende a adotar uma conformação diferente da apresentada em TFE, com um deslocamento da banda de 222 nm, característica de α -hélice, para aproximadamente 228 nm, a banda negativa de 208 nm, ficando cada vez menos intensa (menos negativa) e a banda positiva de 190-195 nm, deslocando-se para 200 nm. Este espectro é semelhante ao de uma proteína que contém apenas folhas- β (espectro padrão apresentado na Figura 21). Outra possibilidade seria distorção do espectro de α -hélice devido ao processo de n-merização. Considerando que, dificilmente, estes peptídeos estejam orientados em SDS, pois a concentração de SDS é cerca de 15 vezes menor que a da cmc (Bugs, R. *exame de qualificação*, Unesp, 2001), os dados

sugerem que o processo de n-merização induz formação de estrutura β . A Figura 23b evidencia o deslocamento dos espectros de EMP-AF em TFE e SDS, indicando conformações diferentes.



(a)



(b)

Figura 23. Espectros de CD de EMP-AF: (a) em várias concentrações de SDS; (b) nos máximos de TFE e SDS.

Em 970 μ M de lipossomos zwitteriônicos (PC), EMP-AF adota uma conformação contendo apenas 14% de fração de α -hélice. Já na presença da mesma concentração de PC/PG (3:1), o espectro do peptídeo mostra uma intensa banda negativa por volta de 230nm, que também pode indicar uma conformação em folha- β , como ocorrido em SDS. Esses resultados são apresentados na Figura 24. Assim, tanto em SDS, quanto em lipossomos ácidos, torna-se difícil estimar a fração de α -hélice.

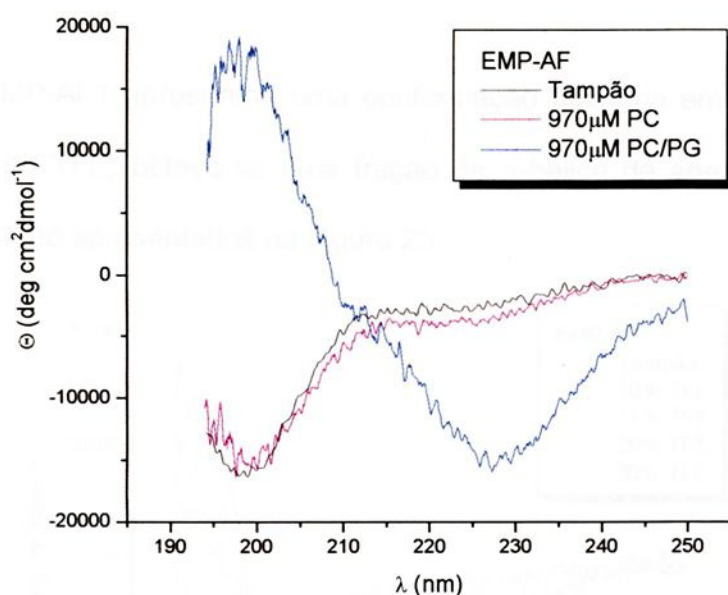


Figura 24. Espectros de CD de EMP-AF em lipossomos zwitteriônicos (PC) e aniônicos (PC/PG).

Os valores das frações de α -hélice (f_H) para as diversas concentrações de EMP-AF encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3. Frações α -hélice de EMP-AF obtidas em diversas condições.

	[EMP-AF]	Θ_{222}^{obs}	f_H^*
Tampão	7,0 μ M	-2785	10%
30% TFE	7,0 μ M	-18588	57%
163 μ M SDS	7,0 μ M	ND	folha- β (?)
970 μ M PC	9,4 μ M	-4132	14%
970 μ M PC/PG	9,4 μ M	ND	folha- β (?)

* Obtida através da equação 5, página 37.

ESPECTROS DE CD DE EMP-AF1

EMP-AF1 apresentou uma conformação aleatória em tampão Tris e, em 30% de TFE, obteve-se uma fração de α -hélice de apenas 23%, cujos espectros são apresentados na Figura 25.

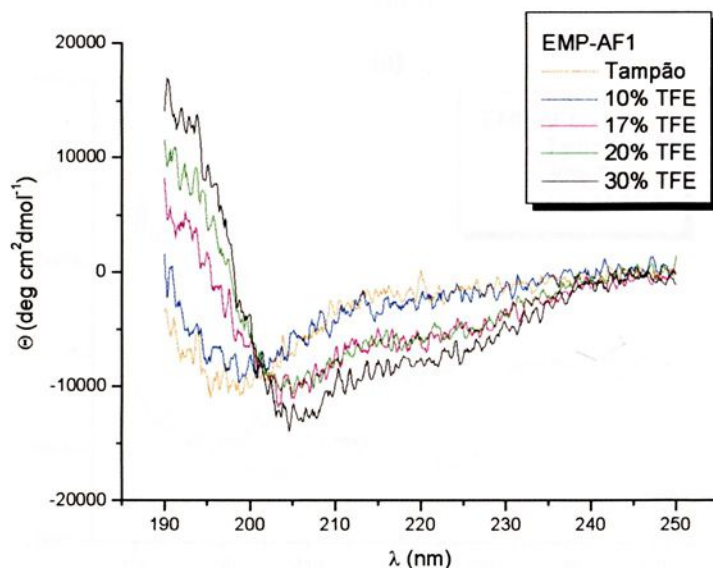


Figura 25. Espectros de CD de EMP-AF1 em várias concentrações de TFE.

Os espectros deste peptídeo em SDS também indicaram um deslocamento da banda de 222nm em direção à 230nm, como ocorrido para EMP-AF, impossibilitando a estimativa de α -hélice nesta situação (Figura 26a). Esse comportamento fica mais evidente na Figura 26b, que apresenta os espectros nos máximos de TFE e SDS.

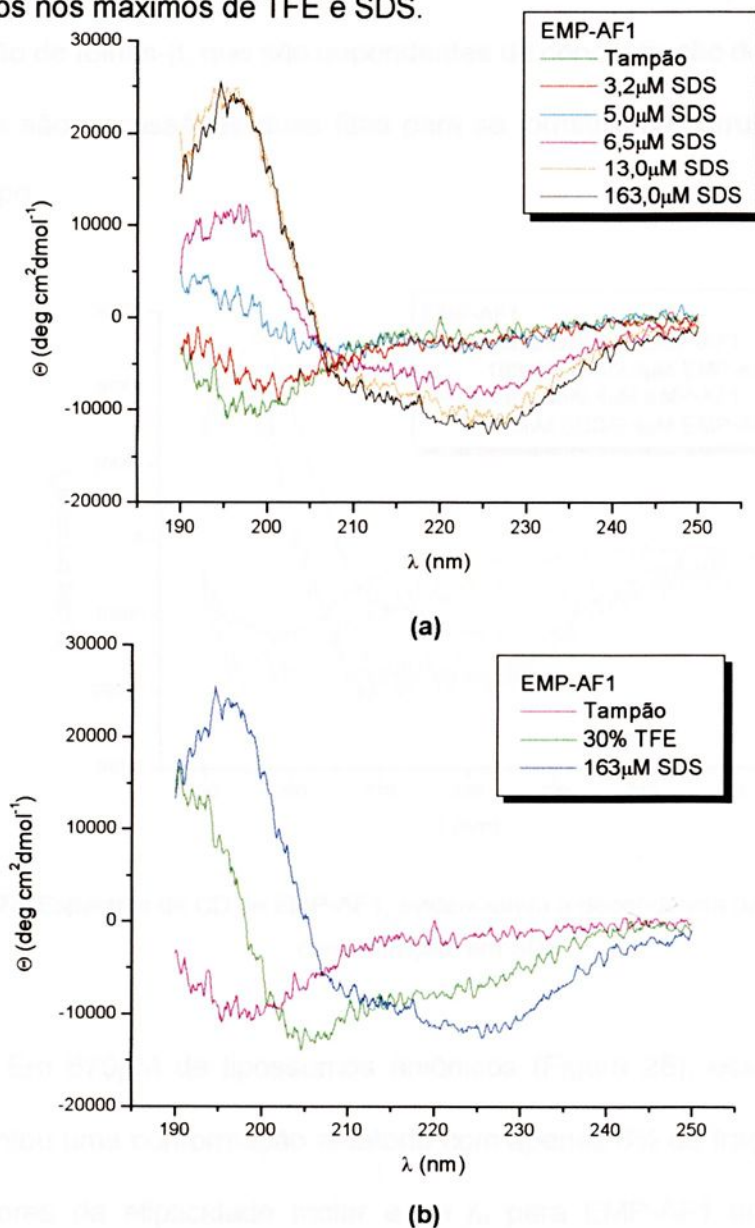


Figura 26. Espectros de CD de EMP-AF1: **(a)** em várias concentrações de SDS; **(b)** em TFE e SDS.

A Figura 27, a seguir, mostra que EMP-AF1 possui uma dependência da elipticidade pela concentração, na presença de SDS. Em duas concentrações diferentes deste peptídeo (2,3 μ M e 9,4 μ M) os espectros mudam significativamente, o que sugere um processo de n-merização e/ou ainda a formação de folhas- β , que são dependentes da concentração do peptídeo, uma vez que são necessárias duas fitas para se formar uma estrutura secundária deste tipo.

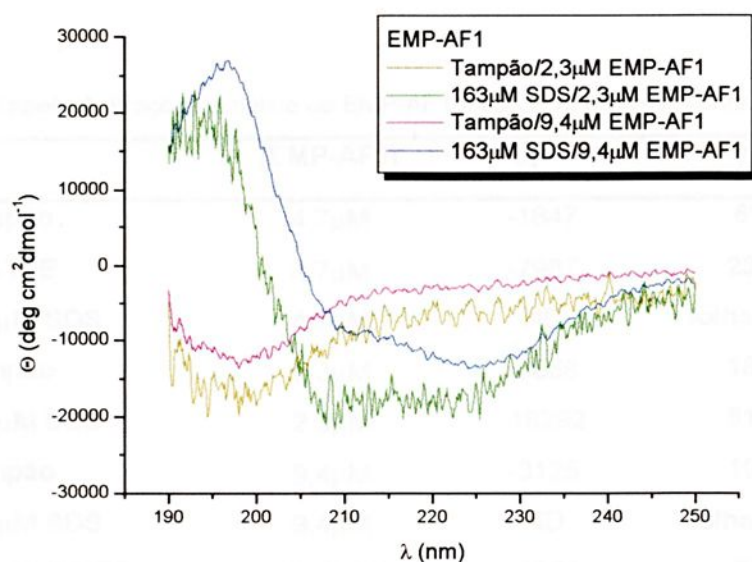


Figura 27. Espectros de CD de EMP-AF1, evidenciando a dependência da elipticidade pela concentração, em SDS.

Em 670 μ M de lipossomos aniônicos (Figura 28), esse mastoparano apresentou uma conformação aleatória com apenas 6% de fração de α -hélice. Os valores da elipticidade molar e de f_H para EMP-AF1 encontram-se na Tabela 4.

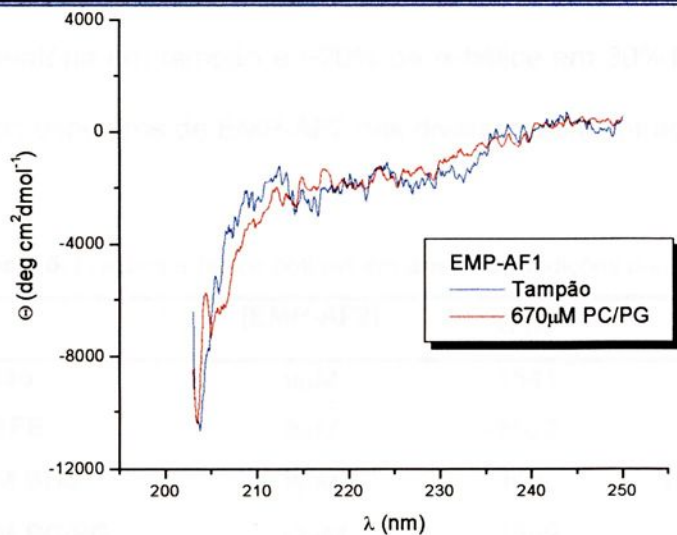


Figura 28. Espectros de CD de EMP-AF1 na presença de lipossomos ácidos.

Tabela 4. Frações α -hélice de EMP-AF1 obtidas em diversas condições.

	[EMP-AF1]	Θ_{222}^{obs}	f_H^*
Tampão	4,7 μ M	-1847	6%
30% TFE	4,7 μ M	-7987	23%
163 μ M SDS	4,7 μ M	ND	folha- β (?)
Tampão	2,3 μ M	-6068	18%
163 μ M SDS	2,3 μ M	-18292	51%
Tampão	9,4 μ M	-3125	10%
163 μ M SDS	9,4 μ M	ND	folha- β (?)
670 μ M PC/PG	10,0 μ M	-1664	6%

* Obtida através da equação 5, página 37.

ESPECTROS DE CD DE EMP-AF2

Todos os valores de elipticidade molar e as frações de α -hélices obtidos para EMP-AF2 estão expostos na Tabela 5. EMP-AF2 apresentou

estrutura aleatória em tampão e ~20% de α -hélice em 30% TFE. A Figura 29 apresenta os espectros de EMP-AF2 nas diversas concentrações de TFE.

Tabela 5. Frações α -hélice obtidas em diversas condições para EMP-AF2.

	[EMP-AF2]	Θ_{222}^{obs}	f_H^*
Tampão	9 μ M	-1541	7%
30% TFE	9 μ M	-5522	20%
163 μ M SDS	9 μ M	ND	folha- β (?)
670 μ M PC/PG	12 μ M	-1389	7%

* Obtida através da equação 5, página 37.

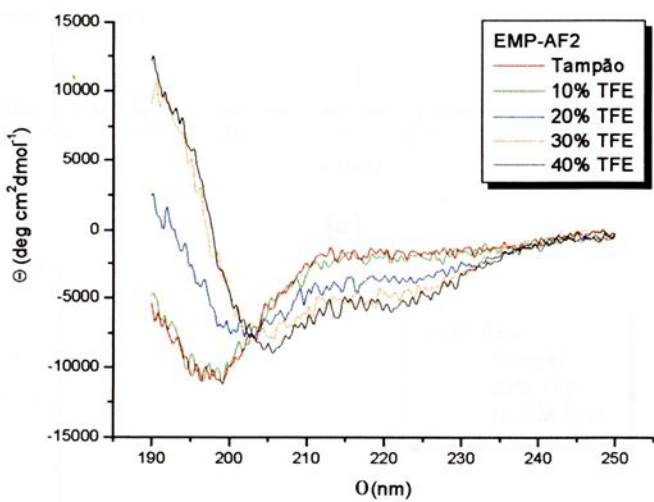
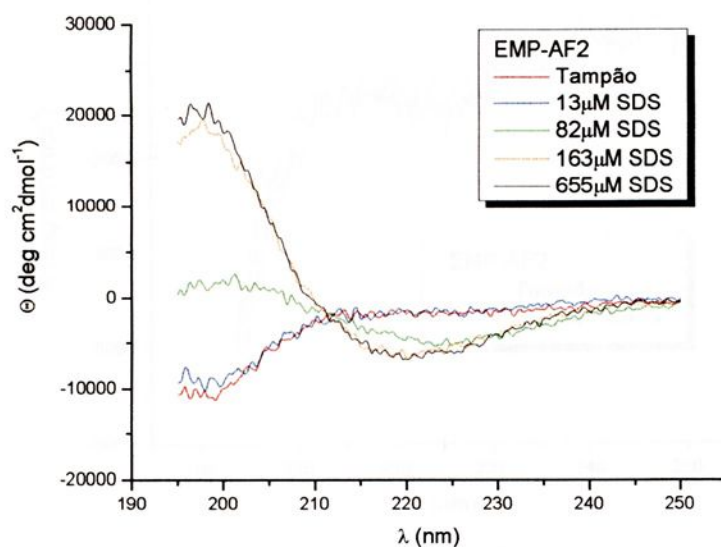


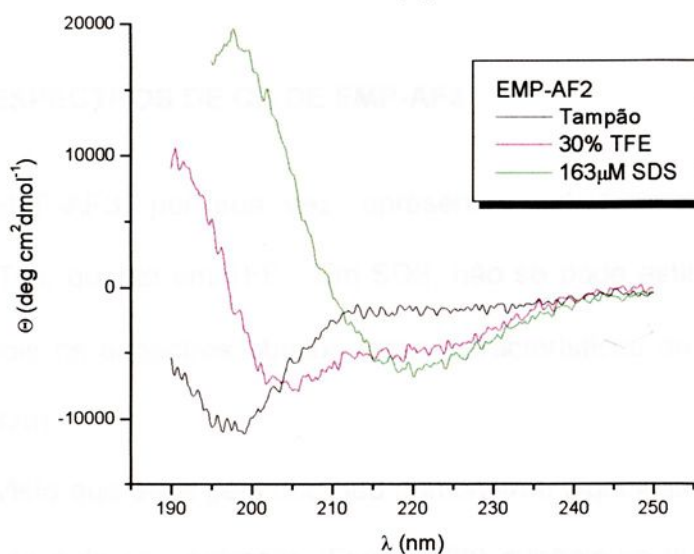
Figura 29. Espectros de CD de EMP-AF2 em várias concentrações de TFE.

Na Figura 30a são apresentados os espectros de CD de EMP-AF2 na presença de SDS. Como ocorrido para os eumenines mastoparanos anteriores, os espectros desse peptídeo em SDS, apresentaram uma única banda negativa em 220nm e uma banda positiva em 200nm, sugerindo também a formação de folha- β . Além disso, os espectros de EMP-AF2 em SDS diferem dos obtidos, no mesmo detergente, para EMP-AF e EMP-AF1, sugerindo que

as estruturas também sejam diferentes. Os espectros máximos obtidos em TFE e SDS são mostrados na Figura 30b e evidenciam a provável diferença na conformação do peptídeo nestas duas condições.



(a)



(b)

Figura 30. Espectros de CD de EMP-AF2: (a) em várias concentrações de SDS; (b) nos máximos de TFE e SDS.

Em lipossomos aniônicos (PC/PG), EMP-AF2 apresentou uma conformação aleatória, cujos espectros de CD são apresentados na Figura 31.

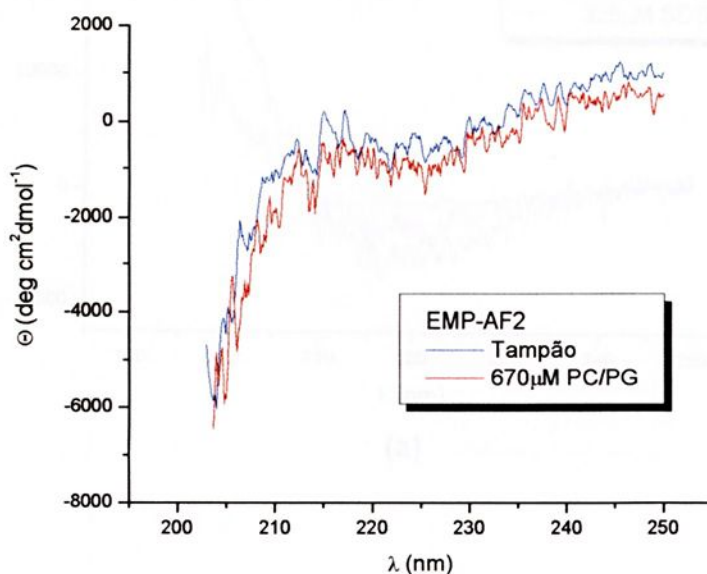
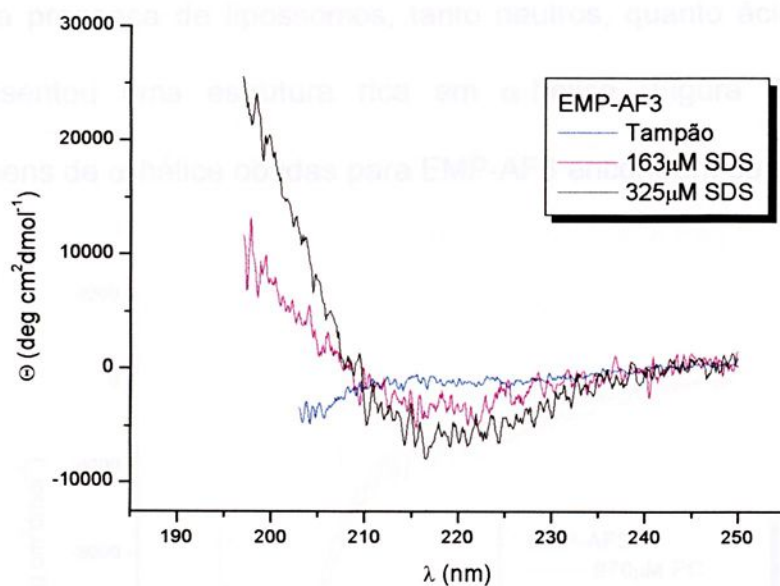


Figura 31. Espectros de CD de EMP-AF2 em lipossomos aniônicos.

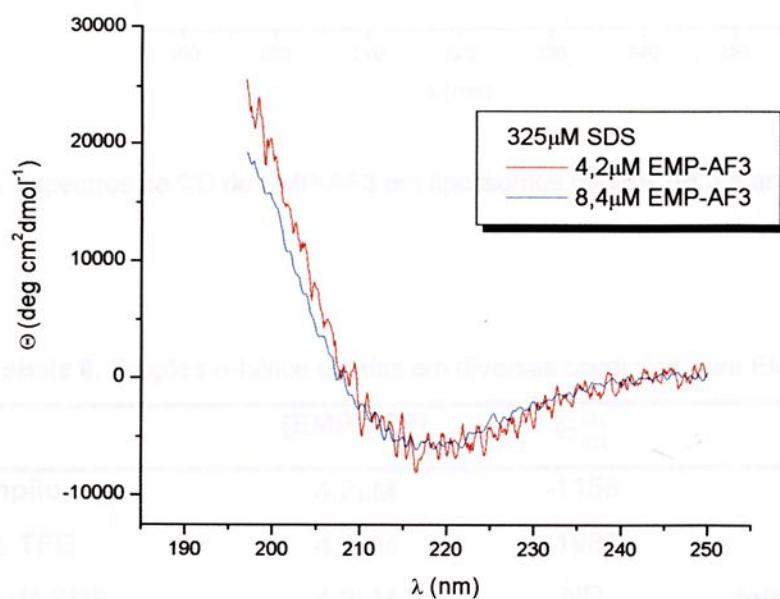
ESPECTROS DE CD DE EMP-AF3

EMP-AF3, por sua vez, apresentou estrutura aleatória, tanto em tampão Tris, quanto em TFE. Em SDS, não se pôde estimar a fração de α -hélice, pois os espectros obtidos foram característicos de folha- β ou volta- β (Figura 32a).

Visto que esse peptídeo não demonstrou significativa dependência da elipticidade pela concentração (Figura 32b) supõem-se que esteja formando estrutura secundária do tipo volta- β .



(a)



(b)

Figura 32. Espectros de CD de EMP-AF3: **(a)** em duas concentrações de SDS; **(b)** evidenciando a não-dependência da elipticidade pela concentração do peptídeo, em SDS.

Na presença de lipossomos, tanto neutros, quanto ácidos, EMP-AF3 não apresentou uma estrutura rica em α -hélice (Figura 33). Todas as porcentagens de α -hélice obtidas para EMP-AF3 encontram-se na Tabela 6.

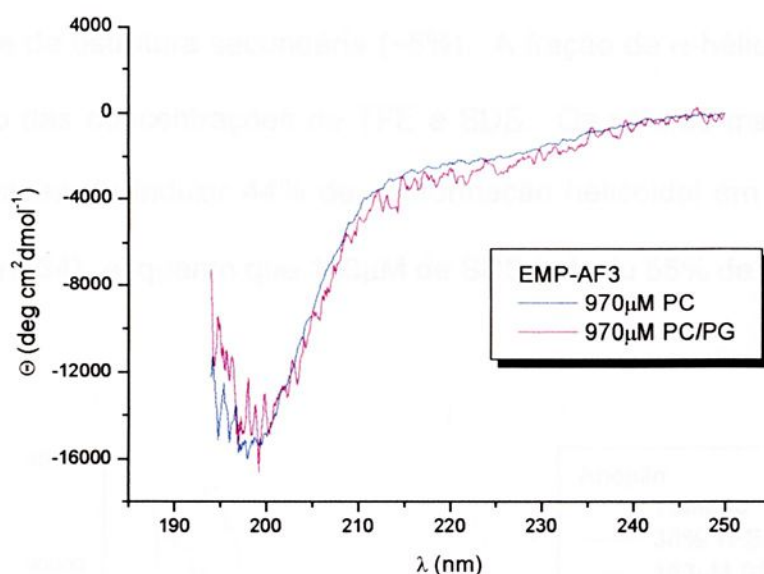


Figura 33. Espectros de CD de EMP-AF3 em lipossomos neutros (PC) e aniônicos (PC/PG).

Tabela 6. Frações α -hélice obtidas em diversas condições para EMP-AF3.

	[EMP-AF3]	Θ_{222}^{obs}	f_H^*
Tampão	4,2 μ M	-1158	5%
30% TFE	4,2 μ M	-1987	7%
325 μ M SDS	4,2 μ M	ND	folha- β (?)
Tampão	8,4 μ M	-1732	6%
325 μ M SDS	8,4 μ M	ND	folha- β (?)
970 μ M PC	40 μ M	-2308	8%
970 μ M PC/PG	12 μ M	-2813	9%

* Obtida através da equação 5, página 37.

ESPECTROS DE CD DE ANOPLIN

O espectro de CD do Anoplin em tampão Tris apresenta uma pequena quantidade de estrutura secundária (~5%). A fração de α -hélice aumenta com o aumento das concentrações de TFE e SDS. Os valores mais altos obtidos foram capazes de induzir 44% de conformação helicoidal em 30% (4,5M) de TFE (Figura 34), enquanto que 163 μ M de SDS induziu 55% de α -hélice (Figura 34 e 35).

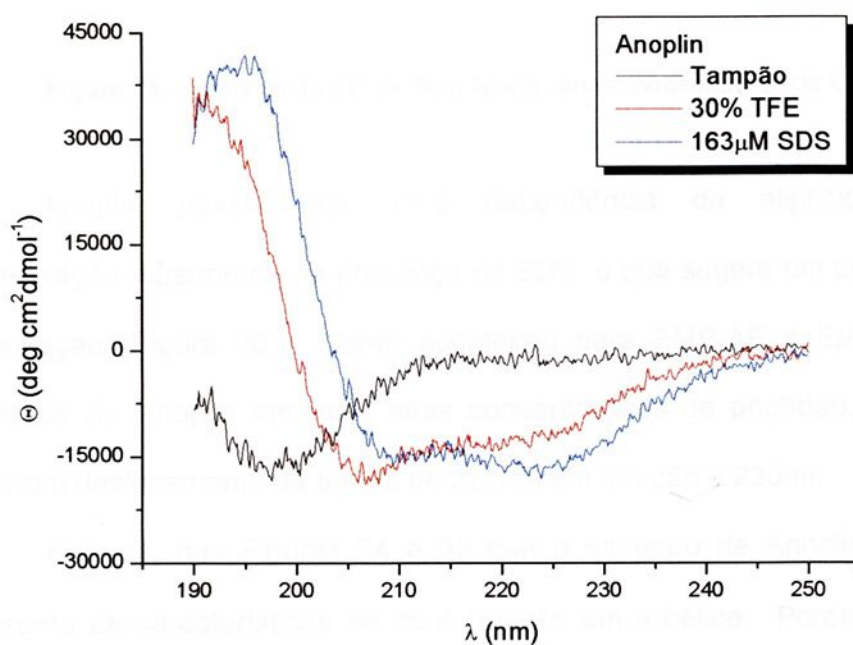


Figura 34. Espectros de CD de Anoplin nos máximos de TFE e SDS.

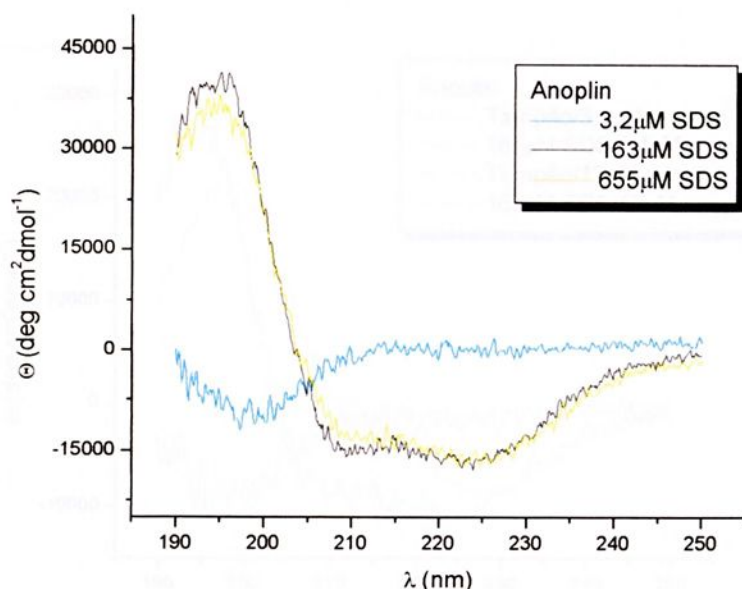


Figura 35. Espectros de CD de Anoplin em várias concentrações de SDS.

Anoplin possui uma leve dependência da elipticidade pela concentração, observada na presença de SDS, o que sugere um processo de n-merização (Figura 36). Como aconteceu para EMP-AF e EMP-AF1, os espectros de Anoplin em mais altas concentrações de peptídeo, tendem a sofrer um deslocamento da banda de 222nm em direção à 230nm.

Nota-se, nas Figuras 34 e 35 que o espectro de Anoplin em SDS, apresenta as características de conformação em α -hélice. Porém, ainda na presença desse surfactante, mas em maiores concentrações do peptídeo, ocorre a mudança do espectro acima referida, indicando uma possível formação de folha- β .

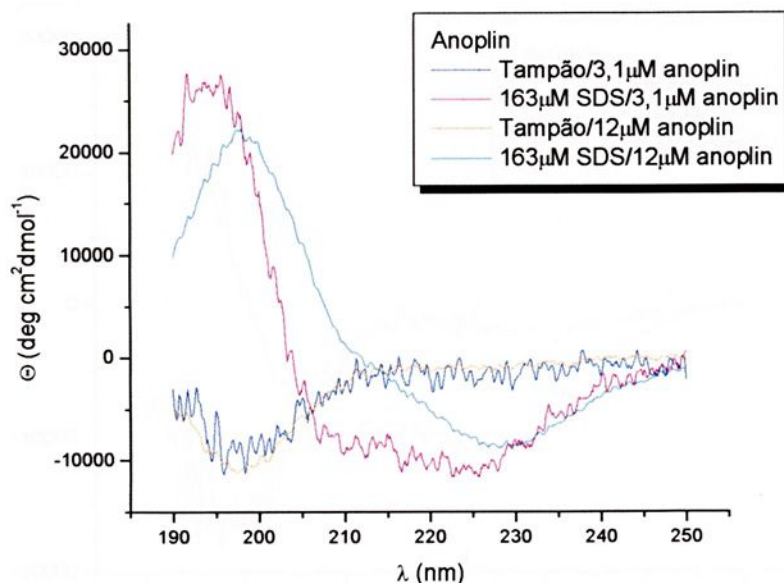


Figura 36. Espectros de CD de Anoplin, evidenciando a dependência da elipticidade pela concentração, em SDS, e a mudança na estrutura secundária.

Em lipossomo zwitteriônico, Anoplin não apresentou estrutura definida e em lipossomo com carga negativa, chega a formar 38% de conformação α -hélice, identificada pelo espectro contendo duas bandas negativas, uma à 208nm e a outra à 220nm (Figura 37). Ao contrário do que ocorreu para EMP-AF, em lipossomos ácidos, Anoplin tende a formar estrutura helicoidal. Os resultados de f_H são apresentados na Tabela 7.

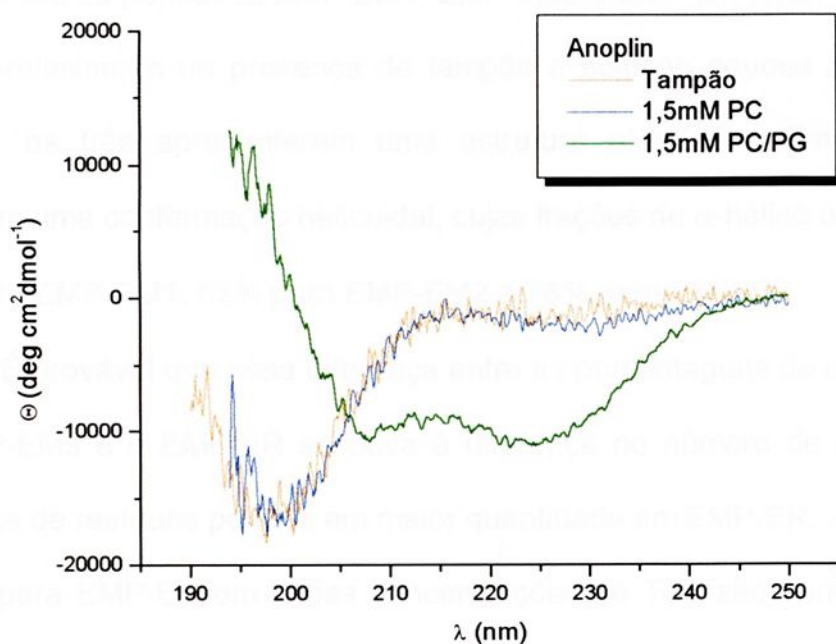


Figura 37. Espectros de CD de Anoplin em lipossomos neutros (PC) e aniônicos (PC/PG).

Tabela 7. Frações α -hélice obtidas em diversas condições para Anoplin.

[Anoplin]		Θ_{222}^{obs}	f_H^*
Tampão	6,2 μ M	-1063	5%
30% TFE	6,2 μ M	-12628	44%
163 μ M SDS	6,2 μ M	-16139	55%
Tampão	3,1 μ M	-1411	6%
163 μ M SDS	3,1 μ M	-10454	36%
Tampão	12 μ M	-1102	5%
163 μ M SDS	12 μ M	ND	folha- β (?)
1,5mM PC	12 μ M	-1535	7%
1,5mM PC/PG	12 μ M	-10901	38%

* Obtida através da equação 5, página 37.

ESPECTROS DE CD DE OUTROS MASTOPARANOS

Para os peptídeos EMP-EM1, EMP-EM2 e EMP-ER foram feitos alguns testes preliminares na presença de tampão e solução aquosa de TFE. Em tampão, os três apresentaram uma estrutura aleatória. Em TFE, todos adotaram uma conformação helicoidal, cujas frações de α -hélice obtidas foram: 47% para EMP-EM1, 52% para EMP-EM2 e 76% para EMP-ER.

É provável que essa diferença entre as porcentagens de α -hélice entre os EMP-EMs e o EMP-ER se deva à diferença no número de resíduos e à presença de resíduos polares em maior quantidade em EMP-ER. Os espectros de CD para EMP-ER em várias concentrações de TFE são apresentados na Figura 38. Os espectros de CD para EMP-EM1 e EMP-EM2 em TFE são apresentados nas Figuras 39 e 40, respectivamente.

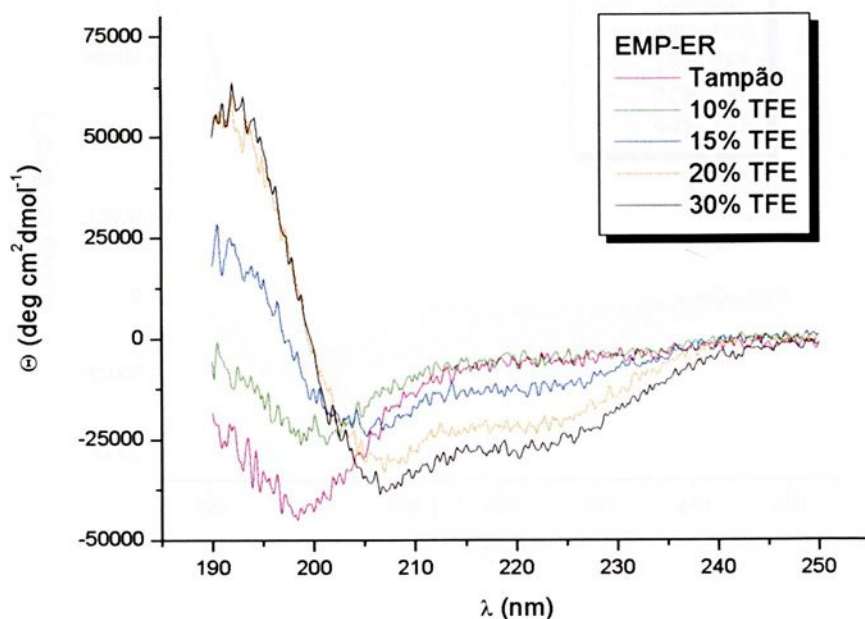


Figura 38. Espectros de dicroísmo circular em TFE para EMP-ER.

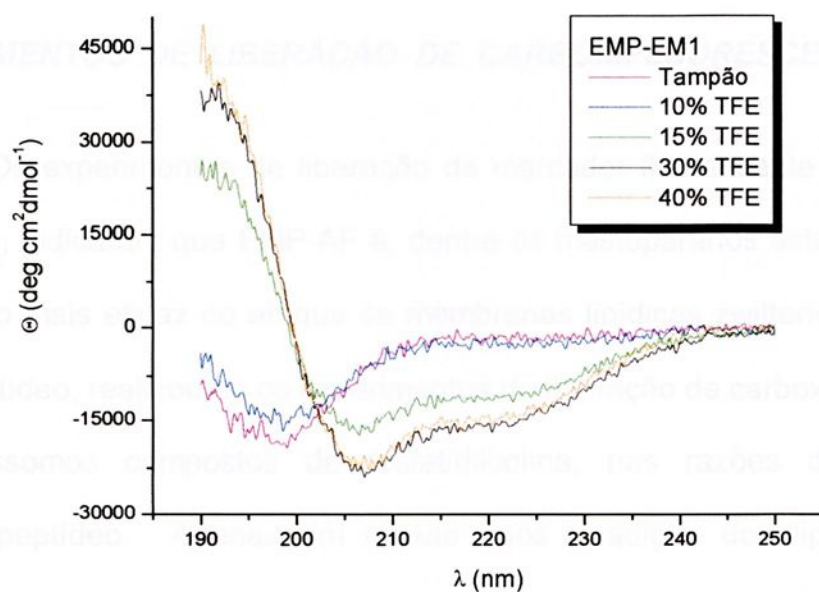


Figura 39. Espectros de dicroísmo circular em TFE para EMP-EM1.

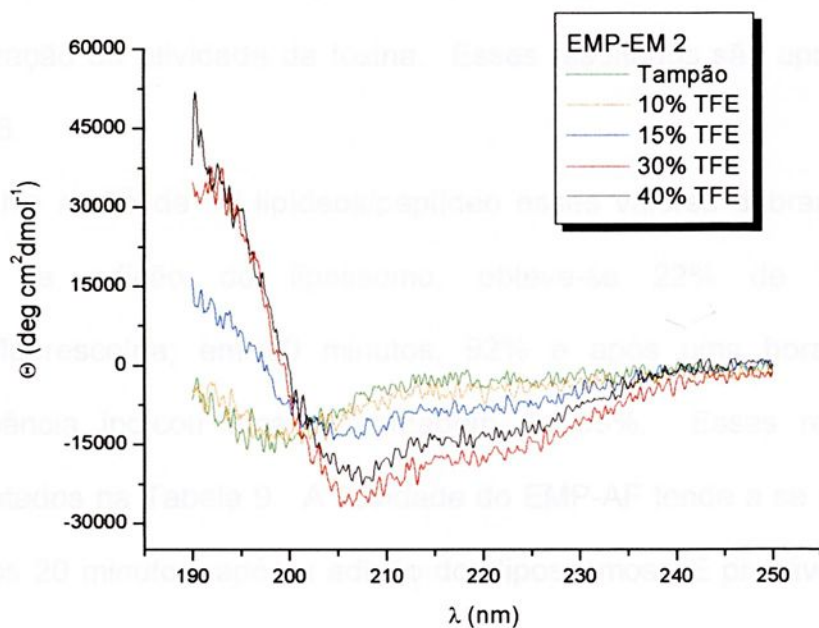


Figura 40. Espectros de dicroísmo circular em TFE para EMP-EM2.

EXPERIMENTOS DE LIBERAÇÃO DE CARBOXIFLUORESCEÍNA

Os experimentos de liberação de marcador fluorescente induzida por peptídeo, indicaram que EMP-AF é, dentre os mastoparanos estudados neste projeto, o mais eficaz no ataque às membranas lipídicas zwitteriônicas. Para este peptídeo, realizou-se os experimentos de liberação de carboxifluoresceína de lipossomos compostos de fosfatidilcolina, nas razões de 35 e 10 lipídeos/peptídeo. Apenas um minuto após a adição dos lipossomos na solução contendo o mastoparano, numa proporção de 35 lipídeos/peptídeo, o sinal de fluorescência indicou 10% de liberação do conteúdo interno. Cerca de 30 minutos depois, obteve-se 40% de liberação da carboxifluoresceína e, no final de uma hora, essa porcentagem chegou a 47%, indicando uma estabilização da atividade da toxina. Esses resultados são apresentados na Tabela 8.

Na razão de 10 lipídeos/peptídeo esses valores dobraram: após um minuto da adição do lipossomo, obteve-se 22% de liberação de carboxifluoresceína; em 30 minutos, 92% e após uma hora, o sinal de fluorescência indicou uma porcentagem de 95%. Esses resultados são apresentados na Tabela 9. A atividade do EMP-AF tende a se estabilizar por volta dos 20 minutos, após a adição dos lipossomos. É provável que nessas razões lipídeo/peptídeo, EMP-AF danifique as membranas lipídicas, sem a formação de poros nas mesmas pois, segundo os dados de CD, em lipossomos neutros (PC ou DPPC), esse mastoparano não forma estrutura helicoidal.



Tabela 8. Porcentagem de liberação de carboxifluoresceína por EMP-AF em uma razão de 35 lipídeos/peptídeo.

Tempo (min)	Fluorescência	% de Liberação
0	1160,65	0,0
1	1265,115	9,50
3	1395,751	21,3
5	1473,533	28,4
7	1508,748	31,6
10	1544,346	35,0
15	1581,87	38,3
20	1597,91	39,7
25	1616,163	41,4
30	1633,282	43,0
40	1648,588	44,3
50	1664,372	45,8
60	1673,751	46,6
triton	2259,705	100

Tabela 9. Porcentagem de liberação de carboxifluoresceína por EMP-AF em uma razão de 10 lipídeos/peptídeo.

Tempo (min)	Fluorescência	% de Liberação
0	561,925	0,0
1	873,484	22,0
5	1470,366	66,0
10	1613,622	77,0
15	1737,003	86,0
20	1787,619	89,0
25	1805,102	91,0
30	1816,999	92,0
45	1838,223	93,0
50	1846,439	94,0
60	1851,571	94,5
triton	1927,888	100

As curvas da cinética da liberação de calceína de lipossomos PC por EMP-AF são apresentadas na Figura 41. As curvas são monoexponenciais (indicado pela curva vermelha na Figura 41a), indicando que, se houver formação de poros, estes possuem densidade constante.

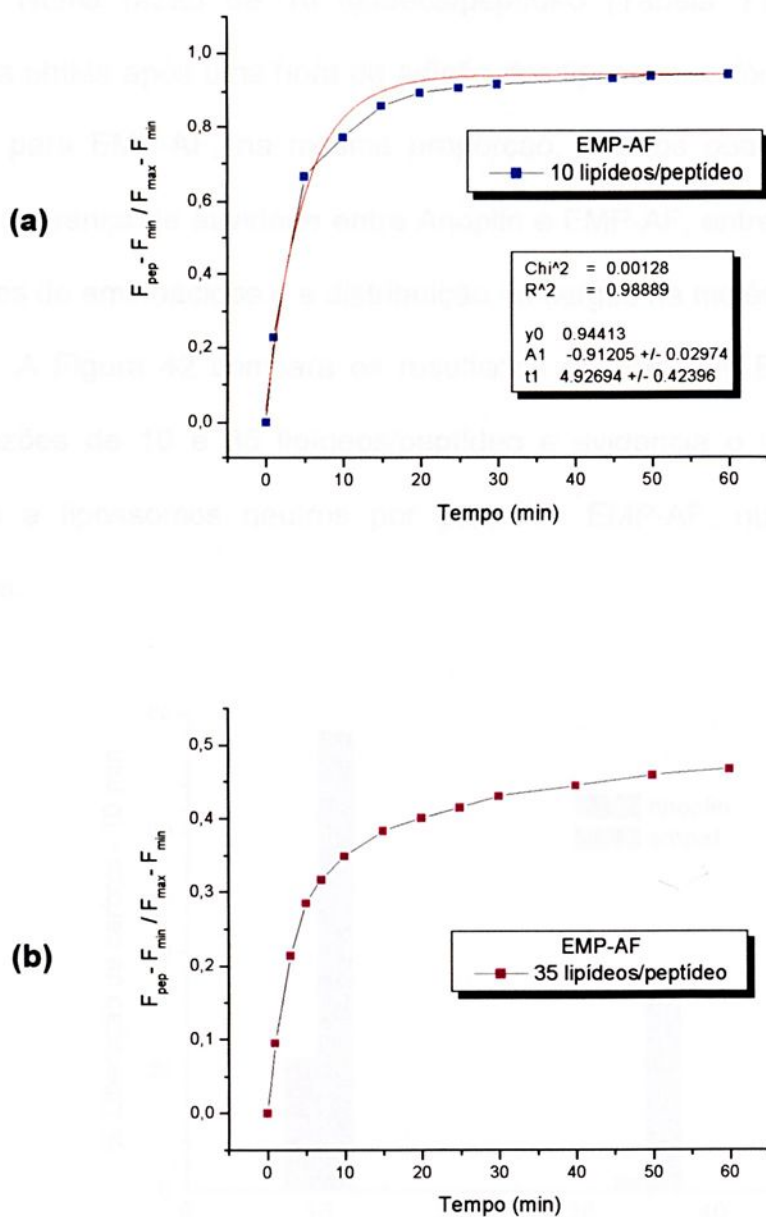


Figura 41. Curvas da cinética de liberação de carboxifluoresceína para EMP-AF em:
(a) 10 lipídeos/peptídeo; (b) 35 lipídeos/peptídeo.

Anoplin evidenciou uma atividade menos intensa no ataque às membranas dos lipossomos neutros. Na proporção de 35 lipídeos/peptídeo, obteve-se um máximo de 7% de liberação do conteúdo interno, após uma hora do início das medidas (Tabela 10).

Numa razão de 10 lipídeos/peptídeo (Tabela 11), a porcentagem máxima obtida após uma hora de adição dos lipossomos foi 48%, a metade do obtido para EMP-AF, na mesma proporção. Vários podem ser os motivos dessa diferença de atividade entre Anoplin e EMP-AF, entre eles o número de resíduos de aminoácidos e a distribuição de cargas na molécula.

A Figura 42 compara os resultados obtidos com EMP-AF e Anoplin, nas razões de 10 e 35 lipídeos/peptídeo e evidencia o maior potencial de ataque a lipossomos neutros por parte do EMP-AF, num período de 10 minutos.

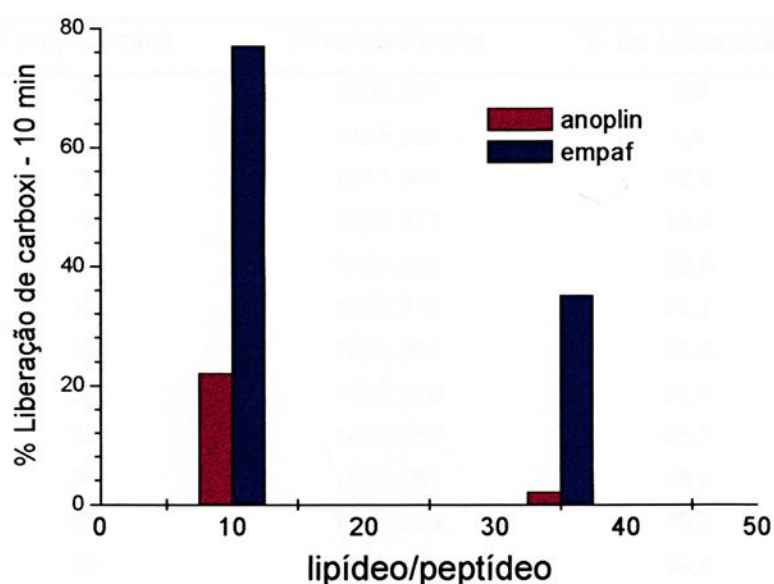


Figura 42. Liberação de carboxifluoresceína de lipossomos de fosfatidilcolina, após 10 minutos de adição dos mesmos às soluções de peptídeos (EMP-AF e Anoplin), em duas razões de lipídeo/peptídeo.

Tabela 10. Porcentagem de liberação de carboxifluoresceína por Anoplin em uma razão de 35 lipídeos/peptídeo.

Tempo (min)	Fluorescência	% de Liberação
0	1004,133	0,0
1	1005,617	0,1
3	1005,87	0,1
5	1007,516	0,2
7	1014,749	0,7
10	1020,622	1,2
15	1037,647	2,4
20	1051,401	3,4
25	1060,528	4,1
30	1067,816	4,6
40	1078,019	5,4
50	1090,793	6,3
60	1097,478	6,8
triton	2370,982	100

Tabela 11. Porcentagem de liberação de carboxifluoresceína por Anoplin em uma razão de 10 lipídeos/peptídeo.

Tempo (min)	Fluorescência	% de Liberação
0	1105,921	0,0
1	1155,622	4,6
3	1241,944	12,6
5	1282,812	16,4
7	1305,392	18,5
10	1338,913	21,7
15	1379,301	25,4
20	1436,926	31,0
25	1483,267	35,7
30	1523,551	39,0
40	1571,099	43,3
50	1595,216	45,6
60	1620,335	48,0
triton	2178,721	100

Os demais mastoparanos submetidos a ensaios de liberação de marcador fluorescente, EMP-AF1, EMP-AF2 e EMP-AF3, demonstraram uma pequena capacidade de ataque às membranas compostas por fosfolípidos neutros, numa razão de 35 lípidos/peptídeo. Após 10 minutos do início das medidas, EMP-AF1 apresentou uma porcentagem de 4,5% de liberação de carboxifluoresceína, EMP-AF2, 14,3%, e EMP-AF3, 6,4% de liberação da sonda. Após uma hora EMP-AF1 e EMP-AF3, apresentaram cerca de 10% de liberação de carboxifluoresceína, enquanto que EMP-AF2 apresentou 22% de atividade, no mesmo período de tempo.

A Figura 43 compara o potencial de ataque aos lipossomos de fosfatidilcolina de todos os EMPs, em um período de 10 minutos e em uma razão de 35 lípidos/peptídeo. Nota-se que EMP-AF rompe mais eficazmente os lipossomos neutros comparado a seus análogos.

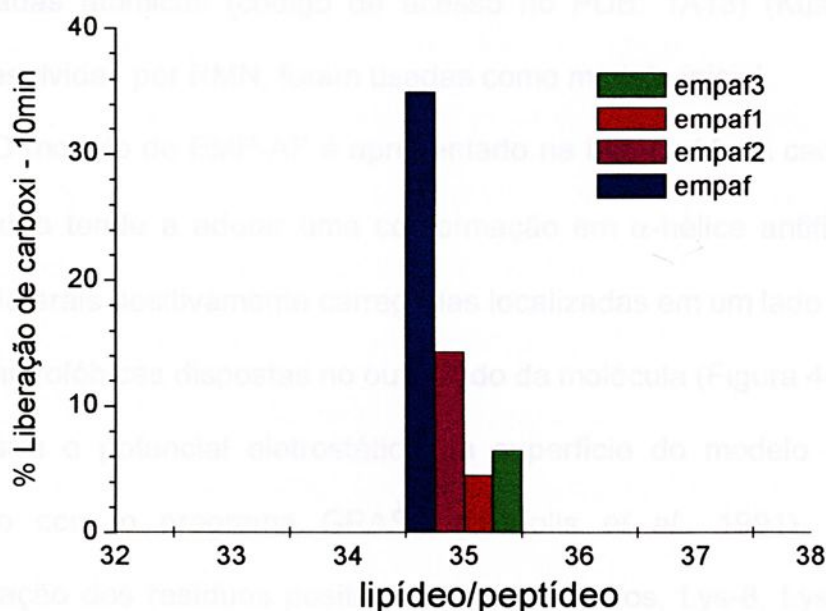


Figura 43. Liberação de carboxifluoresceína de lipossomos de fosfatidilcolina, após 10 minutos da adição destes às soluções dos eumenines mastoparanos, em uma razão de 35 lípidos/peptídeo.

ESTRUTURA SECUNDÁRIA E TERCIÁRIA DOS MODELOS

Várias tentativas de cristalização do Anoplin foram feitas baseadas nos procedimentos descritos previamente para EMP-AF (Canduri *et al.*, 2000; Delatorre *et al.*, 2001). Contudo, apenas microcristais, inadequados aos experimentos de difração de raios X, foram obtidos. No caso de EMP-AF, as tentativas de se resolver a estrutura tridimensional usando a técnica de substituição molecular (Navaza, 1994) não produziram uma solução razoável. Assim, uma vez que não há estrutura de Anoplin ou EMP-AF, foram construídos modelos baseados na homologia, usando o programa MODELLER (Sali & Blundell, 1993). Esses procedimentos foram realizados pelo Grupo de Biocristalografia do Departamento de Física, Ibilce-Unesp.

Ambos peptídeos possuem alta homologia com MP-X, cujas coordenadas atômicas (código de acesso no PDB: 1A13) (Kusunoki *et al.*, 1998), resolvidas por RMN, foram usadas como modelo inicial.

O modelo de EMP-AF é apresentado na Figura 44. A cadeia principal do peptídeo tende a adotar uma conformação em α -hélice anfifílica, com as cadeias laterais positivamente carregadas localizadas em um lado e as cadeias laterais hidrofóbicas dispostas no outro lado da molécula (Figura 44a). A Figura 44b mostra o potencial eletrostático da superfície do modelo do EMP-AF, calculado com o programa GRASP (Nicholls *et al.*, 1991), indicando a concentração dos resíduos positivamente carregados, Lys-8, Lys-5 e Lys-12, em um lado da molécula.



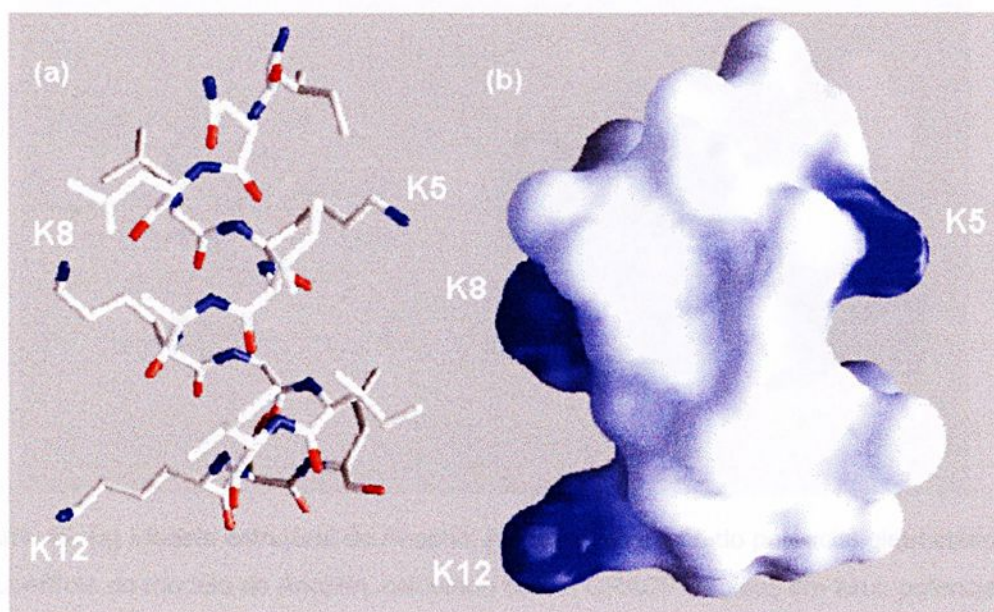


Figura 44. (a) Modelo estrutural do EMP-AF. **(b)** Representação do potencial eletrostático de superfície do modelo de EMP-AF, calculado com o GRASP (regiões em azul: potenciais positivos dos resíduos de lisina; regiões em branco: potenciais neutros).

No modelo do Anoplin, apresentado na Figura 45, nota-se o mesmo comportamento. A cadeia principal do peptídeo, dos resíduos de 4 a 9 no modelo do anoplin, adota uma conformação em α -hélice anfifílica com 3 cadeias laterais positivamente carregadas localizadas em um lado e as cadeias laterais hidrofóbicas dispostas no outro lado da molécula (Figura 45a). A Figura 45b mostra o potencial eletrostático da superfície do modelo do Anoplin, calculado usando o programa GRASP (Nicholls *et al.*, 1991) indicando a concentração dos resíduos positivamente carregados, Lys-4, Arg-5 e Lys-7, em um lado da molécula.

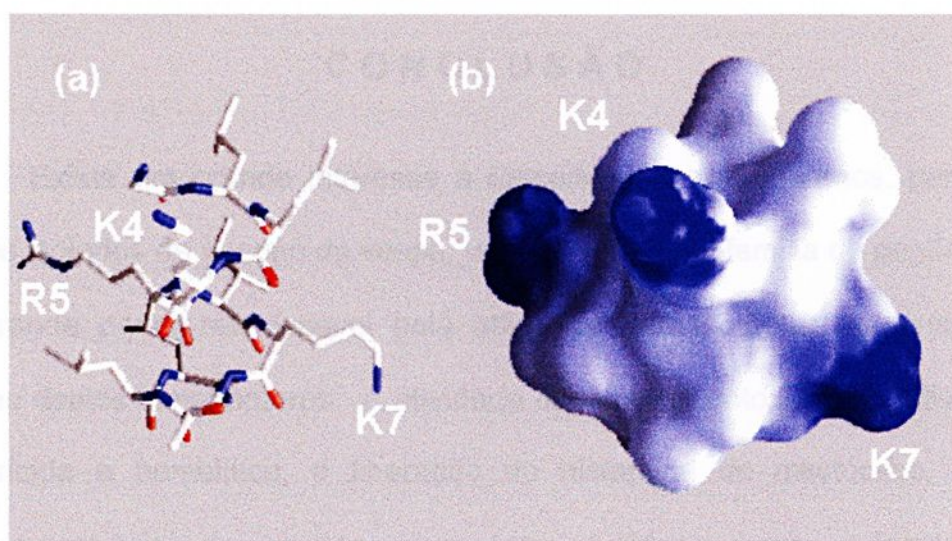


Figura 45. (a) Modelo estrutural do Anoplin. **(b)** Representação do potencial eletrostático de superfície do modelo do Anoplin, calculado com o GRASP (regiões em azul: potenciais positivos da arginina e dos resíduos de lisina; regiões em branco: potenciais neutros).

Estudos sobre a relação estrutura-atividade dos mastoparanos isolados de vespas sociais têm mostrado que as cargas positivas são cruciais para o desempenho de suas atividades biológicas (Kusunoki, 1998; Higashijima, 1990). Essas cargas positivas mantêm-se em EMP-AF e Anoplin.

CONCLUSÃO

Existe um grande interesse a respeito dos mastoparanos, peptídeos tóxicos isolados de veneno de vespa, uma vez que esta família de peptídeos é, em grande parte, responsável pela atividade farmacológica conferida pelo veneno destes himenópteros. A atividade engloba neurotoxicidade, atividades bactericida e hemolítica, e liberação de histamina de mastócitos. Assim, estudos estruturais dos mastoparanos viriam elucidar as bases moleculares de sua atuação biológica, permitindo a produção de novos fármacos.

A idéia inicial deste projeto de Mestrado era o estudo estrutural dos mastoparanos por técnicas de difração de raios X. Para isso, cristalizou-se vários destes peptídeos, mas os cristais resultantes foram, na maior parte das vezes, inadequados aos ensaios de difração. Dessa forma, foi necessário acrescentar novas técnicas ao projeto, como o dicroísmo circular e a fluorescência, com intuito de investigar a estrutura dos mesmos.

Com as técnicas espectroscópicas foi possível acessar a estrutura secundária dos peptídeos em ambientes que mimetizam a hidrofobicidade da membrana, alvo no desempenho de suas atividades biológicas. Assim, foram estudadas as conformações dos mastoparanos em TFE, SDS e em lipossomos.

Todos os mastoparanos extraídos de veneno de vespas solitárias, estudados neste projeto, apresentaram-se em uma conformação aleatória em solução tampão.



Em TFE, apresentaram conformação helicoidal dependente da sequência de aminoácidos e da proteção do C-terminal. EMP-AF e Anoplin possuem, nestas condições, as maiores frações de α -hélice, respectivamente 57% e 44%, seguidos por EMP-AF1 e EMP-AF2 com ~20% de porcentagem de α -hélice cada um e, por fim, EMP-AF3 que apresenta estrutura aleatória mesmo em TFE. É interessante notar que apesar de Anoplin ser mais curto em quatro resíduos, a quantidade de α -hélice é apenas 27% menor que de EMP-AF. Entretanto, quando o C-terminal do EMP-AF não está protegido (EMP-AF1), a quantidade de α -hélice é significativamente reduzida. A deleção de três resíduos no N-terminal (EMP-AF2) reduz a fração de α -hélice para os níveis observados para o EMP-AF1. A proteção no C-terminal pelo grupo amida pode facilitar a formação de mais uma ponte de hidrogênio na cadeia principal, entre o grupo carbonila da Isoleucina-11 com o grupo amida do C-terminal. Esta ponte deve estar ausente no EMP-AF1 e EMP-AF3, justificando a menor quantidade de α -hélice observada.

Uma vez que, TFE é conhecido como indutor de α -hélice, não se pode afirmar que, em condições fisiológicas, a formação de estrutura helicoidal aconteça.

Isso fica mais evidente quando os espectros de CD, com os peptídeos na presença de SDS, são analisados. Nestas condições, houve a n-merização e/ou provável formação de estrutura β . Abaixo da cmc, SDS apresenta-se em um estado monomérico e acaba por induzir conformação em folha- β , pois oferece um modelo hidrofóbico que promove a estabilização da conformação do peptídeo através de interações hidrofóbicas entre monômeros do peptídeo e

Conclusão



monômeros de SDS. Dessa forma, peptídeos que adotam conformação em α -hélice em TFE, podem adotar conformação β na presença de baixas concentrações de SDS (Blondelle *et al.*, 1999).

Também já foram descritos, a altas concentrações de peptídeo, agregados formados por folha- β e pequenas porções de α -hélice, resultado do aumento de ligações de hidrogênio entre as moléculas de peptídeo (Blondelle *et al.*, 1999).

Na presença de lipossomos neutros, todos os mastoparanos apresentaram estrutura aleatória. Porém, mesmo nesta situação foram capazes de romper estes lipossomos, comprovado pelos resultados de liberação de carboxifluoresceína. Em lipossomos aniônicos, apenas EMP-AF e Anoplin formaram estrutura secundária definida, porém EMP-AF apresentou uma conformação próxima de folha- β e os espectros de Anoplin indicaram uma conformação helicoidal.

Os resultados concordam com os ensaios biológicos descritos previamente, cujos gráficos de atividade de degranulação de mastócitos e hemólise são apresentados nas Figuras 46 e 47, respectivamente.

EMP-AF é o eumenine mastoparano com maior potencial para degranular mastócitos peritoneais de ratos e causar a hemólise de eritrócitos humanos (Konno *et al.*, 2000). Sua alta atividade de liberação de carboxifluoresceína de lipossomos constituídos por fosfatidilcolina, poderia explicar sua ação de hemólise de eritrócitos humanos, uma vez que estas últimas células são formadas por fosfolípidos zwitteriônicos (fosfatidilcolina) e neutros (esfingomielina).



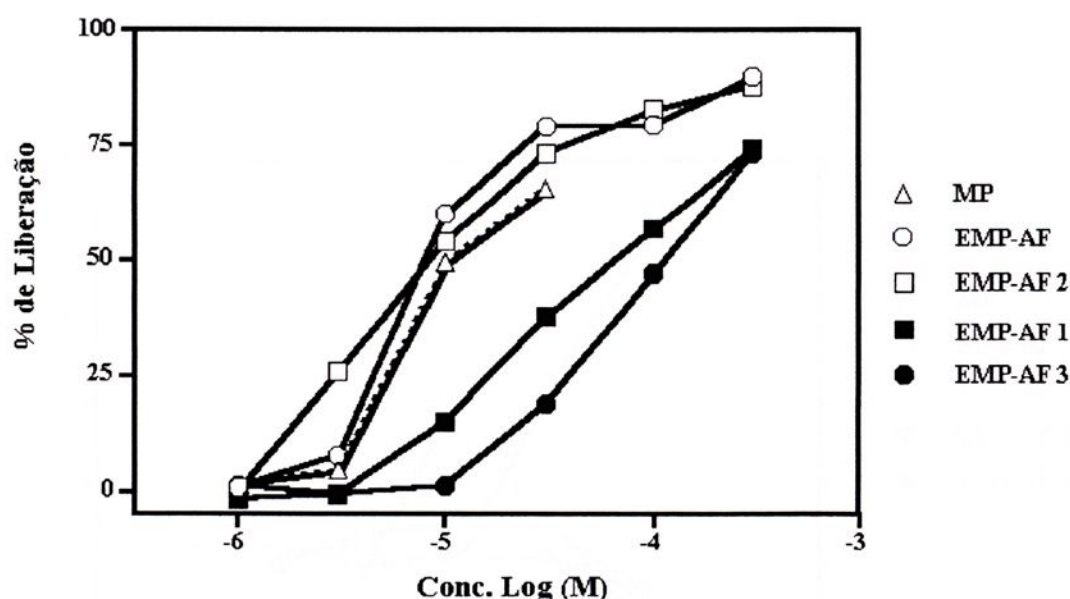


Figura 46. Gráfico do potencial de liberação de histamina de mastócitos peritoneais de ratos dos eumeninos mastoparanos, comparados a MP extraído de vespa social. Apenas EMP-AF e EMP-AF2 apresentam esta atividade na mesma proporção que MP. EMP-AF1 e EMP-AF3 possuem potencial menor que MP (Konno *et al.*, 2000).

Pode-se inferir, a partir dos dados de baixa liberação de marcador fluorescente de lipossomos neutros, que EMP-AF1 não apresenta atividade de hemólise de eritrócitos humanos e sua atividade de degranulação de mastócitos é extremamente baixa (Konno *et al.*, 2000).

Da mesma maneira, a baixa atividade de liberação de carboxifluoresceína de PC, nos experimentos de fluorescência para EMP-AF2, reflete seu baixo potencial de causar hemólise em eritrócitos humanos (Konno *et al.*, 2000).

EMP-AF3 possui atividades de degranulação de mastócitos e hemólise tão baixas quanto EMP-AF1 (Konno *et al.*, 2000), confirmadas por sua baixa interação com os lipossomos de fosfatidilcolina.

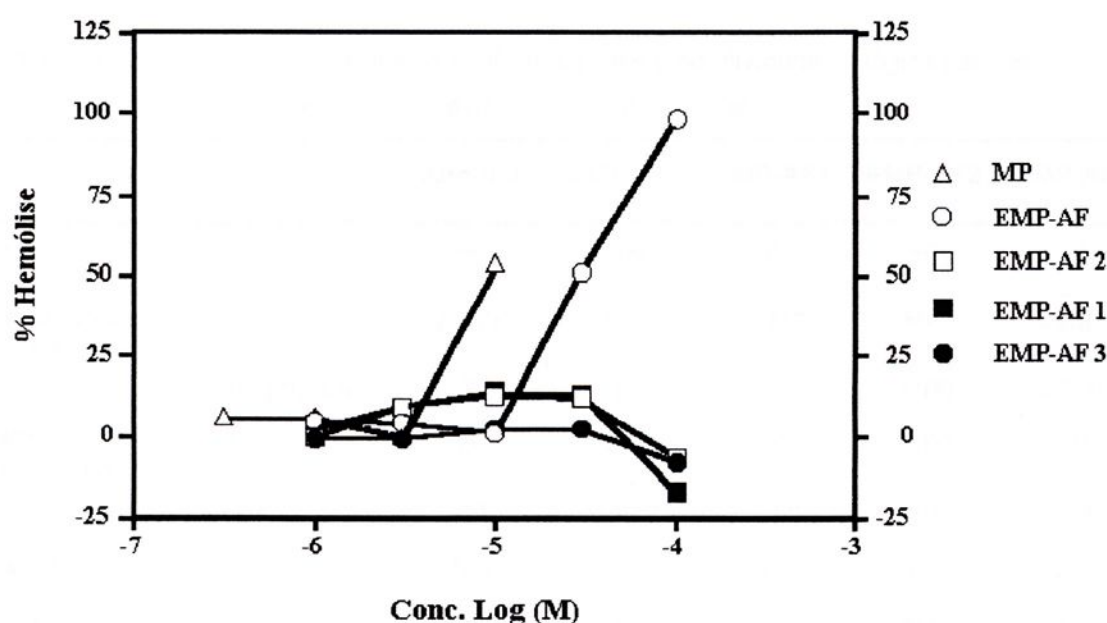


Figura 47. Gráfico do potencial hemolítico dos eumenines mastoparanos, quando comparados ao MP, extraído de vespa social. Apenas EMP-AF apresenta hemólise sobre eritrócitos humanos, porém seu potencial é 1/3 do apresentado por MP. Os demais eumenines mastoparanos não apresentam essa atividade (Konno *et al.*, 2000).

Anoplin é um mastoparano que possui atividade de degranulação de mastócitos e hemólise de eritrócitos humanos inferiores a de EMP-AF. Porém, possui maior potencial que os demais eumenines mastoparanos (Konno *et al.*, 2000), o que pode ser explicado, considerando sua sequência primária e estrutura secundária prevista, e por conseguinte sua menor hidrofobicidade, se comparada à EMP-AF1~3. Esses dados são inferidos por sua relativamente alta atividade de liberação de marcador fluorescente de lipossomos neutros.

Um resumo dos resultados obtidos sobre a conformação dos mastoparanos extraídos de veneno de vespas solitárias e suas atividades biológicas é apresentado na Tabela 12 (dados de atividade foram gentilmente cedidos por Dr. K. Konno).

Tabela 12. Resumo dos resultados conformacionais e de atividade biológica para os mastoparanos extraídos de vespa solitária.

		Anoplin	EMP-AF	EMP-AF1	EMP-AF2	EMP-AF3
Hemólise		~0	1/3MP*	0	~0	~0
Degranulação de Mastócitos		2/3MP	MP	↓↓MP	MP	↓↓MP
Atividade antimicrobiana **	<i>S. saprophyticus</i>	20	5	25	>100	>100
	<i>E. coli</i>	20	20	50	>100	>100
	<i>C. albicans</i>	40	ND****	>100	>100	>100
f_H em tampão		5%	10%	6%	7%	5%
f_H em TFE		44%	57%	23%	20%	7%
f_H em SDS		55%	folha- β ?	folha- β ?	folha- β ?	folha- β ?
f_H em lipossomos neutros		7%	14%	ND	ND	8%
f_H em lipossomos ácidos		38%	folha- β ?	6%	7%	9%
% Liberação de carboxi ***		<2%	35%	<2%	<2%	<2%

* Dados de atividade de degranulação e hemólise são comparados aos obtidos por MP, mastoparano extraído de vespa social.

** MIC ($\mu\text{g/ml}$): Concentração mínima do peptídeo para matar 50% da colônia de microrganismos.

Staphylococcus saprophyticus: Gram-positiva; *Escherichia coli*: Gram-negativa; *Candida albicans*: fungo.

*** Razão de 35 lipídeos/peptídeo, num período de 10 minutos.

****ND: Não determinado.

Pela tabela, é possível perceber que Anoplin possui alto potencial para tornar-se um antibiótico pois, ao mesmo tempo em que apresenta baixas taxas de hemólise sobre eritrócitos humanos e degranulação de mastócitos, mostra

Conclusão

uma alta atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e contra fungos. Outra vantagem que este mastoparano possui é seu pequeno tamanho. Anoplin é formado por apenas 10 resíduos de aminoácidos (o menor peptídeo extraído de vespa solitária que se tem notícia até o momento), o que facilita sua síntese e modificação química, com o intuito da produção de novos fármacos. EMP-AF também apresenta potencial para se tornar um antibiótico, uma vez que, mata eficazmente bactérias Gram-positivas ou -negativas. Porém, seriam necessárias modificações em sua seqüência e estrutura de tal forma que não apresentasse tão alto poder de hemólise e degranulação.

O mecanismo de atuação dos peptídeos sobre membranas não pôde ser inferido com precisão, a partir dos dados obtidos até o presente momento. Contudo, algumas evidências sugerem o mecanismo que pode estar ocorrendo.

Uma delas é a provável n-merização que acontece na presença de SDS e lipossomos, evidenciada pelos espectros de CD. Isto pode indicar a formação de poros transientes, uma vez que a aglomeração de monômeros do peptídeo é necessária neste modo de ação. Além disso, pelo modelo de carpete, não há obrigatoriedade de uma conformação helicoidal por parte dos peptídeos, fato este que ocorre em SDS e em lipossomos.

Entretanto, nos experimentos de liberação de marcador fluorescente, evidenciou-se o alto potencial de EMP-AF em romper lipossomos formados por fosfatidilcolina, um fosfolípido zwitteriônico. Este processo pode indicar um mecanismo do tipo barril, no qual os peptídeos se inserem no centro



hidrofóbico da membrana preferencialmente através de interações hidrofóbicas. Por conseguinte, os peptídeos poderiam se ligar a membranas fosfolipídicas independentemente das cargas dos fosfolipídeos constituintes. Este modelo também é dependente da concentração do peptídeo, já que pelo menos 4 moléculas deste precisam ser agrupadas para formar um poro íon-permeável.

Muitas questões ficaram em aberto ao final deste trabalho:

- Qual o mecanismo usado pelos eumenines mastoparanos para permeabilizarem as membranas?
- Por que EMP-AF rompeu lipossomos formados por 100% de fosfolipídeos neutros?
- Por que, na presença de SDS, os eumenines mastoparanos não formaram estrutura helicoidal como esperado?
- Ocorre n-merização, formação de estrutura β ou outra conformação?

Para responder estas questões e completar os estudos físico-químicos, será necessário o uso de novas técnicas, como a liberação de marcadores fluorescentes de lipossomos ácidos, em especial marcadores de pesos moleculares diferentes, bem como, a síntese dos peptídeos com triptofano.

O presente trabalho resultou em três publicações apresentadas no Apêndice D. Os dados finais obtidos da análise de CD e liberação de marcadores fluorescentes serão submetidos em breve.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARBUZOVA, A. & SCHWARZ, G. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, **1420**, 139-152.
- ARGIOLAS, A. & PISANO, J. J. (1983) *J. Biol. Chem.*, **258**, 13697-13702.
- ARGIOLAS, A. & PISANO, J. J. (1984) *J. Biol. Chem.*, **229**(16), 106-111.
- BABA, T. & SCHEEWIND, O. (1998) *Trends Microbial.*, **6-2**, 66-71.
- BANKS, B. E. & SHIPOLINI, R. A. (1986) In *Venoms of the Hymenoptera: Biochemical, Pharmacological and Behavioural Aspects*. Piek, T. Ed.: Academic Press - London, 327-416pp.
- BECHINGER, B. (1997) *J. Memb. Biol.*, **156**, 197-211.
- BECHINGER, B. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, **1462**, 157-183.
- BERNHEIMER, A. W. & RUDY, B. (1986) *Biochim. Biophys. Acta*, **864**, 123-141.
- BLONDELLE, S. E., LOHNER, K. & AGUILAR, M. -I. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, **1462**, 89-108.
- BUGS, R. (2001) *Transformações estruturais e função de fosfolipase*. Exame de qualificação. Depto. Física, Ibilce-Unesp.
- CANDURI, F., DELATORRE, P., FADEL, V., LORENZI, C. C. B., PEREIRA, J. H., OLIVIERI, J. R., RUGGIERO NETO, J., KONNO, K., PALMA, M. S., YAMANE, T. & DE AZEVEDO Jr., W. F. (2000) *Acta. Cryst.*, **D56**, 1434-1436.
- CHUANG, C., HUANG, W., YU, H., WANG, K. & WU, S. (1996) *Biochim. Biophys. Acta*, **1292**, 1-8.
- COHEN, S. G. & BIANCHINE, P. J. (1995) *Ann. Allergy*, **74**, 198-217.

DE AZEVEDO, W. F. Jr., LECLERC, S., MEIJER, L., HAVLICEK, L., STRNAD, M. & KIM, S. -H. (1997) *Eur. J. Biochemistry*, **243**, 518-526.

DE AZEVEDO, W. F. Jr., MUELLER-DIECKMANN, H. J., SCHULZEGAHMEN, U., WORLAND, P. J., SAUSVILLE, E. & KIM, S. -H. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 2735-2740.

DELATORRE, P., OLIVIERI, J. R., RUGGIERO NETO, J., LORENZI, C. C. B., CANDURI, F., FADEL, V., KONNO, K., PALMA, M. S., YAMANE, T. & DE AZEVEDO Jr., W. F. (2001) *Biochim. Biophys. Acta*, **1545**, 372-376.

DOHTSU, K., OKUMURA, K., HAGIWARA, K., PALMA, M. S. & NAKAJIMA, T. (1993) *Nat. Toxins*, **1(5)**, 271-276.

EPAND, R. M. & VOGEL, H. J. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, **1462**, 11-28.

EPAND, R. M., SHAI, Y., SEGREST, J. P. & ANANTHARAMAIAH, G. M. (1995) *Biopolymers*, **37**, 319-338.

FREER, J. H. (1980) In *Natural Toxins*, Eaker, D. & Wadstron, T. eds, Pergamon Press, Oxford.

GIBSON, B. W., POULTER, L., WILLIAMS, D. H. & MAGGIO, J. E. (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 5341-5349.

GIEGÉ, R. & DUCRUIX, A (1992) *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins-A Pratical Approach*. Oxford University Press, New York.

GHOSH, J. K., SHAOOL, D., GUILLAUD, P., CICERON, L., MAZIER, D., KUSTANOVICH, I., SHAI, Y. & MOR. A. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 31609-31616.

HABERMANN, E. (1972) *Science*, **177**, 314-322.

HIGASHIJIMA, T., BURNIER, J. & ROSS, E. M. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 14176-14186.



- HO, C. L. & HWANG, L. L. (1991) *Biochem. J.*, **274**, 453-456.
- HWANG, P. M., & VOGEL, H. J. (1998) *Biochem. Cell. Biol.*, **76**, 235-246.
- IBRAHIM, H. R., SUGIMOTO, Y. & AOKI, T. (2000) *Biochim. Biophys. Acta*, **1523**, 196-205.
- JANCARICK, J. & KIM, S. -H. (1991) *J. Appl. Cryst.*, **24**, 409-411.
- JUNQUEIRA, L. C. V. (1990) *Histologia Básica*. 7ª ed., Editora Guanabara, 388 pp.
- KATSU, T., KUROKO, M., MORIKAWA, T., SANCHIKA, K., FUJITA, Y., YAMAMURA, H. & UDA, M. (1989) *Biochim. Biophys. Acta*, **983**, 135-141.
- KATSU, T., KUROKO, M., MORIKAWA, T., SANCHIKA, K., YAMANAKA, H., SHINODA, S. & FUJITA, Y. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, **1027(2)**, 185-190.
- KATSU, T., NINOMIYA, C., KUROKO, M., KOBAYSHI, H., HIROTA, T. & FUJITA, Y. (1988) *Biochim. Biophys. Acta*, **939**, 57-63.
- KENNER, R. A. & ABODERIN, A. A. (1971) *Biochemistry*, **10**, 4433-4440.
- KIM, S. -H., SCHULZE-GAHMEN, U., BRANDSEN, J. & DE AZEVEDO, W. F. Jr. (1996) *Progress in Cell Cycle Research*, **2**, 137-145. Chapter 14. (Meijer, L., Guidet, S. & Vogel, L., eds.) Plenum Press, New York, USA. (Review).
- KONNO, K., HISADA, M., FONTANA, R., LORENZI, C. C. B., NAOKI, H., ITAGAKI, Y., MIWA, A., KAWAI, N., NAKATA, Y., YASUHARA, T., RUGGIERO NETO, J., DE AZEVEDO Jr., W.F., PALMA, M. S. & NAKAJIMA, T. (2001) *Biochim. Biophys. Acta*, **1550(1)**, 70-80.
- KONNO, K., HISADA, M., NAOKI, H., ITAGAKI, Y., KAWAI, N., MIWA, A., YASUHARA, T., MORIMOTO, Y. & NAKATA, Y. (2000) *Toxicon*, **38(11)**, 1505-1515.
- KRISHNAKUMARI, V. & NAGARAJ, R. (1997) *J. Peptide Res.*, **50(2)**, 88-93.



KUSUNOKI, H., WAKAMATSU, K., SATO, K., MIYAZAWA, T. & KOHNO, T. (1998) *Biochemistry* **37**, 4782-4790.

LASIC, D. D. (1988) *Biochem J.*, **256**, 1-11.

LASKOWSKI, R. A., MACARTHUR, M. W., MOSS, D. S., THORNTON, J. M. (1993) *J. Appl. Cryst.*, **26**, 283-290.

LUDTKE, S. J., HE, K., WU, Y. & HUANG, H. W. (1994) *Biochim. Biophys. Acta*, **1190**, 181-184.

MATSUZAKI, K. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, **1376**, 394-400.

MATHEWS, B. W. (1968). *J. Mol. Biol.* **33**, 491-497.

NAKAJIMA, T. (1984) in *Handbook of Natural Toxins* (Tu, A. T., ed.), Marcel Dekker, New York. Vol.2, 109-133.

NAKAJIMA, T., UZU, S., WAKAMATSU, K., SAITO, K., MIYAZAWA, T., YASUHARA, T., TSUKAMOTO, Y. & FUJINO, M. (1986) *Biopolymers*, **25**, S115-S121.

NAKAJIMA, T., YASUHARA, T., UZU, S., WAKAMATSU, K., MIYAZAWA, T., FUKUDA, K. & TSUKAMOTO, Y. (1985) *Peptides*, **6**, Suppl. 3, 425-430.

NAVAZA, J. (1994) *Acta. Cryst.*, **A50**, 157-163.

NEW, R. R. C. (1990) *Liposomes: a practical aproach*. IRL Press, Oxford.

NICHOLLS, A., SHARP, K. & HONIG, B (1991) *Proteins Struct. Funct. Genet.*, **11**, 281.

OREN, Z. & SHAI, Y. (1998) *Biopolymers*, **47**, 451-463.

OREN, Z., LEARMA, J. C., GUDMUNDSSON, G. H., AGERBERTH, B. & SHAI, Y. (1999) *Biochem. J.*, **341**, 501-513.



OTVOS Jr., L., BOKONYI, K., VARGA, I., OTVOS, B. I., HOFFMANN, R., ERTL, H. C. J., WADE, J. D., MCMANUS, A. M., CRAIK, D. J. & BULET, P. (2000) *Protein Science*, **9**, 742-749.

OTWINOWSKI, Z. (1993) In *Proceedings of the CCP4 Study Weekend*, edited by L. Sawyer, N. Isaacs & S. Bailey. Warrington: Daresbury Laboratory. 56-62pp.

PARK, R. (2002) *eMedicine Journal*, Vol. 3, number 1 (www.emedicine.com).

PIEK, T. & SPANJER, W. (1986) *Venoms of the Hymenoptera: Biochemical, Pharmacological and Behavioural Aspects*. Academic Press, London, 161-307.

POLIKARPOV, I., OLIVA, G., CASTELLANO, E. E., GARRATT, R., ARRUDA, P., LEITE, A. & CRAIEVICH, A. (1998) *Nucl. Instrum. Methods*, **405**, 159-164.

POLIKARPOV, I., PERLES, L. A., DE OLIVEIRA, R. T., OLIVA, G., CASTELLANO, E. E., GARRATT, R. & CRAIEVICH, A. (1998) *J. Synchrotron Rad.*, **5**, 72-76.

POUNY, Y., RAPAPORT, D., MOR, A., NICOLAS, P. & SHAI, Y. (1992) *Biochemistry*, **31**, 12416-12423.

ROHL, C. A. & BALDWIN, R. L. (1998) *Methods in Enzimology*, **295**, 1-27.

SALI, A. & BLUNDELL, T. L. (1993) *J. Mol. Biol.*, **234**, 779-815.

SANSOM, M. S. (1993) *Eur. Biophys. J.*, **22**, 105-124.

SEGREST, J. P., DE LOOF, H., DOHLMAN, J. G., BROUILLETTE, C. G. & ANANTHARAMAIAH, G. M. (1990) *Proteins*, **8**, 103-117.

SHAI, Y. (1994) *Toxicology*, **87**, 109-129.

SHAI, Y. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, **1462**, 55-70.

STEINER, H., HULTMARK, D., ENGESTROM, A., BENNICHI, H. & BOMAN, H. G. (1981) *Nature*, **292**, 246-248.



SZOKA, F. & PAPAHAADJOPOULOS, D. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **75**, 4194-4198.

TERWILLIGER, T. C., & EISENBERG, D. (1982a). *J. Biol. Chem.*, **257**, 6010-6015.

TERWILLIGER, T. C., & EISENBERG, D. (1982b). *J. Biol. Chem.*, **257**, 6016-6022.

VETTER, R. S. & VISSCHER, P. K. (1998) *International Journal of Dermatology*, **37**, 481-496.

WAKAMATSU, K., OKADA, A., MIYAZAWA, T., OHYA, M. & HIGASHIJIMA, T. (1992) *Biochemistry*, **31**(24), 5654-5660.

YANG, L., HARROUN, T. A., WEISS, T. M., DING, L. & HUANG, H. W., (2001) *Biophys. J.* **81**(3), 1475-1485.



APÊNDICE A

CRISTALIZAÇÃO

INTRODUÇÃO

Até 1911, a Cristalografia estudava apenas a simetria dos cristais, os índices de Miller de suas faces, as dimensões relativas das celas unitárias e algumas propriedades físicas, como índices de refração e densidade. Após 1911, a Cristalografia passou a ter por objetivo o conhecimento da estrutura dos materiais, independentemente do seu estado físico e de sua origem, e das relações entre essa estrutura e suas propriedades. Esta nova definição se tornou possível em virtude da primeira experiência de difração de raios X realizada no laboratório de Max von Laue que teve como resultado duas descobertas fundamentais: a natureza ondulatória eletromagnética dos raios X e a natureza descontínua da matéria, estabelecendo dessa forma o fato de todos os materiais serem constituídos por átomos e/ou moléculas. Nos cristais, estes se apresentam distribuídos periodicamente formando uma rede tridimensional própria para a difração de raios X, cujo comprimento de onda é da ordem de $1\text{\AA}$ (<http://www.lnls.br/sbcr>; Lenhninger, 1995).

Os métodos cristalográficos permitem determinar as posições relativas de todos os átomos que constituem a molécula (estrutura molecular) e a posição relativa de todas as moléculas na cela unitária do cristal. Entretanto foi necessário desenvolver métodos adequados para a determinação da estrutura cristalina e molecular de moléculas com cerca de 200 átomos e de proteínas, que podem ter milhares de átomos. Distingue-se, então, duas áreas com metodologias próprias: Cristalografia de Pequenas Moléculas e Cristalografia de Proteínas, melhor detalhada a seguir.

A Cristalografia, usando técnicas de difração de raios X em monocristais, é útil para a investigação da estrutura tridimensional de macromoléculas biológicas, como proteínas, RNAs, vírus, polissacarídeos e



polinucleotídeos, para posterior correlação de estrutura e função das mesmas (Giacovazzo, 1992).

Apesar dos cristais de proteínas serem conhecidos desde o início do século XX, apenas por volta de 1960 as primeiras estruturas cristalográficas, de mioglobina e hemoglobina, foram elucidadas através de técnicas de substituição isomórfica. A partir dessa época, vários avanços teóricos e tecnológicos foram obtidos, entre eles, o uso de dispersão anômala, substituição molecular e o desenvolvimento de técnicas de oscilação nas coletas de dados de cristais com grandes dimensões de cela. No final de 1970, o crescimento do potencial computacional permitiu o refinamento em espaço recíproco, ao mesmo tempo em que se introduzia o uso de programas gráficos que permitiram a interpretação dos mapas de densidade eletrônica e dos modelos construídos. Em anos mais recentes, tornou-se disponível o uso da radiação síncrotron e dos detectores em duas dimensões que tornaram a coleta de dados um procedimento de rotina (Giacovazzo, 1992).

Os principais passos envolvidos na resolução da estrutura, a nível atômico, de uma macromolécula biológica estão mostrados a seguir (Ducruix, & Giegé, 1999).



É no Brookhaven Protein Data Bank, PDB, que são depositadas as coordenadas das estruturas macromoleculares resolvidas. Ultimamente o número de estruturas disponíveis resolvidas por RMN tem aumentado muito em comparação às resolvidas por cristalografia de raios X. Isso provavelmente se deve aos problemas encontrados no processo de cristalização, um dos passos mais incertos da determinação de estruturas de proteínas (Giacovazzo, 1992).

PRINCÍPIOS DA CRISTALIZAÇÃO

As macromoléculas biológicas (proteínas, vírus, RNA, DNA) são polímeros de aminoácidos ou nucleotídeos, os quais ficam enovelados em uma estrutura tridimensional principalmente devido a interações dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio, interações de van der Waals, algumas ligações covalentes e, eventualmente, pontes salinas entre resíduos carregados.

Quando o material orgânico presente em uma determinada solução precipita, suas moléculas procuram um estado de mais baixa energia livre. Isso é acompanhado pelo empacotamento das mesmas em um arranjo tridimensional regular. Em outras palavras, um cristal cresce (Drenth, 1994).

Os cristais de macromoléculas biológicas são diferentes dos cristais de pequenas moléculas (como os de Cu, Al, Ag e metais alcalinos) em vários aspectos. Podem diferir em tamanho: cristais de macromoléculas são normalmente bem menores, dificilmente excedendo 1mm^3 em volume. Outra diferença é com relação à fragilidade acentuada dos cristais de macromoléculas biológicas, consequência das fracas interações (ligações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio) entre as moléculas dentro da rede cristalina e do alto conteúdo de solvente nestes cristais (de 20% a mais de 80%). Mas, o alto conteúdo de solvente tem consequências úteis, pois os canais de solvente nos cristais de macromoléculas biológicas permitem a difusão de pequenas moléculas, uma propriedade usada na preparação de derivados isomorfos e de complexos binários de proteína e ligante (Ducruix, & Giegé, 1999).



Outra característica dos cristais de macromoléculas biológicas é a grande dimensão de suas celas unitárias, se comparadas com as dimensões das celas unitárias das pequenas moléculas. Cristais de macromoléculas biológicas podem ter parâmetros de cela unitária de até algumas dezenas de milhares de ângstrons (Usha *et al*, 1984).

Para um planejamento racional das condições de cristalização é necessário o controle dos parâmetros envolvidos. A seguir, na Tabela 1A, são descritos os principais parâmetros a serem controlados em um experimento de cristalização de macromolécula biológica.

Tabela 1A. Alguns parâmetros que afetam a cristalização de macromoléculas biológicas.

Físico-químicos:

Supersaturação (concentração de macromoléculas e precipitantes)

Flutuações no pH e na temperatura

Tempo (cinética do equilíbrio e crescimento)

Força iônica e pureza dos reagentes

Difusão e convecção

Volume e geometria da amostra

Efeitos da densidade e viscosidade (diferenças entre o cristal e líquido-mãe)

Partículas sólidas, efeitos de parede e interface

Pressão, campos elétricos e magnéticos

Vibrações e som

Ligação de substratos, cofatores, íons

Biológicos:

Dificuldade de obtenção da maioria das moléculas biológicas

Contaminação por bactérias

Fontes biológicas e estado fisiológico de organismos ou células

SOLUBILIDADE E SUPERSATURAÇÃO

Uma macromolécula biológica segue as mesmas leis da termodinâmica, como qualquer outro tipo de molécula (inorgânica ou orgânica) no que se refere à supersaturação, nucleação, e crescimento de cristais (Boistelle & Astier, 1988). Todavia, macromoléculas biológicas apresentam

peculiaridades, porque as interações necessárias para solubilizá-las num solvente são similares, e podem ser competitivas com as interações intermoleculares que são responsáveis pela estrutura tridimensional da macromolécula (Ducruix & Giegé, 1992).

A solubilidade de macromoléculas biológicas é definida também pelas características do solvente. Como o solvente consiste usualmente de água pura ou um tampão adequado no qual são controlados fatores como pH e força iônica (sais), eventualmente estes compostos podem afetar a solubilidade da macromolécula biológica.

Proteínas podem ser consideradas polieletrólitos capazes de se dissolverem em água por apresentarem as cadeias laterais hidrofóbicas preferencialmente no seu interior, enquanto as cadeias laterais hidrofílicas se localizam principalmente na sua superfície.

A estabilidade das macromoléculas biológicas em solução baseia-se na competição das interações solvente-soluto com interações intramoleculares as quais são necessárias para manter a estrutura da macromolécula. O balanço das interações que controlam a solubilidade e/ou a conformação de uma macromolécula podem ser modificadas por (von Hippel & Schleich, 1969): temperatura, pH, sais, competidores de ligações de hidrogênio, aditivos hidrofóbicos e solventes orgânicos.

DIAGRAMAS DE FASE DE MACROMOLÉCULAS BIOLÓGICAS

Para crescer cristais de qualquer composto, as moléculas ou íons devem ser trazidos a um estado de supersaturação, estado que é termodinamicamente instável. Disto segue que, o conhecimento das solubilidades macromoleculares é um pré-requisito para o controle das condições de cristalização. Assim, como as bases teóricas da solubilidade são ainda controversas, especialmente no que tange efeitos dos sais, os dados sobre a solubilidade quase sempre se originam de determinações experimentais. Nos últimos anos, métodos quantitativos permitiram tais determinações usando pequenas quantidades de proteína (Mikol & Giegé,

Apêndice A



1989; Riès-Krautt & Ducruix, 1989). O principal resultado destes métodos foi a demonstração experimental do comportamento da solubilidade, enfatizando a importância da determinação de diagramas de fase para o planejamento racional de experimentos de crescimento de cristais de macromoléculas biológicas. Um diagrama deste tipo está representado na Figura 1A, e compreende as seguintes zonas:

(a) Curva de solubilidade (**S**): separa as zonas supersaturada e hiposaturada. Em um experimento onde as concentrações do agente de cristalização e da macromolécula biológica correspondem às condições da curva S, a solução saturada da macromolécula está em equilíbrio com a macromolécula cristalizada. Isto corresponde à situação ao final do processo de crescimento do cristal a partir de uma solução supersaturada, ou da dissolução de cristais em uma solução hiposaturada.

(b) Abaixo da curva de solubilidade: a solução está hiposaturada e a macromolécula biológica nunca irá cristalizar, visto que as condições termodinâmicas estão estáveis.

(c) Acima da curva de solubilidade: a concentração da macromolécula biológica é maior que a concentração no equilíbrio para uma dada concentração salina. Isto corresponde a uma zona de supersaturação. Dependendo da cinética para se atingir o equilíbrio e do nível de supersaturação, esta região pode ser dividida em três zonas: (**P**) zona de precipitação, onde o excesso de macromolécula imediatamente se separa da solução em um estado amorfo; (**N**) zona de nucleação, onde o excesso da macromolécula biológica se separa sob a forma cristalina; (**M**) zona metaestável, onde a solução supersaturada pode não nuclear, ou seja, pode não gerar cristais, por um longo período de tempo, a menos que a solução seja mecanicamente perturbada ou que uma semente (um pequeno cristal) seja introduzida, processo conhecido como semeadura.



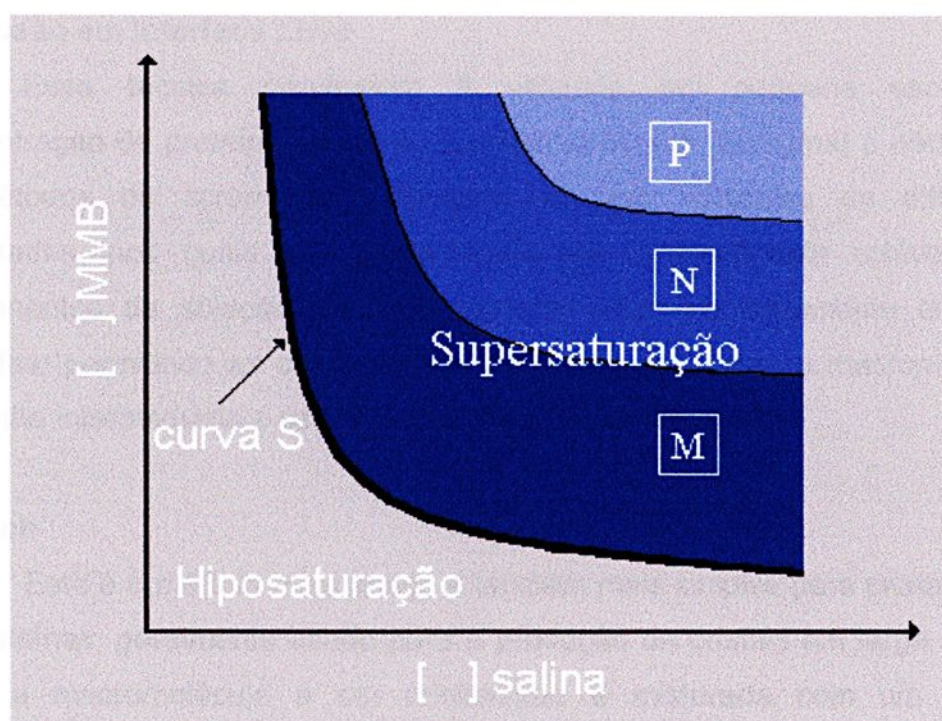


Figura 1A. Descrição esquemática de um diagrama bidimensional da solubilidade de uma macromolécula biológica (**P**: zona de precipitação; **N**: zona de nucleação; **M**: zona metaestável; **curva S**: curva de solubilidade).

TÉCNICAS DE CRISTALIZAÇÃO

As técnicas mais utilizadas na cristalização de macromoléculas biológicas são: Diálise, Difusão em interface livre, Batch e Difusão de vapor (Ducruix & Giegé, 1992). A seguir cada método será discutido brevemente.

a) Diálise

O princípio deste método é o equilíbrio de pequenos solutos via membrana semi-permeável. A vantagem é sua reversibilidade: se a proteína precipita ou forma cristais não adequados, pode ser redissolvida por diálise contra uma solução sem precipitante. Isto também é útil quando o processo de cristalização requer uma mudança de pH. Por outro lado, precipitantes de peso molecular alto não podem ser utilizados.

b) Difusão em Interface Livre

Essa técnica geralmente é utilizada em pequena escala (a concentração de proteína usada é razoavelmente alta (50mg/ml) e não segue os métodos de *screening*. Consiste de dois solventes de diferentes densidades, nos quais a macromolécula não é igualmente solúvel. Os componentes da solução de cada camada difundem lentamente entre as camadas, permitindo as condições de supersaturação para a macromolécula na região intermediária e os cristais se formam nessa região.

c) Batch

Este é o método mais antigo e também mais simples para cristalização de proteínas, geralmente usado para a produção de cristais em larga escala. Nele, a macromolécula a ser cristalizada é misturada com um agente cristalizante numa concentração tal, que permita atingir a supersaturação instantaneamente.

Um fator que limita a aplicação desse método é a alta quantidade de amostra da macromolécula biológica necessária.

d) Difusão de Vapor

O princípio da cristalização por difusão de vapor está no equilíbrio quase estático de duas soluções, cujas concentrações do agente precipitante são diferentes.

Uma gota contendo a macromolécula biológica a ser cristalizada em tampão e agentes cristalizantes, é equilibrada contra um reservatório, no qual a solução do agente de cristalização está a uma concentração mais alta do que na gota. O equilíbrio prossegue por meio da difusão das espécies voláteis (água e solventes orgânicos) até que a pressão de vapor na gota se iguale àquela do reservatório. Se o equilíbrio ocorre por meio de troca da água (da gota para o reservatório), isto leva a uma diminuição do volume da gota, e conseqüentemente, um aumento na concentração de todos os constituintes da gota de cristalização. Esses princípios se aplicam para os métodos de gotas penduradas, gotas sentadas e gotas sanduíches, mostrados na Figura 2A.





Figura 2A. Representação esquemática da gota pendurada, gota sentada e gota sanduíche.

O MÉTODO DA MATRIZ ESPARSA (FATORIAL)

Com o aumento do número de macromoléculas biológicas cristalizadas com sucesso, tornou-se óbvio que muitas das condições de cristalização assemelhavam-se, ou seja, havia uma concentração de resultados usando-se um número determinado de precipitantes, tampões e aditivos. Isto levou à proposição de diversos métodos de cristalização (Carter & Carter, 1979), nos quais um número limitado de condições de cristalização eram tentados, usando-se pequenas quantidades da macromolécula biológica. A partir da observação dos resultados preliminares destes experimentos era possível determinar qual tampão, aditivo e agente precipitante seriam os mais favoráveis e a partir daí proceder-se a sucessivos melhoramentos até se conseguir cristais adequados.

Dentro deste raciocínio a Dra. Jaru Jancarick da UC Berkeley propôs o método da matriz esparsa (Jancarick & Kim, 1991), no qual diversas condições diferentes são tentadas para se cristalizar a macromolécula biológica.

No método da matriz esparsa foram escolhidas três categorias de parâmetros que afetam a cristalização como variáveis principais: pH e materiais tampões, aditivos e agentes precipitantes. Por tentativa e erro a matriz multimensional foi simplificada eliminando-se as condições que podiam ser

parcialmente representadas por resultados de outras condições. As 50 condições finais estão listadas na Tabela 2A, no final deste apêndice.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOISTELLE, R. & ASTIER, J. P. (1988) *J. Cryst. Growth.*, **90**, 14.
- CARTER, C. W., Jr. & CARTER, C. W. (1979). *J. Mol. Biochem.*, **254**, 12219.
- DRENTH, J. (1994) *Principles of protein X-ray crystallography*. Ed. Springer-Verlag. 1-181, 211-230, 242-263.
- DUCRUIX, A. & GIEGÉ, R. (1999) *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins-A Practical Approach*, 2^a ed., Oxford University Press, 121-146.
- GIACOVAZZO, C. (1992) *Fundamentals of Crystallography*. Oxford Science Publications, 563-572.
- JANCARIK, J. & KIM, S., -H. (1991) *J. Appl. Cryst.*, **24**, 409-411.
- LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M. (1995) *Princípios de Bioquímica*. 2ed., Editora Edgard Blucher, 131-140.
- MIKOL, V. & GIEGÉ, R. (1989) *J. Crystal Growth*, **97**, 324.
- RIÈS-KRAUTT, M. M. & DUCRUIX, A. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 745.
- USHA, R. JOHNSON, J. E., MORAS, D., THIERRY, J. -C., FOURME, R. & KAHN, R. (1984) *J. Appl. Cryst.*, **17**, 147.
- VON HIPPEL, P. H. & SCHLEICH, T. (1969) *Accounts of Chemical Research*. **2**, 257.



Tabela 2A. Soluções de Cristalização.

	SAL	TAMPÃO	PRECIPITANTE
1	0,05M Cloreto de Cálcio	0,1M Acetato de Sódio	30% MDP
2	---	---	0,4M Tartarato de Sódio e Potássio
3	---	---	0,4M Fosfato de Amônio
4	---	0,1M Tris	2,0M Sulfato de Amônio
5	0,2M Citrato de Sódio	0,1M HEPES	30% MDP
6	0,2M Cloreto de Magnésio	0,1M Tris	30% PEG 4K
7	---	0,1M Cacodilato de Sódio	1,5M Acetato de Sódio
8	0,2M Citrato de Sódio	0,1M Cacodilato de Sódio	30% Isopropanol
9	0,2M Acetato de Amônio	0,1M Citrato de Sódio	30% PEG 4K
10	0,2M Acetato de Amônio	0,1M Acetato de Sódio	30% PEG 4K
11	---	0,1M Citrato de Sódio	1,0M Fosfato de Amônio
12	0,2M Cloreto de Magnésio	0,1M HEPES	30% Isopropanol
13	0,2M Citrato de Sódio	0,1M Tris	30% PEG 4K
14	0,2M Cloreto de Magnésio	0,1M HEPES	28% PEG 400
15	0,2M Sulfato de Amônio	0,1M Cacodilato de Sódio	30% PEG 8K
16	---	0,1M HEPES	1,5M Sulfato de Lítio
17	0,2M Sulfato de Lítio	0,1M Tris	30% PEG 4K
18	0,2M Acetato de Magnésio	0,1M Cacodilato de Sódio	25% PEG 8K
19	0,2M Acetato de Amônio	0,1M Tris	30% Isopropanol
20	0,2M Sulfato de Amônio	0,1M Acetato de Sódio	25% PEG 4K
21	0,2M Acetato de Magnésio	0,1M Cacodilato de Sódio	30% MDP
22	0,2M Acetato de Sódio	0,1M Tris	30% PEG 4K
23	0,2M Cloreto de Magnésio	0,1M HEPES	30% PEG 400
24	0,2M Cloreto de Cálcio	0,1M Acetato de Sódio	30% Isopropanol
25	0,1M Sulfato de Cádmio	0,1M Imidazol	1,0M Acetato de Sódio
26	0,2M Acetato de Amônio	0,1M Ácido Cítrico	30% MDP
27	0,2M Citrato de Sódio	0,1M HEPES	20% Isopropanol
28	0,2M Acetato de Sódio	0,1M Cacodilato de Sódio	30% PEG 8K



29	---	---	0,8M Tartarato de Sódio e Potássio
30	0,2M Sulfato de Amônio	---	30% PEG 8K
31	0,2M Sulfato de Amônio	---	30% PEG 4K
32	---	---	2,0M Sulfato de Amônio
33	---	---	4,0M Formiato de Sódio
34	---	0,1M Acetato de Sódio	2,0M Formiato de Sódio
35	---	0,1M HEPES	0,8M Fosfato de Sódio e Potássio
36	---	0,1M Tris	8% PEG 8K
37	---	0,1M Acetato de Sódio	8% PEG 4K
38	---	0,1M HEPES	1,4M Citrato de Sódio
39	---	0,1M HEPES	2% PEG 400 + 2,0M Sulfato de Amônio
40	---	0,1M Citrato de Sódio	20% Isopropanol + 20% PEG 4K
41	---	0,1M HEPES	20% Isopropanol + 20% PEG 4K
42	0,05M Fosfato de Potássio	---	20% PEG 8K
43	---	---	30% PEG 1,5K
44	---	---	0,2M Formiato de Magnésio
45	0,2M Acetato de Zinco	0,1M Cacodilato de Sódio	18% PEG 8K
46	0,2M Acetato de Cálcio	0,1M Cacodilato de Sódio	18% PEG 8K
47	---	0,1M Acetato de Sódio	2,0M Sulfato de Amônio
48	---	0,1M Tris	2,0M Sulfato de Amônio
49	1,0 M Sulfato de Lítio	---	2% PEG 8K
50	0,5 M Sulfato de Lítio	---	15% PEG 8K



APÊNDICE B

DICROÍSMO CIRCULAR

INTRODUÇÃO

Uma característica comum a uma grande variedade de biopolímeros é a existência de estrutura secundária helicoidal. As α -hélices de polipeptídeos e proteínas, as hélices simples, duplas e triplas de polinucleotídeos e as conformações helicoidais de alguns polissacarídeos são tanto únicas em cada classe de compostos quanto importantes para sua função biológica. A detecção de tais estruturas e a medição da quantidade das mesmas, desempenham um papel importante na compreensão da função dessas moléculas (van Holde, 1975).

Muitas são as técnicas que utilizam princípios físicos para elucidarem as propriedades de biopolímeros, mas poucas oferecem essas informações a partir da assimetria estrutural de moléculas dissolvidas. Isso é obtido pela resposta das moléculas à luz polarizada (van Holde, 1975).

POLARIZAÇÃO DA LUZ

Uma onda eletromagnética é caracterizada pela orientação e amplitude de seus campos elétrico e magnético componentes. Os vetores de ambos os campos são perpendiculares entre si e à direção de propagação (Figura 1B-superior). É por meio de sua orientação com relação a um sistema externo de referência (o aparelho, uma molécula) que descrevemos a polarização (van Holde, 1975).

A luz circularmente polarizada (Figura 1B-inferior) percorre um caminho helicoidal na direção da propagação. Pode ser circularmente polarizada à direita ou à esquerda, dependendo do sentido de rotação com relação à direção de propagação. Por convenção, considera-se luz circularmente



polarizada à direita, quando o vetor elétrico, visto apontando em direção à fonte, gira num sentido horário (van Holde, 1975).

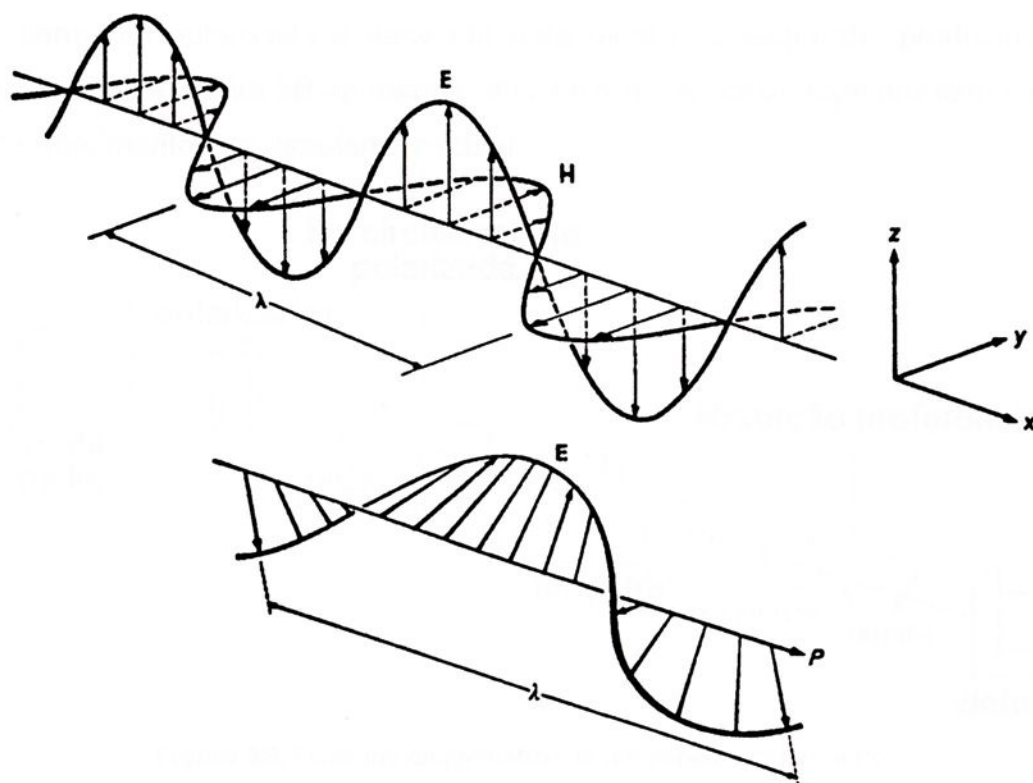


Figura 1B. Superior: vetores campo elétrico e magnético componentes de uma onda eletromagnética. Inferior: diagrama esquemático que mostra o componente elétrico da luz circularmente polarizada à direita.

A absorção diferenciada da radiação polarizada em função da frequência é chamada Dicroísmo. Quando aplica-se luz circularmente polarizada, temos Dicroísmo Circular (*Circular Dichroism-CD*) (Rodger & Nordén, 1997), apresentado resumidamente na Figura 2B.

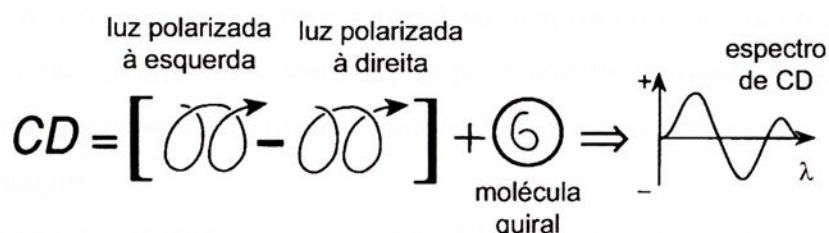


Figure 2B. Ilustração esquemática do dicroísmo circular.

Ao atravessar uma amostra formada por moléculas opticamente ativas (com exceção da glicina, todos os aminoácidos são quirais; consequentemente, a estrutura secundária de uma macromolécula biológica também é quiral), a luz circularmente polarizada é desviada para direita ou esquerda, produzindo o sinal de CD. A Figura 3B apresenta um esquema do espectropolarímetro usado nos experimentos de dicroísmo circular.

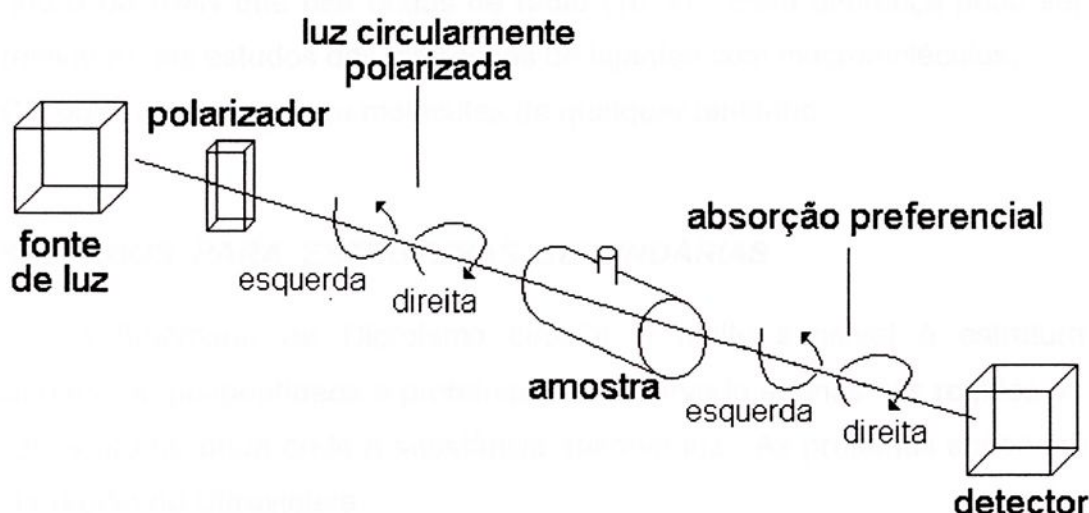


Figura 3B. Desenho esquemático de um espectropolarímetro.

CARACTERÍSTICAS DO DICROÍSMO CIRCULAR

As aplicações do Dicroísmo circular incluem (http://www.ap-lab.com/circular_dichroism.htm):

- determinar o enovelamento de uma macromolécula biológica (estrutura secundária e terciária);
- comparar as estruturas de uma mesma proteína obtida de fontes diferentes ou comparar as estruturas de mutantes da mesma proteína;
- estudar a estabilidade conformacional de uma macromolécula biológica sob estresse, sua estabilidade térmica, de pH e contra desnaturantes;
- determinar se interações proteína-proteína ou outras interações alteram sua conformação.

Há muitas vantagens em usar-se CD para estudar sistemas biológicos (Rodger & Nordén, 1997):



- os experimentos são simples e rápidos de serem realizados;
- os experimentos são realizados em solução. Isso é importante, pois muitas vezes o processo de cristalização não é bem sucedido;
- requer menores concentrações da amostra que os experimentos de RMN;
- a escala de tempo intrínseca de um medida de CD (10^{-15} s para absorção de um fóton de UV) é definida pela energia dos fótons usados; é muito menor que a de RMN que usa ondas de rádio (10^{-9} s). Essa diferença pode ser relevante nos estudos das interações de ligantes com macromoléculas;
- CD pode ser usado para moléculas de qualquer tamanho.

RESULTADOS PARA ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS

O fenômeno de Dicroísmo circular é muito sensível à estrutura secundária de polipeptídeos e proteínas e é observado apenas nas regiões de comprimento de onda onde a substância absorve luz. As proteínas absorvem luz na região do Ultravioleta.

O espectro UV de proteínas é geralmente dividido em UV-próximo (*near UV*), e UV-distante (*far UV*). O UV-próximo, de 250 à 300nm, é também descrito como região aromática. O UV-distante (<250nm) é regido principalmente pelas transições (Figura 4B) da cadeia peptídica principal da proteína, que são do tipo (Rodger & Nordén, 1997):

- $n \rightarrow \pi^*$ centrada por volta de 220 nm; envolve elétrons não-ligados do O da carbonila.
- $\pi \rightarrow \pi^*$ centrada por volta de 190 nm; envolve os elétrons π da carbonila.

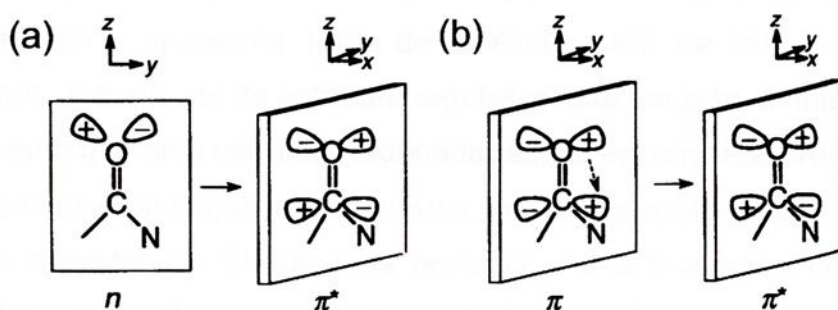


Figura 4B. Ilustrações esquemáticas das transições em peptídeos: (a) $n \rightarrow \pi^*$ e (b) $\pi \rightarrow \pi^*$.

A intensidade e a energia das transições dependem dos ângulos Φ e Ψ . Estes ângulos permitem um certo grau de liberdade de rotação às cadeias laterais, apesar das ligações peptídicas serem planares e rígidas. Consequentemente, as cadeias laterais podem formar pontes de hidrogênio. Surgem, assim, estruturas secundárias do tipo α -hélice, folha- β e volta.

A Figura 5B apresenta os ângulos Φ e Ψ e as transições responsáveis pelos sinais de CD.

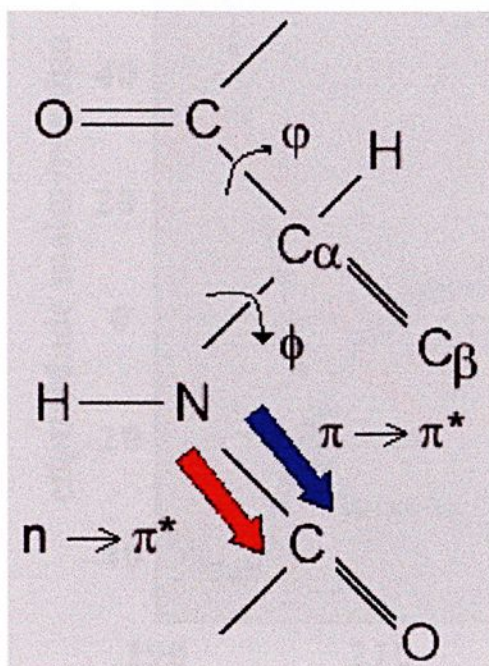


Figura 5B. Desenho esquemático de uma ligação peptídica, com os ângulos Φ e Ψ e as transições responsáveis pelos sinais de CD.

Espectros de CD distintos foram descritos para conformações secundárias "puras", a partir de solução de poli-L-lisina que, sob temperaturas e pHs diferentes, apresenta 100% de α -hélice, 100% de folha- β e 100% de *random coil*. A ausência de estrutura regular resulta em zero de intensidade de CD, enquanto que uma estrutura ordenada resulta em um espectro que contém sinais positivos e/ou negativos (http://www.ap-lab.com/circular_dichroism.htm).

O espectro de CD de uma proteína nativa é a soma dos múltiplos fracionários de cada componente estrutural. Assim, ele determina a porcentagem de cada estrutura secundária na molécula, mas não determina quais resíduos de aminoácidos estão envolvidos na formação das estruturas.

A Figura 6B ilustra os espectros característicos das estruturas secundária conhecidas (http://www.ap-lab.com/circular_dichroism.htm).

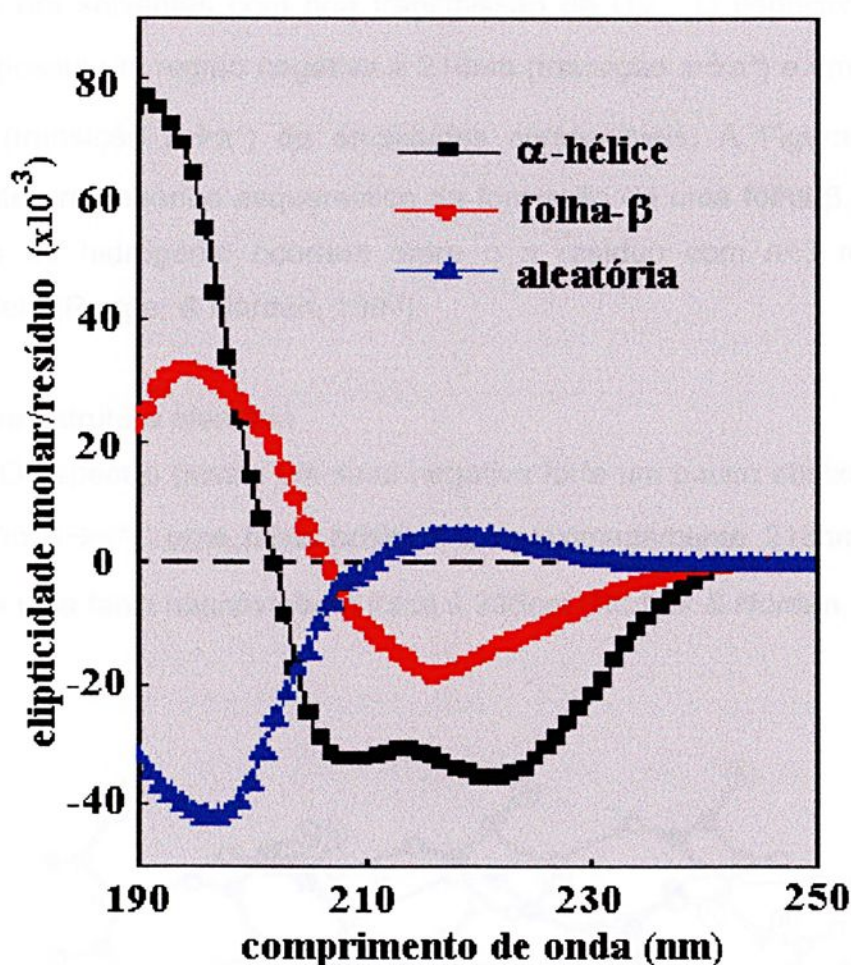


Figura 6B. Espectros de CD de estruturas secundárias "puras".

▪ CD de α -hélice

É a estrutura secundária dominante em muitas proteínas, inclusive nas globulares. Seus espectros são caracterizados por 2 bandas negativas à 222nm (transição $n \rightarrow \pi^*$) e 208nm (transição $(\pi \rightarrow \pi^*)_{\text{paralela}}$), com magnitudes aproximadamente iguais e uma banda positiva em 190nm (transição $(\pi \rightarrow \pi^*)_{\text{perpendicular}}$). A Figura 7B-superior apresenta um desenho esquemático da formação de uma α -hélice, na qual a ligação de hidrogênio ocorre entre o n resíduo e o $n+4$ resíduo e é intracadeia (Rodger & Nordén, 1997).

▪ CD de folha- β

A caracterização espectroscópica de folhas- β é mais difícil, pois proteínas que são formadas por esse tipo de estrutura secundária são menos solúveis em solventes com boa transmissão de UV. O espectro de CD de folha- β possui um região negativa à 216nm (transição $\pi \rightarrow \pi^*$) e uma positiva à 195nm (transição $n \rightarrow \pi^*$) de amplitudes comparáveis. A Figura 7B-inferior apresenta um desenho esquemático da formação de uma folha- β , na qual as ligações de hidrogênio ocorrem entre o n resíduo com $n+3$ resíduo e é intercadeia (Rodger & Nordén, 1997).

▪ CD de estrutura aleatória

O espectro possui um sinal negativo forte um pouco abaixo de 200nm (transição $n \rightarrow \pi^*$), uma faixa positiva a aproximadamente 218nm (transição $\pi \rightarrow \pi^*$) e uma faixa negativa bem fraca à 235nm (Rodger & Nordén, 1997).

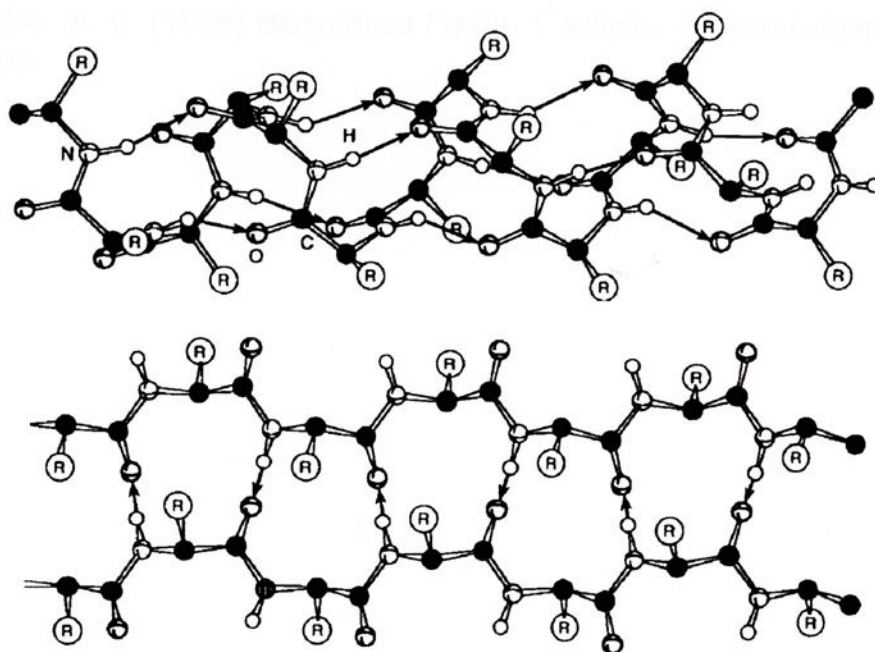


Figura 7B. Desenhos esquemáticos de uma α -hélice (*superior*) e folha- β (*inferior*).

DICROÍSMO CIRCULAR DE PEPTÍDEOS

CD é aplicado extensivamente à caracterização estrutural de peptídeos para (http://broccoli.mfn.ki.se/pps_course_96/ss_960723_21.html):

- monitorar as mudanças conformacionais (por exemplo, monômero-oligômero, adição de substrato ligante, desnaturação, etc.);
- estimar o conteúdo de estrutura secundária (por exemplo, tal peptídeo é 25% helicoidal sob determinadas condições);

Já foram apresentados espectros de CD de peptídeos em vários sistemas de solventes, tais como, trifluoroetanol (TFE), hexafluoroisopropanol (HFIP) e SDS (Dodecil sulfato de Sódio), famosos promotores de hélice.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

RODGER, A. & NORDÉN, B. (1997) *Circular dichroism and linear dichroism*. 1ª edição. Oxford University Press Inc., 150pp.

VAN HOLDE, K. E. (1975) *Bioquímica Física*. 1ª edição. Editora Edgar Blücher Ltda. 195pp.



APÊNDICE C

FLUORESCÊNCIA

PRINCÍPIOS BÁSICOS

Luminescência é uma propriedade físico-química de substâncias que, ao absorverem um fóton, têm seus elétrons elevados a um estado eletrônico excitado e, no retorno ao estado eletrônico fundamental, emitem um fóton de energia menor. A emissão resultante da volta para o estado fundamental com a mudança no *spin* dos elétrons é chamada de fosforescência e sem mudança no *spin*, fluorescência.

Para que se possa verificar a emissão fluorescente é necessário a presença de um fluoróforo, seja natural ou inserido, no sistema. Os fluoróforos possuem anéis aromáticos, cujos elétrons são excitados quando expostos a um comprimento de onda específico. São exemplos de fluoróforos: quinina, fluoresceína, antracina e perileno.

A absorção e emissão de luz são bem ilustradas no diagrama de nível de energia de Jablonski (Figura 1C) (Jablonski *et al.* 1935). O estado fundamental, primeiro e segundo estados eletrônicos são descritos como S_0 , S_1 e S_2 respectivamente. Esses níveis eletrônicos de energia, os fluoróforos, são divididos em subníveis de energia vibracional descrito por 0, 1, 2, etc... As transições entre os níveis eletrônicos de energia são verticais (Lakowicz, 1983).

A absorção da luz, que ocorre em 10^{-15} segundos, leva a molécula a uma transição de um estado energético baixo a um nível de maior energia vibracional (S_1 ou S_2). No estado excitado singlete (S_1), o elétron do orbital de alta energia tem a orientação *spin* oposta ao do elétron da órbita de menor energia e são ditos pareados. Após a excitação, com poucas exceções, os elétrons decaem para o nível de mais baixa energia vibracional do S_1 . Esse processo é chamado de conversão interna e geralmente ocorre a 10^{-12} segundos. Se o tempo de vida de emissão fluorescente é de 10^{-10} segundos, a conversão interna já foi completada até a emissão.



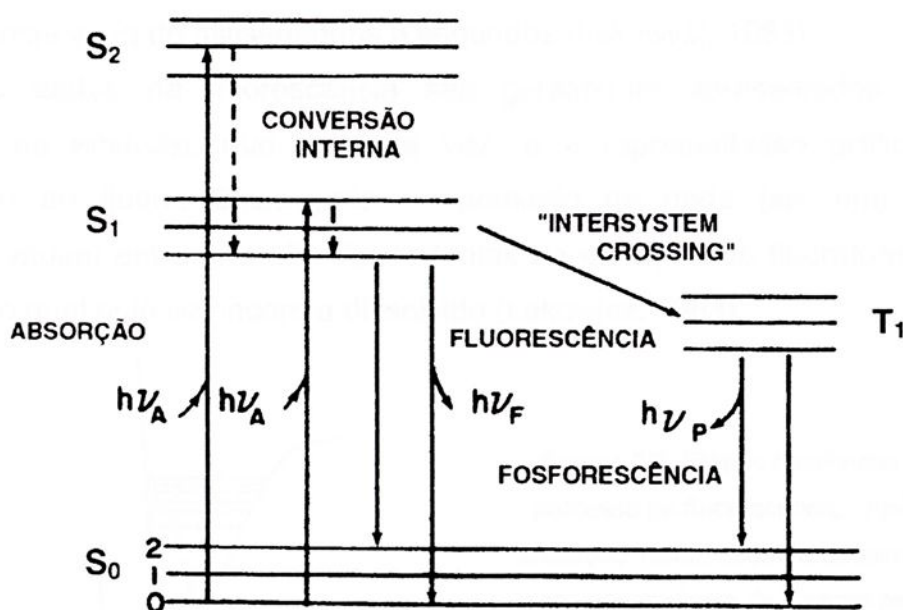


Figura 1C. Diagrama de Jablonski.

Assim, a emissão de fluorescência resulta de um decaimento do estado excitado equilibrado termicamente S₁ (singlete) para o estado fundamental (Figuras 1C e 2C). As moléculas em S₁ podem também sofrer uma conversão para o estado Tripleto (T₁) cujos elétrons não são pareados, ou seja, seus *spins* têm a mesma orientação. O retorno do estado tripleto necessita da inversão do *spin* dos elétrons para voltar ao estado fundamental. A fosforescência resulta dessa emissão e tem seu comprimento de emissão maior, ou seja, de mais baixa energia que a fluorescência (Lakowicz, 1983).

A fluorescência é a emissão de fótons resultante do retorno de um elétron pareado a um orbital de energia menor (estado fundamental). A transição é permitida nas leis de mecânica quântica e o fluxo de emissão é tipicamente próximo a 10^8 sec^{-1} . Essa razão de emissão resulta em um tempo de vida da fluorescência perto de 10^{-8} sec ou 10 nsec. O tempo de vida da fluorescência é a média do período de tempo em que o fluoróforo (substância que emite fluorescência) permanece excitado. A fosforescência é a emissão resultante da transição de estados de diferente multiplicidade, como o retorno

do estado tripleto para o fundamental. O típico tempo de vida da emissão de fosforescência varia de milissegundos a segundos (Lakowicz, 1983).

Os dados de fluorescência são geralmente apresentados como espectros de emissão, que por sua vez, é a representação gráfica da intensidade de fluorescência pelo comprimento de onda (em nm). Os espectros variam entre si e são dependentes da estrutura do fluoróforo e do solvente no qual este se encontra dissolvido (Lakowicz, 1983).

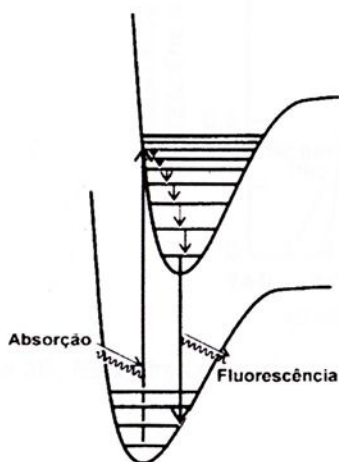


Figura 2C. Etapas envolvidas no processo de fluorescência. Após a absorção inicial, ocorre o decaimento com transferência de energia para a vizinhança. A transição radiativa (absorção) é do estado fundamental para o estado eletrônico superior.

FLUORESCÊNCIA DE PROTEÍNAS

Nas proteínas geralmente estão presentes aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina e fenilalanina) que são sondas intrínsecas naturais de fluorescência. Em particular, os estudos de fluorescência dos aminoácidos tirosina e triptofano fornecem informações sobre as variações ocorridas no microambiente destes resíduos. A metodologia é vantajosa por oferecer resultados satisfatórios sobre alterações na conformação terciária da proteína, com a vantagem de utilizar quantidades baixas desta.

A absorção das proteínas em 280nm é devido aos resíduos de tirosina e triptofano. Em comprimentos maiores, como 295nm, a absorção é primariamente do resíduo de triptofano. Isso sugere que esse resíduo pode ser seletivamente excitado de 295 a 305nm, fato confirmado experimentalmente. A fenilalanina não é excitada na maioria das situações, pois tem um pico máximo de absorção próximo a 260nm. Assim o rendimento quântico desse resíduo é

muito pequeno e raramente sua emissão é observada. O espectro de emissão de fluorescência dos aminoácidos aromáticos é mostrado na Figura 3C. A emissão do resíduo de tirosina em água ocorre em 330nm e, relativamente, é insensível à polaridade do solvente. A emissão máxima do triptofano na água é de 348nm e é altamente dependente da polaridade do microambiente.

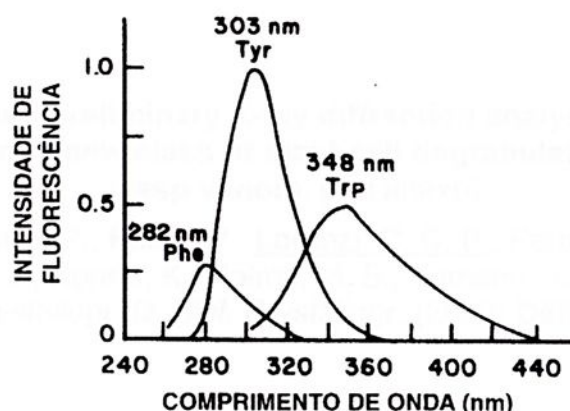


Figura 3C. Espectros de emissão de fluorescência dos aminoácidos aromáticos.

A fluorescência da maioria das proteínas é dominada pela emissão do resíduo triptofano. O núcleo indólico e seus derivados são muito sensíveis à polaridade do microambiente ou do solvente. Como consequência, o espectro de emissão do resíduo de triptofano pode refletir a polaridade do ambiente que o circunda. O espectro de emissão de fluorescência das proteínas é sensível à ligação de substratos, às reações de associação com supressores de fluorescência e à desnaturação de proteínas. A caracterização do ambiente do triptofano e, consequentemente da proteína, pode ser feita através de estudos da supressão de fluorescência intrínseca do triptofano (FIT) (Lakowicz, 1983).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

JABLONSKI, A. (1935) *Über den mechanismus des photolumineszenz von farbstoffphosphoren*. Z. Phys., **94**, 38-46.

LAKOWICZ, J. R. (1983) *Principles of fluorescence spectroscopy*. Plenum Press. 495pp.

APÊNDICE D

ARTIGOS

Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a eumenine mastoparan toxin: a new class of mast-cell degranulating peptide in the wasp venom. (em anexo)

Canduri, F., Delatorre, P., Fadel, V., Lorenzi, C. C. B., Pereira, J. H., Olivieri, J. R., Ruggiero Neto, J., Konno, K., Palma, M. S., Yamane, T., de Azevedo, W. F. Jr. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* (2000) **D56**, 1434-1436

Preliminary cryocrystallography analysis of an eumenine mastoparan toxin isolated from the venom of the wasp *Anterhynchium flavomarginatum micado*. (em anexo)

Delatorre, P., Olivieri, J. R., Ruggiero Neto, J., Lorenzi, C. C. B., Canduri, F., Fadel, V., Konno, K., Palma, M. S., Yamane, T., de Azevedo, W. F. Jr. *Biochimica et Biophysica Acta* (2001) **1545**, 372-376.

Anoplin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary wasp *Anoplius samariensis*. (em anexo)

Konno, K., Hisada, M., Fontana, R., Lorenzi, C. C. B., Naoki, H., Itagaki, Y., Miwa, A., Kawai, N., Nakata, Y., Yasuhara, T., Ruggiero Neto, J., de Azevedo Jr., W. F., Palma, M. S., Nakajima, T. *Biochimica et Biophysica Acta* (2001) **1550**, 70-80.



Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a eumenine mastoparan toxin: a new class of mast-cell degranulating peptide in the wasp venom

F. Canduri,^a P. Delatorre,^{a,b} V. Fadel,^{a,b,c} C. C. B. Lorenzi,^a J. H. Pereira,^a J. R. Olivieri,^a J. Ruggiero Neto,^a K. Konno,^d M. S. Palma,^d T. Yamane^e and W. F. de Azevedo Jr^{a*}^aDepartamento de Física, IBILCE, UNESP, CP 136, CEP 15054-000, São José Rio Preto, SP, Brazil, ^bCentro Universitário de Votuporanga, Votuporanga, SP, 15500-030, Brazil,^cDepartamento de Física, Faciba FEB, Barretos, SP, 14783-226, Brazil, ^dCEIS, Institute of Biosciences of Rio Claro, UNESP, CEP 13506-900, Rio Claro, SP, Brazil, and ^eDivision of Molecular Toxicology, Butantan Institute, São Paulo, SP, BrazilCorrespondence e-mail:
walterfa@df.ibilce.unesp.br

Mastoparans are tetradecapeptides found to be the major component of vespid venoms. A mastoparan toxin isolated from the venom of *Anterhynchium flavomarginatum micado* has been crystallized and X-ray diffraction data collected to 2.7 Å resolution using a synchrotron-radiation source. Crystals were determined to belong to the space group $P6_222$ ($P6_422$). This is the first mastoparan to be crystallized and will provide further insights into the conformational significance of mastoparan toxins with respect to their potency and activity in G-protein regulation.

Received 10 September 1999

Accepted 11 July 2000

1. Introduction

Several different bioactive peptides have been isolated from the venoms of wasps and hornets. The mastoparan toxins, the mast-cell degranulating peptides of the vespid venom, are tetradecapeptides and have been reported to be the major peptide in many species of hornet (Nakajima, 1984). Several such peptides have been characterized as causing the liberation of histamine, serotonin and other chemical substances mediating inflammation upon binding to plasma membranes. Some of these peptides also possess a potent haemolytic activity which acts in synergy with the lethal protein of the vespid venom (Ho & Hwang, 1991).

The action of these tetradecapeptides appears to involve multiple signal transduction pathways and may stimulate these activities via its effect on G proteins. Previous structural studies using circular dichroism (CD) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy revealed that mastoparans exhibit a random-coil form in aqueous solution, whereas these tetradecapeptides adopt the amphiphilic α -helix conformation in trifluoroethanol-containing aqueous solution (Chuang *et al.*, 1996). This conformational behaviour has also been observed for other phospholipid membrane-binding peptides (Higashijima *et al.*, 1983).

Especially interesting is the stimulation of phospholipase A_2 activity by mastoparans. Phospholipase A_2 s are perhaps the most ubiquitous enzymes in venoms (Giotto *et al.*, 1998; de Azevedo *et al.*, 1997, 1998, 1999; Ward *et al.*, 1998). They are found in the venoms of snakes, lizards and hornets. Several mastoparans can facilitate phospholipase A_2 activity, a behaviour similar to melittin. Mastoparans cause a 12-, 15- and 50-fold increase in the

production of arachidonic acid catalyzed by phospholipase A_2 from bee venom, eastern diamondback rattlesnake and porcine pancreas, respectively (Argiolas & Pisano, 1983).

A mastoparan toxin was isolated from the solitary wasp *A. flavomarginatum micado*, the most abundant eumenine wasp in Japan, and named eumenine mastoparan (Konno *et al.*, 2000). Solitary wasps paralyze insects or spiders with stinging venom and feed the paralyzed victims to their larvae. Accordingly, the venom should contain a variety of constituents acting on the nervous system. However, only a few constituents of the venom have been chemically characterized, despite the thousands of solitary wasp species inhabiting the earth. In the present work, the crystallization and preliminary X-ray analysis of the eumenine mastoparan (Ile-Asn-Leu-Leu-Lys-Ile-Ala-Lys-Gly-Ile-Ile-Lys-Ser-Leu-NH₂), a new class of mast-cell degranulating peptide, is reported in order to provide further insights into the conformational characteristics and the implication for its biological functions.

2. Materials and methods

2.1. Tetradecapeptide synthesis

The peptide was prepared by stepwise solid-phase synthesis using *N*-9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) chemistry with TGS-RAM resin (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) on a Shimadzu PSSM-8 peptide synthesizer. All Fmoc amino acids and the resin were purchased from Shimadzu Corp. Side-chain protective groups included *t*-butoxy for serine and *t*-butoxycarbonyl for lysine. Cleavage of the peptide-resin was performed by treatment with anisole/1,2-ethanedithiol/trifluoroacetic acid solution (5:1:94 by volume), using 10 ml

Table 1
Detailed X-ray diffraction statistics for synchrotron data from a crystal of EMP.

Resolution in range (Å)	No. of independent reflections	$I/\sigma(I)$	Redundancy	Completeness from all data (%)	$R_{\text{merge}}^{\dagger}$ in range from all data (%)
20.00–6.58	122	21.43	3.82	97.6	4.8
6.58–5.26	107	20.27	5.49	100.0	7.6
5.26–4.60	100	23.03	5.69	100.0	8.0
4.60–4.19	96	23.24	5.98	100.0	8.0
4.19–3.89	101	23.47	5.71	100.0	8.5
3.89–3.66	91	18.23	6.04	100.0	10.4
3.66–3.48	95	15.26	5.96	100.0	12.6
3.48–3.33	92	16.01	5.85	100.0	13.9
3.33–3.20	93	13.50	6.15	100.0	15.8
3.20–3.09	92	11.22	5.95	100.0	18.6
3.09–2.99	96	11.06	5.77	100.0	16.9
2.99–2.91	87	8.68	5.90	100.0	20.9
2.91–2.83	89	7.40	5.44	98.9	24.6
2.83–2.76	88	8.08	5.43	98.9	22.0
2.76–2.70	87	6.22	4.87	97.8	24.4
All reflections	1436	17.97	5.63	99.5	9.9

$R_{\text{merge}}^{\dagger} = 100 \sum_{hkl} \left(\sum_i |I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle| \right) / \sum_{hkl} I_{hkl}$, where $I_{hkl,i}$ is the intensity of an individual measurement of the reflection with indices h , k and l , and $\langle I_{hkl} \rangle$ is the mean intensity of that reflection.

per gram of resin at room temperature for 2 h. After filtering to remove the resin and ether extraction, the crude peptide was purified by semipreparative reverse-phase HPLC (CAPCELL PAK C18, 10 × 250 mm, 40% acetonitrile–water containing 0.1% trifluoroacetic acid). The homogeneity of the synthetic peptide was assessed by analytical HPLC and fast-atom bombardment mass spectral (FAB-MS) analysis.

2.2. Crystallization

The eumenine mastoparan (EMP) used in the crystallization experiments was dissolved in 50% trifluoroethanol-containing aqueous solution. Crystals of the EMP have been obtained under several different crystallization conditions using the hanging-drop vapour-diffusion and sparse-matrix methods (Jancarik & Kim, 1991). The best crystals were obtained after 2 d growth from

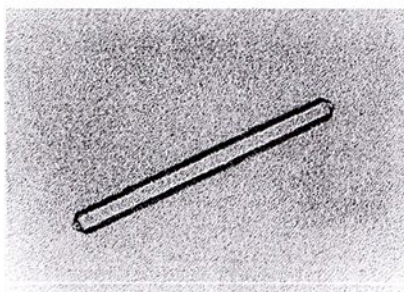


Figure 1
Photomicrograph of the hexagonal-shaped crystal of EMP.

of 281 K. Using an oscillation range of 2.0°, 30 images were collected and the raw X-ray diffraction data were processed to 2.7 Å resolution using the program *DENZO* and scaled with the program *SCALEPACK* (Otwinowski, 1993).

Autoindexing procedures combined with analysis of the X-ray diffraction pattern and averaging of equivalent intensities were used in the characterization of the Laue symmetry.

3. Results and discussion

Fig. 1 illustrates a photomicrograph of a hexagonal-shaped crystal of EMP isolated from the venom of *A. flavomarginatum micado* suitable for X-ray diffraction experiments, with average dimensions of about 0.1 × 0.1 × 0.8 mm. The crystal has the primitive hexagonal Laue lattice, space group $P6_22$ ($P6_22$), with unit-cell parameters $a = 43.32$ (2), $b = 43.32$ (2), $c = 79.86$ (2) Å. Assuming the asymmetric unit content to be two or three peptides of molecular weight of 1.65 kDa each, the possible V_M values are 2.84 and 1.89 Å³ Da⁻¹ (Matthews, 1968), respectively. Assuming a value of 0.74 cm³ g⁻¹ for the protein partial specific volume, the possible calculated solvent content in the crystal are 41% for two peptides in the asymmetric unit and 34.9% for three peptides in the asymmetric unit; the calculated crystal densities are 1.09 and 1.23 g cm⁻³, respectively. Detailed data-collection statistics for the synchrotron data are given in Table 1.

drops in which 2 µl of EMP solution (5 mg ml⁻¹) was mixed with an equal volume of reservoir solution. 0.1 M sodium acetate trihydrate pH 4.6 and 2.0 M sodium formate was used as the reservoir solution. A crystal was mounted in a borosilicate glass capillary tube for X-ray data collection.

X-ray diffraction data were collected at a wavelength of 1.547 Å using the Synchrotron Radiation Source (Station PCr, Laboratório Nacional de Luz Sincrotron, LNLS, Campinas, Brazil; Polikarpov, Oliva *et al.*, 1998; Polikarpov, Perles *et al.*, 1998) and a 34.5 cm MAR Research imaging-plate detector at a crystal-to-detector distance of 200.0 mm and a temperature

There are at least two possibilities for the number of molecules in the asymmetric unit, two or three molecules. In order to solve this ambiguity, a self-rotation function was calculated and inspected; however, it was not conclusive. Attempts to solve the structure were performed for the two possibilities and in both cases did not produce a reasonable solution. The two possible space groups were tried in the molecular replacement and refinement. The best solutions were submitted to simulated-annealing refinement as implemented in *X-PLOR* (Brünger, 1992) and did not converge to reasonable values of the R factor and R_{free} (R factor = 39% and R_{free} = 45% for three peptides in the asymmetric unit). The initial model was a mastoparan-X isolated from *Vespa xanthoptera* (Kusunoki *et al.*, 1998; PDB accession code 1a13) solved by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, in which the residues were modified to be in accordance with the EMP sequence. This model is an amphipathic helix in which the residues with hydrophilic side chains are located on one side and the residues with hydrophobic side chains are located on the other side of the molecule. Further attempts to solve the EMP structure will be performed using the multiple isomorphous replacement method.

We thank Mr J. R. Brandão Neto and Dr I. Polikarpov (LNLS) for their help in the synchrotron data collection. This work was supported by grants from FAPESP, CNPq, Fundo Bunka de Pesquisa (Banco Sumitomo), Suntory Grants and FUNDUNESP (Brazil).

References

- Argiolas, A. & Pisano, J. I. (1983). *J. Biol. Chem.* **258**, 13697–13702.
- Azevedo, W. F. de Jr, Ward, R. J., Canduri, F., Soares, A., Giglio, J. R. & Arni, R. K. (1998). *Toxicon*, **36**, 1395–1406.
- Azevedo, W. F. de Jr, Ward, R. J., Gutiérrez, J. M. & Arni, R. K. (1999). *Toxicon*, **37**, 371–384.
- Azevedo, W. F. de Jr, Ward, R. J., Lombardi, F. R., Giglio, J. R., Fontes, M. R. M. & Arni, R. K. (1997). *Protein Pept. Lett.* **4**(5), 329–334.
- Brünger, A. T. (1992). *X-PLOR Version 3.1. A System for Crystallography and NMR*. New Haven: Yale University Press.
- Chuang, C., Huang, W., Yu, H., Wang, K. & Wu, S. (1996). *Biochim. Biophys. Acta*, **1292**, 1–8.
- Giotto, M. T. S., Garratt, R. C., Oliva, G., Mascarenhas, Y. P., de Azevedo, W. F. Jr, Giglio, J. R., Cintra, A. C. O., Arni, R. K. & Ward, R. J. (1998). *Proteins Struct. Funct. Genet.* **30**, 442–454.
- Higashijima, T., Wakamatsu, K., Takemitsu, M., Fujino, M., Nakajima, T. (1983). *FEBS Lett.* **152**, 227–230.

Ho, C. L. & Hwang, L. L. (1991). *Biochem. J.* **274**, 453–456.

Jancarik, J. & Kim, S.-H. (1991). *J. Appl. Cryst.* **24**, 409–411.

Konno, K., Hisada, M., Naoki, H., Itagaki, Y., Kawai, N., Miwa, A., Yasuhara, T., Morimoto, Y. & Nakata, Y. (2000). *Toxicon*, **38**, 1505–1515.

Kusunoki, H., Wakamatsu, K., Sato, K., Miyazawa, T. & Kohno, T. (1998). *Biochemistry*, **37**, 4782–4790.

Matthews, B. W. (1968). *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497.

Nakajima, T. (1984). *Handbook of Natural Toxins*, edited by A. T. Tu, Vol. 2, pp. 109–133. New York: Marcel Dekker.

Otwinowski, Z. (1993). *Proceedings of the CCP4 Study Weekend. Data Collection and Processing*, edited by L. Sawyer, N. Isaacs & S. Bailey, pp. 56–62. Warrington: Daresbury Laboratory.

Polikarpov, I., Oliva, G., Castellano, E. E., Garratt, R., Arruda, P., Leite, A. & Craievich, A. (1998). *Nucl. Instrum. Methods A*, **405**, 159–164.

Polikarpov, I., Perles, L. A., de Oliveira, R. T., Oliva, G., Castellano, E. E., Garratt, R. & Craievich, A. (1998). *J. Synchrotron Rad.* **5**, 72–76.

Ward, R. J., de Azevedo, W. F. Jr & Arni, R. K. (1998). *Toxicon*, **36**, 1623–1633.



Short sequence-paper

Preliminary cryocrystallography analysis of an eumenine mastoparan toxin isolated from the venom of the wasp *Anterhynchium flavomarginatum micado*

P. Delatorre ^{a,c}, J.R. Olivieri ^a, J. Ruggiero Neto ^a, C.C.B. Lorenzi ^a, F. Canduri ^a,
V. Fadel ^{a,d,e}, K. Konno ^b, M.S. Palma ^b, T. Yamane ^c, W.F. de Azevedo Jr ^{a,*}

^a Departamento de Física – IBILCE, UNESP, Rua Cristovao Colombo 2265, CP 136, CEP 15054-000, São José Rio Preto, SP, Brazil

^b CEIS – Institute of Biosciences of Rio Claro, UNESP, CEP 13506-900, Rio Claro, SP, Brazil

^c Division of Molecular Toxinology, Butantan Institute, São Paulo, SP, Brazil

^d Departamento de Física, Faciba-FEB, Barretos, SP 14783-226, Brazil

^e Centro Universitário de Votuporanga, Votuporanga, SP 15500-030, Brazil

Received 2 May 2000; received in revised form 8 August 2000; accepted 10 August 2000

Abstract

Mastoparans are tetradecapeptides found to be the major component of vespid venoms. These peptides present a wide spectrum of biological activities, such as mast cell degranulation, hemolytic activity and also reveals antimicrobial activity. A mastoparan toxin isolated from the venom of *Anterhynchium flavomarginatum micado* has been crystallized. At room temperature these crystals diffracted to 2.8 Å resolution. However, upon cooling to cryogenic temperature around 85 K, the original resolution limit could be improved to 2.0 Å. Crystals were determined to belong to the space group P3₁ (P3₂). This is the first mastoparan to be crystallized and it will provide further insights in the conformational significance of mastoparan toxins, with respect to their potency and activity in G protein regulation. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Mastoparan; Cryocrystallography; Synchrotron; Wasp

The chemical constituents of the venoms of Hymenopteran social wasps and bees have been well characterized; a range of amines, peptides and proteins act together to produce a wide spectrum of biological effects [1–3]. Stinging with these venoms produces severe pain, local damage, and occasionally death in large vertebrates. In contrast, solitary wasps use their venoms in different way, for prey capture. Solitary wasps paralyze insects or spiders with stinging

venom and feed the paralyzed victims to their larvae [4]. Accordingly, the venom should contain a variety of constituents acting on the nervous system. However, only few constituents of the venom have been chemically characterized, despite the thousands of solitary wasp species that inhabit of the earth. A systematic survey of the biologically active substances in solitary wasp venoms inhabiting Japan has identified novel peptide neurotoxins, pompilidotoxins (PMTXs), from the venoms of the spider wasps *Anoplus samariensis* and *Batozonellus maculifrons* [4]. During this survey a new mast cell degranulating peptide has been identified, designated as eumenine

* Corresponding author. Fax: +55-17-221-2247;
E-mail: walterfra@df.ibilce.unesp.br



mastoparan-AF (EMP-AF) in the venom of the solitary wasp *Anterhynchium flavomarginatum micado*, the most abundant eumenine wasp in Japan [3]. The amino acid sequence and biological activities of this peptide are similar to those of mastoparans, the mast cell degranulating peptides isolated from various hornet venoms [2].

The mastoparan toxins are tetradecapeptides and have been reported to be the major peptide in many species of hornets [5]. Several such peptides have been characterized as to cause liberations of histamine, serotonin and other chemical substances mediating inflammation upon binding to plasma membrane. Some of these peptides also possess a potent hemolytic activity which acts in synergy with the lethal protein of the vespid venom [6]. The action of these tetradecapeptides appears to involve multiple signal transduction pathways and may stimulate these activities via its effect on G proteins.

Especially interesting is the stimulation of phospholipase A₂ activity by mastoparans. Phospholipase A₂ are perhaps the most ubiquitous enzymes in venoms [7–11]. They are found in venoms of snakes, lizards and hornets. Several mastoparans can facilitate phospholipase A₂ activity, a behavior similar to melittin. Mastoparans cause a 12-, 15-, and 50-fold increase in the production of arachidonic acid catalyzed by phospholipase A₂ from bee venom, eastern diamondback rattlesnake and porcine pancreas, respectively [12].

Several peptides of similar size had their structures determined by X-ray crystallography [13–15]; however, no X-ray studies have been performed on mastoparans. Previous structural studies using circular dichroism (CD) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy revealed that mastoparans exhibit a random coil form in aqueous solution, whereas these tetradecapeptides will adopt the amphiphilic α -helix conformation in trifluoroethanol-containing aqueous solution [16]. This conformational behavior has also been observed for other phospholipid membrane-binding peptides [17].

In the present work the preliminary cryocrystallographic analysis of the eumenine mastoparan (Ile-Asn-Leu-Leu-Lys-Ile-Ala-Lys-Gly-Ile-Ile-Lys-Ser-Leu-NH₂), a new class of mast-cell degranulating peptide is reported, in order to provide further insights in the conformational characteristics and the implica-

tion to its biological functions. Preliminary X-ray diffraction analysis indicated that the EMP crystals diffract to 2.0 Å resolution. However, rapid degradation of the EMP in the X-ray beam at room temperature has obstructed the collection of a full data set to resolution higher than 2.8 Å. In order to improve resolution, water-soluble protein crystals are frequently flash-cooled to cryogenic temperatures [18–20]. In this communication, we report on a successful experiment in which flash-cooled EMP crystals have diffracted to 2.0 Å, and a full data set has been successfully collected using synchrotron radiation.

Peptide was prepared by stepwise solid-phase synthesis using *N*-9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) chemistry with TGS-RAM resin (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) on a Shimadzu PSSM-8 peptide synthesizer. All Fmoc amino acids and the resin were purchased from Shimadzu Corp. Side-chain protective groups included *tert*-butoxy for serine and *t*-butoxycarbonyl for lysine. Cleavage reaction of peptide-resin was performed by treatment with anisole-1,2-ethanedithiol-trifluoroacetic acid solution (5:1:94, by volume) at a rate of 10 ml/g of resin at room temperature for 2 h. After filtering to remove the resin and ether extraction, the crude peptide was purified by semi-preparative reverse-phase HPLC (CAPCELL PAK C18, 10×250 mm, 40% acetonitrile–water containing 0.1% trifluoroacetic acid). The homogeneity of the synthetic peptide was assessed by analytical HPLC and fast-atom-bombardment mass spectral (FAB-MS) analysis.

The eumenine mastoparan (EMP) used in the crystallization experiments was dissolved in 50% trifluoroethanol-containing aqueous solution. Crystals of the EMP have been obtained in several different crystallization conditions, using the hanging drop vapor diffusion and sparse matrix methods [21]. The best crystals were obtained after 2 days growth from drops in which 2 μ l of EMP solution (5 mg/ml) was mixed with an equal volume of reservoir solution. Sodium formate (4.0 M) was used as the reservoir solution.

Preliminary X-ray studies on EMP-AF showed that these crystals diffracted to 2.0 Å resolution, although they decayed quickly when exposed to X-ray at room temperature. To overcome this difficulty we collected data from a flash-frozen crystal at 85K,

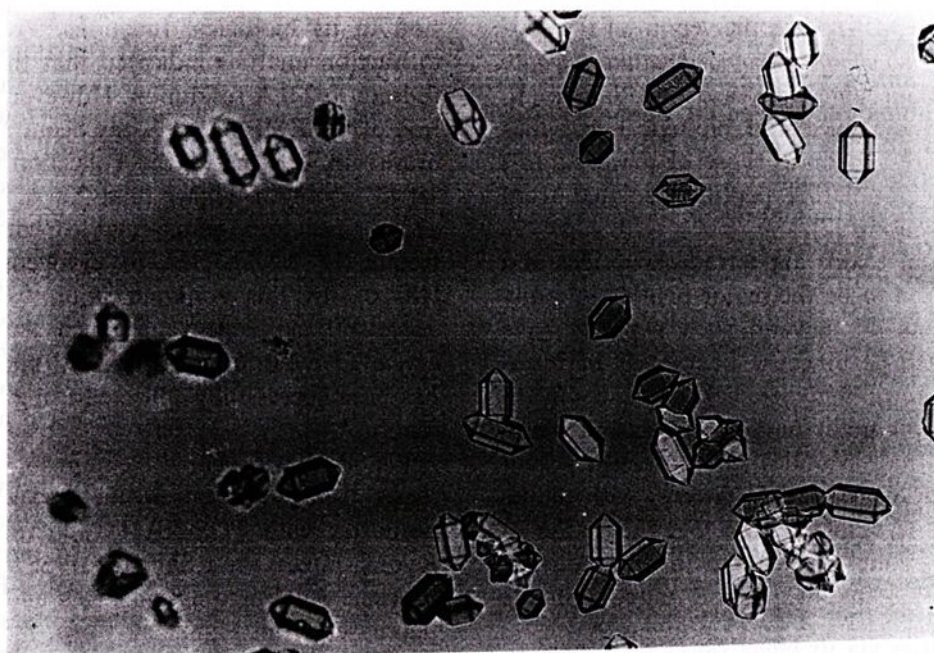


Fig. 1. Photomicrograph of the crystals of EMP.

using the procedures described earlier [18–20]. In brief, prior to flash freezing, PEG 400 was added, up to 25% by volume, to the crystallization drops for cryoprotection.

X-ray diffraction data were collected at a wavelength of 1.535 Å using the Synchrotron Radiation Source (Station PCr, Laboratório Nacional de Luz Sincrotron, LNLS, Campinas, Brazil) [22,23] and a

34.5 cm MAR imaging plate detector (MAR Research) at a crystal to detector distance of 150.43 mm. Using an oscillation range of 2.0°, 30 images were collected and the raw X-ray diffraction data were processed to 2.0 Å resolution using the program DENZO and scaled with the program SCALEPACK [24].

Auto-indexing procedures, combined with analysis

Table 1

Detailed X-ray diffraction statistics for synchrotron data of crystal of EMP

Resolution in range (Å)	Number of independent reflections	$I/\sigma(I)$	Redundancy	Completeness from all data (%)	R_{merge} in range from all data (%)
100.00–4.33	1022	19.83	2.08	95.7	5.2
4.33–3.44	1052	20.93	2.07	98.8	4.7
3.44–3.00	1049	18.65	2.01	99.5	5.1
3.00–2.73	1059	16.78	2.00	99.0	6.9
2.73–2.53	1050	15.08	1.99	99.4	7.2
2.53–2.38	1053	14.67	1.98	98.3	7.8
2.38–2.26	1038	12.96	1.99	98.1	7.9
2.26–2.17	1062	12.01	1.96	97.5	9.8
2.17–2.08	985	10.25	1.96	96.6	11.8
2.08–2.01	1017	8.01	1.94	95.8	15.4
All reflections	10387	14.91	2.00	97.9	8.2

$R_{\text{merge}} = 100 \times \sum_{hkl} [\sum_i (|I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle|)] / \sum_{hkl,i} (I_{hkl,i})$, where $I_{hkl,i}$ is the intensity of an individual measurement of the reflection with indices, h , k and l , and $\langle I_{hkl} \rangle$ is the mean intensity of that reflection.

of the X-ray diffraction pattern and averaging of equivalent intensities, was used in the characterization of the Laue symmetry.

Fig. 1 is a photomicrograph of the crystals of EMP isolated from the venom of *Anterhynchium flavomarginatum micado* suitable for X-ray diffraction experiments, with average dimensions of about $0.1 \times 0.1 \times 0.3$ mm. Preliminary X-ray diffraction analysis indicated that the crystal has the primitive trigonal Laue lattice, with cell parameters of $a = 43.3(2)$ Å, $b = 43.3(2)$ Å and $c = 79.9(2)$ Å. Upon freezing the cell parameters shrank to $a = 42.2(2)$ Å, $b = 42.2(2)$ Å and $c = 79.9(2)$, a reduction of 5.02% in the volume of the unit cell. Assuming the asymmetric unit content to be 10 peptides of molecular mass of 1.65 kDa each one, the V_m value is $2.16 \text{ Å}^3 \text{ Da}^{-1}$ [25]. Assuming a value of $0.74 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ for the protein partial specific volume, the calculated solvent content in the crystal is 43.05% and the calculated crystal density 1.27 g cm^{-3} . Detailed data collection statistics for the synchrotron data are given in Table 1.

Attempts to solve the EMP structure using standard molecular replacement techniques [26] did not produce a reasonable solution. This is probably due to the small dimensions of the search model when compared to unit cell dimensions. The initial model was the mastoparan-X isolated from *Vespa xanthoptera* [27] (PDB accession code: 1A13) solved by NMR spectroscopy, in which the residues were modified to be in accordance with the EMP sequence. This model is an amphipathic helix in which the residues with hydrophilic side chains are located on one side and the residues with hydrophobic side chains located on the other side of the molecule. Further attempts to solve the EMP structure will be performed using the method of multiple isomorphous replacement.

We thank Mr J.R. Brandão Neto and Dr I. Polikarpov (LNLS) for their help in the synchrotron data collection. We also thank Dr Terumi Nakajima (Suntory Institute for Bioorganic Research) for his encouragement throughout this work and invaluable discussion. This work was supported by grants from FAPESP, CNPq, Fundo Bunka de Pesquisa (Banco Sumitomo), Suntory Institute for Bioorganic Research Grant to K.K., and FUNDUNESP (Brazil). K.K. is a fellow of Fundação de Amparo à Pesquisa

do Estado de São Paulo (FAPESP, Proc. 1998/11693-5).

References

- [1] E. Habermann, Bee and wasp venoms, *Science* 117 (1972) 314–322.
- [2] T. Nakajima, in: A.T. Tu (Ed.), *Handbook of Natural Toxins*, vol. 2, Marcel Dekker, New York, 1984, pp. 109–133.
- [3] K. Konno, M. Hisada, H. Naoki, Y. Itagaki, N. Kawai, A. Miwa, T. Yasuhara, Y. Morimoto, Y. Nakata, Structure and biological activities of eumenine mastoparan-AF, a new mast cell degranulating peptide in the venom of the solitary wasp (*Anterhynchium flavomarginatum micado*), *Toxicon* 38 (2000) 1505–1515.
- [4] K. Konno, M. Hisada, Y. Itagaki, H. Naoki, N. Kawai, A. Miwa, T. Yasuhara, H. Takayama, Isolation and structure of pompilidotoxins, novel peptide neurotoxins in solitary wasp venoms, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250 (3) (1998) 612–616.
- [5] T. Nakajima, T. Yasuhara, S. Uzu, K. Wakamatsu, T. Miyazawa, K. Fukuda, Y. Tsukamoto, Wasp venom peptides; wasp kinins, new cytotoxic peptide families and their physico-chemical properties, *Peptides* 6 (Suppl. 3) (1985) 425–430.
- [6] C.L. Ho, L.L. Hwang, Structure and biological activities of new mastoparan isolated from the venom of the hornet *Vespa basalis*, *Biochem. J.* 274 (1991) 453–456.
- [7] M.T.S. Giotto, R.C. Garratt, G. Oliva, Y.P. Mascarenhas, W.F. de Azevedo Jr., J.R. Giglio, A.C.O. Cintra, R.K. Arni, R.J. Ward, Crystallographic and spectroscopy characterization of a molecular hinge: conformation change in Bothropstoxin I, a dimeric K49-Phospholipase homologue, *Proteins Struct. Funct. Genet.* 30 (1998) 442–454.
- [8] W.F. de Azevedo Jr., R.J. Ward, F.R. Lombardi, J.R. Giglio, M.R.M. Fontes, R.K. Arni, Crystal structure of myotoxin-II: a myotoxic phospholipase A₂-homologue from *Bothrops moojeni* venom, *Protein Pept. Lett.* 4 (5) (1997) 329–334.
- [9] W.F. de Azevedo Jr., R. Ward, J.M. Gutiérrez, C. Díaz, R.K. Arni, Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a Lys49-PLA₂ homologue from *Cerrophidion godmani* venom, *Protein Pept. Lett.* 5 (1998) 121–126.
- [10] R.J. Ward, W.F. de Azevedo Jr., R.K. Arni, At the interface: crystal structures of phospholipases A₂, *Toxicon* 36 (1998) 1623–1633.
- [11] W.F. de Azevedo Jr., R.J. Ward, J.M. Gutiérrez, R.K. Arni, Structure of a Lys49-phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of *Bothrops nummifer* (jumping viper), *Toxicon* 37 (1999) 371–384.
- [12] A. Argiolas, J.J. Pisano, Facilitation of phospholipase A₂ activity by mastoparans, a new class of mast cell degranulating peptides from wasp venom, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 13697–13702.

- [13] I.L. Karle, J.L. Flippen-Anderson, M. Sukumar, P. Balar- am, Helix packing of leucine-rich peptides: a parallel leucine ladder in the structure of Boc-Aib-Leu-Aib-Aib-Leu-Leu- Leu-Aib-Leu-OMe, *Proteins Struct. Funct. Genet.* 12 (1992) 324–330.
- [14] I.L. Karle, C. Das, P. Balar- am, De novo protein design: crystallographic characterization of a synthetic peptide con- taining independent helical and hairpin domains, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 3034–3037.
- [15] M. Doi, T. Ishida, M. Kobayashi, Y. Katsuya, Y. Mezaki, M. Sasaki, A. Terashima, T. Taniguchi, C. Tanaka, Amphi- pathic structure of theonallapeptolide-Id, a hydrophobic tri- decapeptide lactone from the okinawa marine sponge *Theo- nella swinhoei*, *Biopolymers* 54 (2000) 27–34.
- [16] C. Chuang, W. Huang, H. Yu, K. Wang, S. Wu, Conforma- tion of *Vespa basalis* mastoparan-B in trifluoroethanol-con- taining aqueous solution, *Biochim. Biophys. Acta* 1292 (1996) 1–8.
- [17] T. Higashijima, K. Wakamatsu, M. Takemitsu, M. Fujino, T. Nakajima, Conformational change of mastoparan from wasp venom on binding with phospholipid membrane, *FEBS Lett.* 152 (1983) 227–230.
- [18] W.F. de Azevedo Jr., H.-J. Mueller-Dieckmann, U. Schulze- Gahmen, P.J. Worland, E. Sausville, S.-H. Kim, Structural basis for specificity and potency of a flavonoid inhibitor of human CDK2, a cell cycle kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 2735–2740.
- [19] S.-H. Kim, U. Schulze-Gahmen, J. Brandsen, W.F. de Aze- vedo Jr., Structural basis for chemical inhibition of CDK2, in: L. Meijer, S. Guidet, L. Vogel (Eds.), *Progress in Cell Cycle Research*, vol. 2, Plenum, New York, USA, 1996, Chapter 14, pp. 137–145.
- [20] W.F. de Azevedo Jr., S. Leclerc, L. Meijer, L. Havlicek, M. Strnad, S.-H. Kim, Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: crystal structure of human cdk2 com- plexed with roscovitine, *Eur. J. Biochem.* 243 (1997) 518–526.
- [21] J. Jancarik, S.H. Kim, Sparse-matrix sampling – a screening method for crystallization of proteins, *J. Appl. Crystallogr.* 24 (1991) 409–411.
- [22] I. Polikarpov, G. Oliva, E.E. Castellano, R. Garratt, P. Ar- ruda, A. Leite, A. Craievich, The protein crystallography beamline at LNLS, the Brazilian National Synchrotron Light Source, *Nucl. Instrum. Methods A* 405 (1998) 159–164.
- [23] I. Polikarpov, L.A. Perles, R.T. de Oliveira, G. Oliva, E.E. Castellano, R. Garratt, A. Craievich, Set-up and experimen- tal parameters of the protein crystallography beamline at the Brazilian National Synchrotron Laboratory, *J. Synchrotron Rad.* 5 (1998) 72–76.
- [24] Z. Otwinowski, in: L. Sawyer, N. Isaacs, S. Bailey, *Proceed- ings of the CCP4 Study Weekend*, Daresbury Laboratory, Warrington, pp. 56–62.
- [25] B.W. Matthews, Solvent content of protein crystals, *J. Mol. Biol.* 33 (1993) 491–497.
- [26] J. Navaza, Amore – an automated package for molecular replacement, *Acta Cryst. A* 50 (1994) 157–163.
- [27] H. Kusunoki, K. Wakamatsu, K. Sato, T. Miyazawa, T. Kohno, G protein-bound conformation of mastoparan-X: Heteronuclear multidimensional transferred nuclear Over- hauser effect analysis of peptide uniformly enriched with C-13 and N-15, *Biochemistry* 37 (1998) 4782–4790.

Anoplin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary wasp *Anoplius samariensis*

Katsuhiro Konno ^{a,b,*}, Miki Hisada ^c, Renato Fontana ^{a,b}, Carla C.B. Lorenzi ^{b,d},
Hideo Naoki ^c, Yasuhiro Itagaki ^e, Akiko Miwa ^f, Nobufumi Kawai ^g,
Yoshihiro Nakata ^h, Tadashi Yasuhara ⁱ, João Ruggiero Neto ^{b,d},
Walter F. de Azevedo Jr. ^{b,d}, Mario S. Palma ^{a,b}, Terumi Nakajima ^c

^a Center of Study of Social Insects, Department of Biology, Institute of Biosciences of Rio Claro, São Paulo State University, Av. 24-A, 1515, Rio Claro, SP 13506-900, Brazil

^b Center for Applied Toxinology, CEPID/FAPESP, São Paulo, SP 05468-901, Brazil

^c Suntory Institute for Bioorganic Research, Shimamoto, Osaka 618-8503, Japan

^d Department of Physics, Institute of Biosciences, Letters, and Exact Sciences, São Paulo State University, São José do Rio Preto, SP 15054-000, Brazil

^e Department of Chemistry, Columbia University, New York, NY 10027, USA

^f Department of Neurobiology, Tokyo Metropolitan Institute for Neurosciences, Fuchu, Tokyo 183-8526, Japan

^g Department of Physiology, Jichi Medical School, Minamikawachi, Tochigi 329-0498, Japan

^h Institute of Pharmaceutical Sciences, Hiroshima University School of Medicine, Hiroshima 734-8551, Japan

ⁱ Department of Nutrition, Junior College of Agriculture, Tokyo University of Agriculture, Setagaya, Tokyo 156-8502, Japan

Received 14 March 2001; received in revised form 29 August 2001; accepted 30 August 2001

Abstract

A novel antimicrobial peptide, anoplin, was purified from the venom of the solitary wasp *Anoplius samariensis*. The sequence was mostly analyzed by mass spectrometry, which was corroborated by solid-phase synthesis. Anoplin, composed of 10 amino acid residues, Gly-Leu-Leu-Lys-Arg-Ile-Lys-Thr-Leu-Leu-NH₂, has a high homology to crabrolin and mastoparan-X, the mast cell degranulating peptides from social wasp venoms, and, therefore, can be predicted to adopt an amphipathic α -helix secondary structure. In fact, the circular dichroism (CD) spectra of anoplin in the presence of trifluoroethanol or sodium dodecyl sulfate showed a high content, up to 55%, of the α -helical conformation. A modeling study of anoplin based on its homology to mastoparan-X supported the CD results. Biological evaluation using the synthetic peptide revealed that this peptide exhibited potent activity in stimulating degranulation from rat peritoneal mast cells and broad-spectrum antimicrobial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Therefore, this is the first antimicrobial component to be found in the solitary wasp venom and it may play a key role in preventing potential infection by microorganisms during prey consumption by their larvae. Moreover, this peptide is the smallest among the linear α -helical antimicrobial peptides hitherto found in nature, which is advantageous for chemical manipulation and medical application. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Abbreviations: PMTX, pompilidotoxin; EMP-AF, eumenine mastoparan-AF; MALDI-TOF MS, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; CPY, carboxypeptidase Y; APM, aminopeptidase M; PSD, post-source decay; CID, collision-induced dissociation; CD, circular dichroism; TFE, trifluoroethanol; PC, L- α -phosphatidylcholine; PG, L- α -phosphatidyl-DL-glycerol

* Corresponding author, at address a. Fax: +55-19-534-0009. E-mail address: kk-gon@rc.unesp.br (K. Konno).

0167-4838/01/\$ – see front matter © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

PII: S0167-4838(01)00271-0

Keywords: Anoplin; Antimicrobial peptide; Amphipathic α -helical structure; Solitary wasp venom

1. Introduction

Solitary wasp venoms may be a rich source of bioactive substances, in particular neurotoxins, as well as spider and scorpion venoms since solitary wasps use their venoms to paralyze insects or spiders and feed the paralyzed prey to their larvae [1]. However, the chemical components of the solitary wasp venoms have been only poorly documented contrary to those of the spider and scorpion venoms. Earlier studies revealed that solitary wasp venoms indeed contain neurotoxins. Philanthotoxins are non-competitive antagonists of glutamate and nicotinic receptors found in the digger wasp venom [2,3]. Bradykinin related peptides blocking nicotinic acetylcholine receptors in insect central nervous systems have been obtained from the European scoliid wasp venoms [4,5].

We have recently surveyed the bioactive substances in the solitary wasp venoms and found novel peptide neurotoxins, pompilidotoxins (PMTXs), in the venoms of the spider wasps *Anoplius samariensis* and *Batozonellus maculifrons* [6]. PMTXs affect not only the invertebrate nervous systems, greatly facilitating synaptic transmission in the lobster neuromuscular synapse [7], but also the mammalian central nervous systems, disrupting synchronous firing in rat cortical neurons [8], which are due to the blockade of the sodium channel inactivation [9]. Structure–activity relationship studies demonstrated that the basic amino acid residues play a key role in exhibiting the potent facilitatory action in the lobster neuromuscular synapses [10]. Moreover, we have also isolated a new mast cell degranulating peptide, eumenine mastoparan-AF (EMP-AF), from the venom of the eumenine wasp *Anterhynchium flavomarginatum micado* [11]. The structure and biological activities of this peptide are similar to those of mastoparans, the mast cell degranulating peptides isolated from various social wasp venoms. Accordingly, our recent studies indicated that solitary wasp venoms may contain a variety of bioactive substances in addition to neurotoxins.

From a further investigation of the venom sac extract of *A. samariensis*, we isolated another novel

peptide, designated anoplin, as one of the major components. Anoplin is composed of only 10 amino acid residues and showed both antimicrobial and mast cell degranulating activity. This is the first antimicrobial component to be found in solitary wasp venoms and the smallest among the linear α -helical antimicrobial peptides found in natural sources. We report here the isolation, structural analysis including the secondary structure and biological activities of anoplin.

2. Materials and methods

2.1. Purification

Female wasps of *A. samariensis* were collected in Sagamiko, Ibaraki, and Kyoto. The collected specimens were immediately frozen on dry ice and kept at -75°C until use. The venom sacs were dissected immediately after thawing and lyophilized.

Sixty lyophilized venom sacs were extracted (5×1 ml) with 1:1 acetonitrile–water containing 0.1% TFA ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/0.1\%$ TFA) and the extracts were subjected to reverse-phase HPLC (Waters, Milford, MA, USA) using CAPCELL PAK C_{18} , 10×250 mm (Shiseido, Tokyo, Japan) with linear gradient from 5% to 95% $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/0.1\%$ TFA at a flow rate of 2.5 ml/min over 30 min (Fig. 1). The peak eluted at 19.5 min was further purified by CAPCELL PAK C_{18} , 6×150 mm with 30% $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/0.1\%$ TFA at a flow rate of 1 ml/min to give anoplin eluted at 13.5 min.

2.2. Mass spectrometry

All mass spectra were acquired on a Voyager Elite matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometer (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA) equipped with a delayed extraction source and 337 nm pulsed nitrogen laser. For the collision-induced dissociation/post-source decay (CID/PSD) spectra measurement, ions were accelerated at 20 kV and argon was introduced into the collision cell.

2.3. Amino acid sequencing

Automated Edman degradation was performed by a gas-phase sequencer PPSQ-10 (Shimadzu, Kyoto, Japan).

On-plate exopeptidase digestion was applied for peptide ladder sequencing. Carboxypeptidase Y (CPY, pH 6.0, Sequazyme kit from PerSeptive Biosystems) was used for C-terminal sequencing, and N-terminal sequencing was performed using aminopeptidase M (APM, pH 7.5, 2.5 µg/µl from Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN, USA).

An aqueous solution of anoplin (0.5 µl) and an enzyme (0.5 µl) were mixed on the sample plate, and after 7 min incubation at room temperature, a matrix solution (0.5 µl of saturated solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 1:1 CH₃CN/H₂O/0.1% TFA) was added and air dried for MALDI-TOF MS analysis.

2.4. Peptide synthesis

Peptide was synthesized by stepwise solid-phase method using *N*-9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) chemistry with TGS-RAM resin (Rapp Polymere, Tübingen, Germany) on a Shimadzu PSSM-8 peptide synthesizer (Shimadzu). All Fmoc-L-amino acids were purchased from Nova Biochem. The side chain protective groups were *tert*-butyloxycarbonyl for Lys, 2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl (Pmc) for Arg, and *tert*-butyl for Thr. Cleavage of the peptide from the resin was achieved by treatment with a mixture of TFA/phenol/thioanisole/1,2-ethanedithiol/ethylmethyldisulfide/H₂O (80:5:5:3:2:5, by volume) using 10 ml/g resin at room temperature for 8 h. After removal of the resin by filtration and washing twice with TFA, the combined filtrate was added dropwise to diethyl ether at 0°C and then centrifuged at 3000 rpm for 10 min. Thus obtained crude synthetic peptide was purified by semipreparative reverse-phase HPLC using CAPCELL PAK C₁₈, 10×250 mm with isocratic elution of 30% CH₃CN/H₂O/0.1% TFA at a flow rate of 2.5 ml/min. The homogeneity and the sequence were confirmed by MALDI-TOF MS. The HPLC elution profile of the synthetic peptide was identical with that of the natural peptide.

2.5. Vesicle preparation

L- α -Phosphatidylcholine (PC) and L- α -phosphatidyl-DL-glycerol (PG) were purchased from Sigma. PC and PC/PG (1:1) liposomes were prepared by the reverse-phase evaporation technique proposed by Szoka and Papahadjopoulos [12]. Phospholipids were dissolved in ether (for PC) or chloroform (for PC/PG), and dried under rotatory evaporation. The final lipid concentration was 5 mg/ml for both systems. The lipids were adhered to the flask wall and then dissolved again in mixtures of 1:1 Tris 25 mM, 150 mM NaCl/ether (for PC) or chloroform (for PC/PG) and sonicated in ice for 2 min using a titanium tip ultrasonicator. Titanium debris was removed by centrifugation (Eppendorf table centrifuge, 10 min at 14000 rpm). The fusion of the micelles was obtained by slow evaporation of the organic solvent. After incubation of this emulsion for 30 min in 45°C, unilamellar liposomes were obtained. Homogeneous liposomes were obtained by passing the solution through a polycarbonate membrane (Millipore 0.45 µm). The average radius of the liposomes, determined by light scattering using Dynapro equipment, was 100 nm. The phosphate concentration in the liposomes was determined by the method proposed by Barlett [13].

2.6. Circular dichroism (CD) spectroscopy

2,2,2-Trifluoroethanol (TFE) and Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) were purchased from Merck and sodium dodecyl sulfate (SDS) from Pharmacia Fine Chemicals. Water was quartz distilled and deionized. SDS was dissolved in Tris buffer 5 mM pH 8.0. CD spectra were measured over the range 190–250 nm, using a Jasco-710 spectropolarimeter (Jasco, Tokyo, Japan) coupled to a Neslab RTE111 circulating water bath. The instrument was calibrated using (+)-10-camphorsulfonic acid. Spectra were obtained at 25°C using cells with a path length of 0.5 cm. Solutes were dissolved in H₂O and CD spectra were collected at various solute concentrations. Peptide concentrations used were 62 µM. Data points were recorded at a scan speed of 20 nm/min, bandwidth 1.0 nm, 0.5 s response and 0.1 nm resolution. Five repeat scans were accumulated to

obtain the final averaged spectra. Following baseline correction, the observed ellipticity, θ (mdeg), was converted to mean residue ellipticity $[\theta]$ (deg cm²/dmol), using the relationship $[\theta] = 100\theta/(lc n)$ where ' l ' is the path length in centimeters, ' c ' is the millimolar concentration, in residues, and ' n ' is the number of residues in the peptide. Assuming a two state model the observed mean residue ellipticity in 222 nm ($\theta_{222}^{\text{obs}}$) was converted to percentage of α -helix (f_H) using the equation:

$$f_H = \frac{\theta_{222}^{\text{obs}} - \theta_{222}^C}{\theta_{222}^H - \theta_{222}^C}$$

where θ_{222}^C ($=+640$) is the complete random coil ellipticity. θ_{222}^H is the mean ellipticity for complete helical conformation and is given by:

$$\theta_{222}^H = -42500(1-x/n)$$

where n is the chain length in residues and x is the number of non H-bonded carbonyl groups in the peptide. We used $x=3$ for carboxyamidated peptide as proposed by Rohl and Baldwin [14].

2.7. Molecular modeling

Model building was carried out using model-by-homology of the program MODELLER [15]. The atomic coordinates for mastoparan-X (PDB access code: 1A13) [16] solved by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy were used as starting model. Torsion angles of the model were taken from the original structure whenever possible. Otherwise they were taken from a standard residue library. Where necessary the model was regularized. Reasonable positions for side chains that showed considerable Van der Waals overlap were obtained in an iterative process of flipping through all χ -angle rotamers. The resulting crude structure was further optimized by means of the variable target function method (VTFFM) with conjugate gradient using MODELLER.

2.8. Lobster neuromuscular preparation

Neuromuscular preparations of the walking leg of

lobster, *Palinurus japonicus*, were made as previously described [17]. The excitatory and the inhibitory axons innervating the stretcher muscle were isolated at the meropodite and stimulated independently. Intracellular recordings were made from the stretcher muscle by microelectrodes filled with 4 M K-acetate (10–20 M Ω). The normal solution consisted of (in mM) 468 NaCl, 10 KCl, 20 CaCl₂, 8 MgCl₂ and Tris buffer 2, adjusted to pH 7.4.

2.9. Mast cell degranulation activity (β -D-glucosaminidase assay)

Mast cells were obtained by peritoneal lavage of large (>300 g) Sprague–Dawley rats. The mast cells were isolated from containing cell types by centrifugation through a cushion of Percoll as previously described [18], washed twice by resuspension and centrifugation, and finally suspended in a HEPES buffer which comprised 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 20 mM HEPES, 1 mg/ml BSA and 1 mg/ml glucose (pH 7.4).

RBL-2H3 cells were obtained from M.A. Beaven (National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA) and grown in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum and 100 U/ml penicillin/100 μ g/ml streptomycin solution. The cells were cultured in a 96-well plate (5×10^4 cells/0.1 ml/well) in growth medium in preparation for β -D-glucosaminidase.

Degranulation was determined by measuring the release of the granule marker, β -D-glucosaminidase, which co-localizes with histamine, as previously described [18]. The cells were incubated with various concentrations of the peptide for 10 min at 37°C, and then quenched by addition of 0.5 ml of ice-cold HEPES buffer. After centrifugation, the supernatants were sampled for β -D-glucosaminidase assay. Briefly, 50 μ l of samples of the medium and 50 μ l of the substrate, 5 mM *p*-nitrophenyl-*N*-acetyl- β -D-glucosaminide in 0.2 M citrate, pH 4.5, were incubated in 96-well plates to yield the chromophore, *p*-nitrophenol. The absorbance of the colored product was assessed at 405 nm using a microtiter plate reader. The values for β -D-glucosaminidase released in the medium were expressed as the percentage of total β -D-glucosaminidase, which was determined in the cells lysed in 0.1% Triton X-100. *p*-Nitrophenyl-*N*-

acetyl- β -D-glucosaminidase was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

2.10. Hemolytic activity

Thirty microliters of red cell fractions were washed three times with physiological saline and suspended in 50 ml of physiological saline. Two hundred microliters of the prepared red cell suspension and 20 μ l of a physiological saline solution, which contained the sample, were incubated for 30 min at 37°C in microplate wells. The sample absorbance was detected at 415 nm. Hemolytic activity was determined regarding 0.2% Triton X-100 activity as being 100% and physiological saline activity as being 0%.

2.11. Antimicrobial activity (determination of minimal inhibitory concentration, MIC)

The microorganisms used were: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538, ATCC 25923), *Staphylococcus saprophyticus* (clinical species), *Bacillus subtilis* (CCT 2471), *Bacillus thuringiensis* (wild species), *Escherichia coli* (CCT 1371), *E. coli* (ATCC 25922), *Enterobacter cloacae* (ATCC 23355), *Proteus mirabilis* (clinical species), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), and *Candida albicans* (UMP).

Müller–Hinton broth was from Difco. Serial dilution of peptide was prepared in sterilized water. Aliquots were placed in ELISA microplates containing Müller–Hinton broth (low-salt) or Müller–Hinton broth with 150 mM NaCl (high salt) in a final volume of 200 μ l. The mixture was completed by inoculation of 10 μ l of bacterial culture growing in the logarithmic phase of the microorganism as monitored by the UV absorbance at 600 nm. The final cells number (1×10^5 /ml) was determined by plate counting.

The plates were incubated at 35°C and aliquots of 10 μ l were removed both at the beginning of the assay and after overnight incubation, and then plated in Müller–Hinton agar. The number of colony-forming units was determined. The results were expressed as inhibition percentage of colony-forming units against a control; this control was obtained in each situation by counting the number of microorganisms introduced into the plate in the absence of peptide.

3. Results

3.1. Purification

The venom extracts of *A. samariensis* were subjected to reverse-phase HPLC (Fig. 1), and each fraction was tested on lobster neuromuscular synapses and its purity also examined by MALDI-TOF MS. The fraction eluted next to α -PMTX at 19.5 min showed no effect on the lobster neuromuscular synapses, but was further purified by reverse-phase HPLC under isocratic conditions to isolate anoplin. MALDI-TOF MS showed the high purity of the isolated peptide with a protonated molecular ion peak at m/z 1153.8 (MH^+ , monoisotopic).

3.2. Structural analysis

Probably due to the small amounts and the high content of hydrophobic amino acids, Edman degradation gave poor results, determining only five amino acid residues from the N-terminus as Gly-Leu-Leu-Lys-Arg. Therefore, the peptide was chemically characterized by mass spectrometry. The MALDI-TOF MS analyses with the combined use of enzymatic ladder sequencing and CID/PSD spectra led to the full sequence [19]. Ladder sequencing of the purified peptide by CPY digestion showed the C-terminal se-

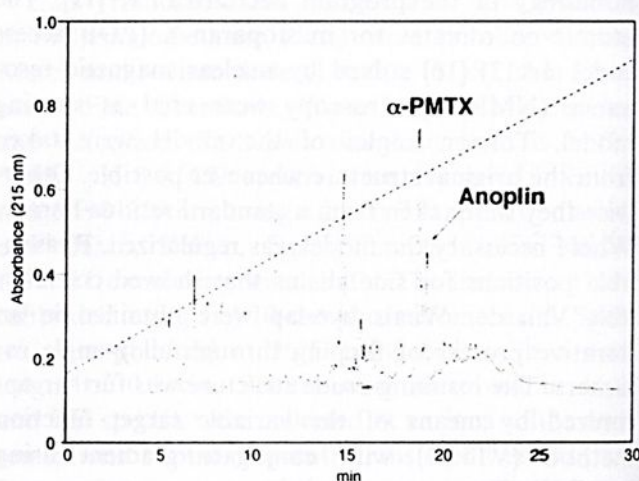


Fig. 1. Fractionation of venom extracts of *A. samariensis* by reverse-phase HPLC using CAPCELL PAK C_{18} (10 $\times$ 250 mm) with linear gradient of 5–95% $CH_3CN/H_2O/0.1\%$ TFA over 30 min at a flow rate of 2.5 ml/min. UV absorption was monitored at 215 nm.

quence to be Ile/Leu-Ile/Leu-NH₂. Comparison of the CID/PSD spectra of the ladder peptide with that of the intact peptide extended the sequence to Lys/Gln-Thr-Ile/Leu-Ile/Leu-NH₂. Similarly, ladder sequencing by APM digestion and subsequent analyses of the CID/PSD spectra revealed the N-terminal sequence as Gly-Leu-Leu-Lys-Arg-Ile/Leu. These results suggested the entire sequence to be Gly-Leu-Leu-Lys-Arg-Ile/Leu-Lys/Gln-Thr-Ile/Leu-Ile/Leu-NH₂, which is consistent with the MH⁺ peak at *m/z* 1153.8. Acetylation distinguished Lys or Gln, indicating that position 7 was a Lys residue, and the Leu or Ile residues at positions 6, 9 and 10 were identified by the product ions due to β,γ -cleavage (*w* ions and *d* ions) in the CID/PSD spectra. Thus, the full sequence of anoplin was determined to be Gly-Leu-Leu-Lys-Arg-Ile-Lys-Thr-Leu-Leu-NH₂.

The solid-phase synthesis of this peptide using Fmoc-L-amino acids and the HPLC comparison of the synthetic specimen with the natural peptide finally corroborated the sequence.

The chemical features of anoplin, rich in hydrophobic and basic amino acids with an amidated C-terminus, are similar to those of amphiphilic α -helix peptides such as the mastoparans and magainins [20,21]. In fact, the amino acid sequence of anoplin has a high homology to those of mastoparan-X (MP-X) and crabrolin, the amphiphilic α -helix peptides isolated from the venoms of *Vespa xanthoptera* [22] and *Vespa crabro* [23], respectively (Fig. 2). This class of peptides has been known to adopt an amphipathic α -helical conformation, showing amphiphilic character under appropriate conditions, which is essential for exhibiting their biological activities [24–26]. The sequence of anoplin can be predicted to adapt an amphipathic α -helical conformation as depicted in Fig. 3. In this view, the hydrophilic amino acid residues, Lys-4, Arg-5, Lys-7 and Thr-8, are located on one side, whereas all the hydrophobic amino acid

Anoplin	1	5	10
	GLLKRIKTLL-NH ₂		
Crabrolin			
	FLPLILRKIVTAL-NH ₂		
MP-X			
	INWKGIAAMAKLL-NH ₂		
	1	5	10
			14

Fig. 2. Amino acid sequences of anoplin, crabrolin and mastoparan-X (MP-X).

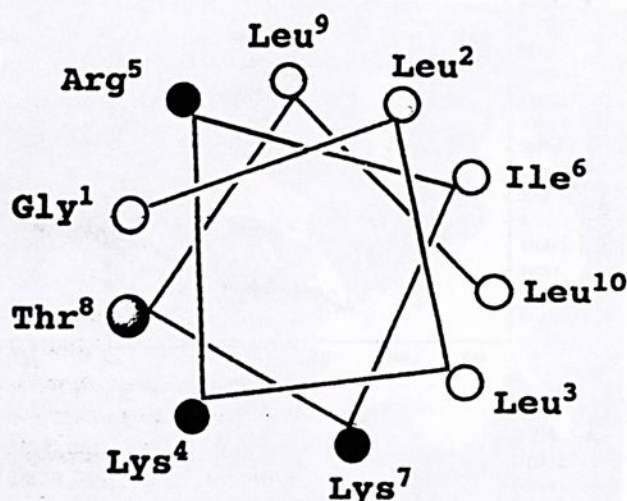


Fig. 3. Predicted amphiphilic α -helical structure of anoplin as perpendicularly viewed helix. In this view, the hydrophilic Arg, Lys and Thr residues are located on one side and the hydrophobic Ala, Ile and Leu residues on the other side of the helix.

residues, Ile and Leu, at positions 2, 3, 6, 9 and 10 are on the other side of the helix. Consequently, anoplin can be classified as an amphiphilic α -helical peptide.

3.3. CD analysis

The secondary structure of anoplin was examined by CD spectroscopy. The CD spectra of anoplin in water or Tris buffer, and in the presence of 30% TFE and 167 μ M SDS are shown in Fig. 4A. In pure water or Tris buffer, the CD spectra presented a small amount ($\sim 6\%$) of secondary structure. The fraction of the α -helix increased with the increase in the TFE and SDS concentrations. The highest f_H values obtained were capable of inducing 44% of the helical conformation in 30% (4.5 M) TFE while 160 μ M SDS induced 55%. These values are not far from the maximum expected value (70%); however, a slight dependence of the peptide ellipticity on the concentration was observed in the presence of SDS, suggesting an *n*-merization process. A comparison of the amounts of these solutes that induce a secondary structure in the peptide shows that SDS is more efficient than TFE. The maximum helical fraction was obtained at about 160 μ M of SDS versus 2 mM of TFE.

Conformation of anoplin was also examined in the presence of liposomes PC and PC/PG, the mimic

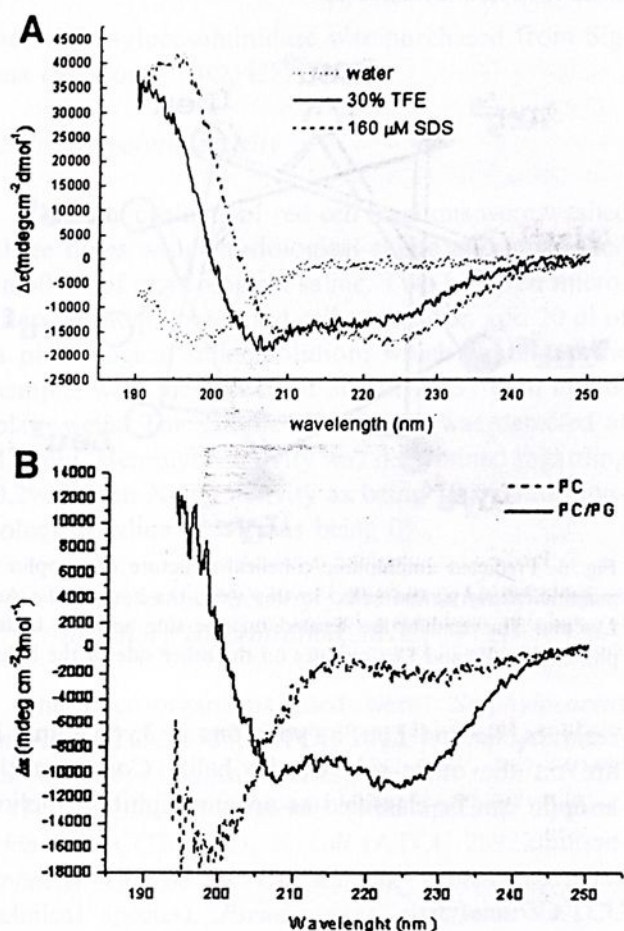


Fig. 4. (A) CD spectra of anoplin in the presence of SDS, water and TFE. (B) CD spectra of anoplin in the presence of liposomes.

systems that are closer in structure to bacterial membranes. The CD spectra of anoplin in the presence of these liposomes are shown in Fig. 4B. In the presence of the zwitterionic model PC, the amount of the α -helix is very low, about 7%, which is similar to that in pure buffer. However, in the model system with negative charge PC/PG, the peptide presented a reasonable amount of α -helix, about 38%.

3.4. Secondary and tertiary structure of anoplin model

A molecular modeling study supported the above results of the CD analysis. Several attempts were made to crystallize anoplin using the previously described procedure to obtain crystals of EMP-AF [27,28]. However, only microcrystals were obtained and they were not suitable for X-ray diffraction anal-

ysis. Since there is no structure for anoplin, we decided to build a structural model based on homology. Anoplin has a high homology to MP-X, and the atomic coordinates for MP-X (PDB access code: 1A13) [16] solved by NMR spectroscopy were used as the starting model. The overall stereochemical quality of the final model for anoplin was assessed by the program PROCHECK [29] and indicates that 100% of the residues are in the allowed regions.

All residues fall in the helical region of the Ramachandran plot (data not shown); however, a close inspection of the hydrogen bonding pattern indicates that the residues ranging from 4 to 9 have the helix hydrogen pattern. The peptide backbone from 4 to 9 for the anoplin model adopts an amphiphilic α -helical conformation with three positively charged side chains located on one side and the hydrophobic side chains located on the other side of the amphiphilic α -helix (Fig. 5a). This model is in accordance with the CD spectra, which indicates the presence of up to 44% of helix in TFE solution and up to 55% in SDS solution. Fig. 5b shows the electrostatic potential surface for the anoplin model, indicating the concentration of the positively charged residues, Lys-4, Arg-5 and Lys-7, on one side of the molecule. The side chains of these residues extend in the same direction. The structure-activity relationship studies of the mastoparans have shown that positive charges are crucial for the regulatory activity on the G-proteins [16,30]. Three lysine residues are conserved in the mastoparans isolated from social wasp venoms. Two of these are kept in anoplin and a modification from lysine to arginine is observed, nevertheless, keeping a positive residue in this position.

3.5. Biological activities

The biological activities of anoplin were investigated using the synthetic peptide. The mast cell degranulation, hemolytic and antimicrobial activities were tested because they are characteristic biological activities for amphiphilic α -helical peptides.

Fig. 6 shows the results of the mast cell degranulation activity. As expected, anoplin stimulated the degranulation from the rat peritoneal mast cells. The potency was about two thirds that of mastoparan, which seems to be comparable to crabrolin because the potency of crabrolin is reported to be somewhat

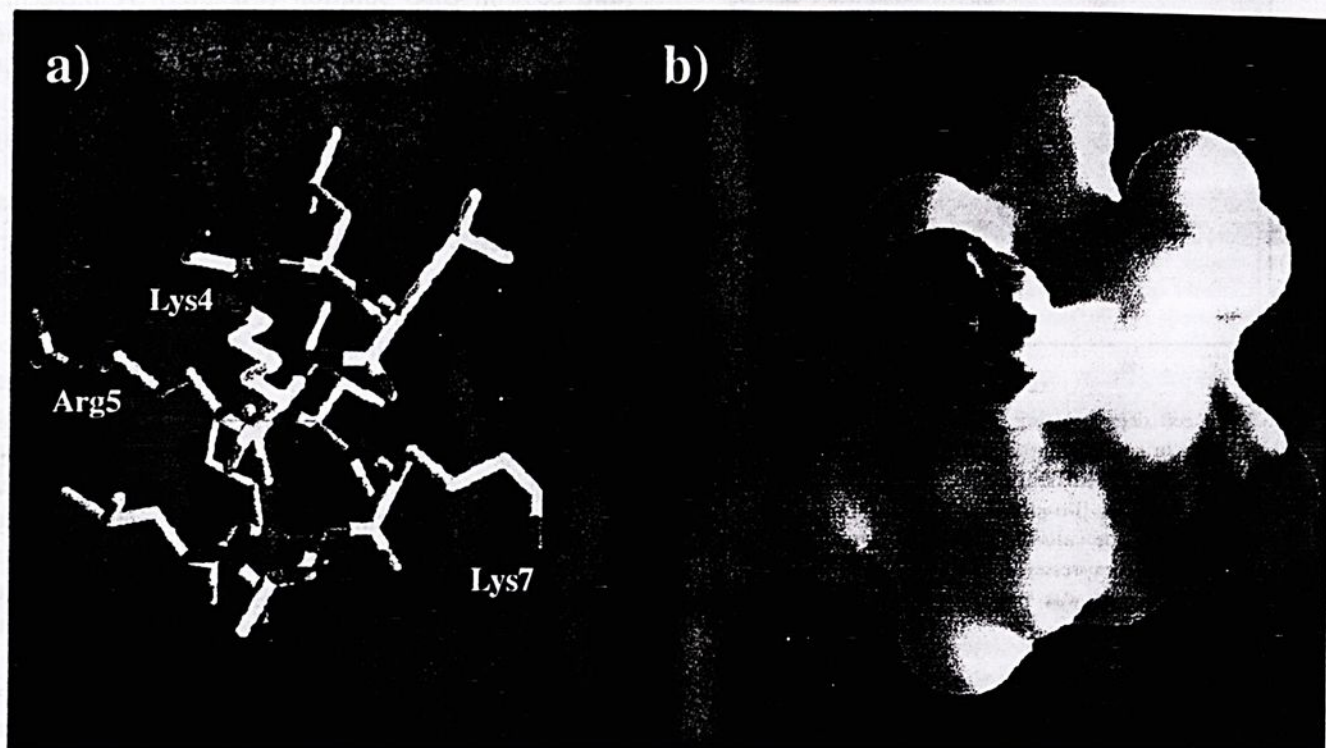


Fig. 5. (a) Structural model for anoplin. (b) Electrostatic potential representation of anoplin model calculated with GRASP [31]. Blue regions represent positive potentials of arginine and lysine residues. White regions represent neutral potentials. a and b are in the same orientation.

less than that of mastoparan [23]. On the other hand, anoplin showed no degranulation activity on RBL-2H3 cells (data not shown). The hemolytic activity of anoplin in human erythrocytes was quite low or virtually inactive. The potency was less than 20% that of mastoparan. Crabrolin is reported to be four times less active than mastoparan in guinea pig erythrocytes [23] and showed no effect in rat erythrocytes [32]. Thus, anoplin and crabrolin seem to have similar activity profiles for mast cell degranulation and hemolysis.

The antimicrobial activity was examined both in low- and high-salt media and summarized in Table 1. In low-salt media, anoplin showed broad-spectrum inhibitory activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria, but was inactive to *B. thuringiensis*, *E. cloacae* (ATCC 23355) and *P. mirabilis*. The MIC values were in the range of 5–50 $\mu\text{g/ml}$ which is somewhat selective to Gram-positive bacteria. This profile is in contrast to that of crabrolin, which is more selective to Gram-negative bacteria than to Gram-positive bacteria [32]. The antimicrobial activity of anoplin was salt-sensitive as has been

known for defensins [33]. In high-salt media (150 mM NaCl), the Gram-negative bacteria were virtually resistant to anoplin and the potency to the Gram-positive bacteria was significantly reduced

Table 1
Antimicrobial activity of anoplin

Microorganisms	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
	low-salt ^a	high-salt ^b
G(+) cocci		
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	5	20
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	50	> 75
<i>S. saprophyticus</i>	5	5
G(+) rods		
<i>B. subtilis</i> CCT 2471	20	20
<i>B. thuringiensis</i>	> 200	> 200
G(-) rods		
<i>E. coli</i> CCT 1371	50	> 100
<i>E. coli</i> ATCC 25922	50	200
<i>E. cloacae</i> ATCC 23355	> 200	> 200
<i>P. mirabilis</i>	> 200	> 200
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	20	100

^aLow-salt medium: Müller–Hinton medium.

^bHigh-salt medium: Müller–Hinton medium with 150 mM NaCl.

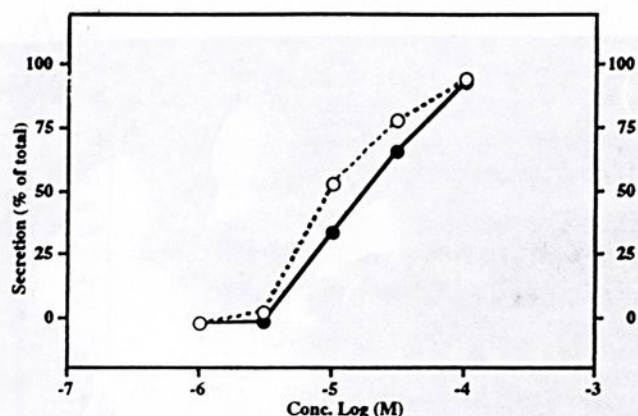


Fig. 6. Mast cell degranulating activity of anoplin and mastoparan (control) in rat peritoneal mast cells. ●, anoplin; ○ mastoparan. The activity was determined by measuring the release of the granule marker, β -D-glucosaminidase, which co-localizes with histamine, and the values for β -D-glucosaminidase released in the medium were expressed as the percentage of total β -D-glucosaminidase, which was determined in the cells lysed in 0.1% Triton X-100.

compared with those in low-salt media. These results indicated that the main targets of anoplin are the cytoplasmic membranes similar to defensins [34].

4. Discussion

Anoplin is one of the major peptide components of the venom of *A. samariensis*, from which we already isolated the novel neurotoxic peptide α -PMTX [8]. The sequence of anoplin was determined by mass spectrometry, which turned out to be classified into amphiphilic α -helical peptides. This class of peptides is widely distributed in venomous animals, for example, in hornet venoms [20] and in frog skin [21]. In the solitary wasp venom, we have recently found such a peptide, EMP-AF, from *A. flavomarginatum micado* for the first time [13]. Accordingly, solitary wasp venoms may be a rich source of this type of peptides.

A characteristic chemical feature of this class of peptides is that they can adapt an amphipathic α -helical conformation, showing amphiphilic character, which is essential for exhibiting their biological activities [24–26]. The sequence of anoplin can be predicted to adapt an amphipathic α -helical conformation (Fig. 3), and in fact, the CD analysis indicated the presence of up to 44% of α -helix in TFE solution

and 55% in SDS solution (Fig. 4A). A molecular modeling study supported these results. For the anoplin model, the peptide backbone from residues 4–9, which corresponds to 60% of the anoplin molecule, adopts an amphiphilic α -helical conformation (Fig. 5a). This model presents a fraction of the α -helix close to the observed values obtained from the CD analysis. The electrostatic potential surface for the anoplin model indicated the concentration of the positively charged residues, Lys-4, Arg-5 and Lys-7, on one side of the molecule (Fig. 5b). The CD spectra also demonstrated that anoplin switches from unordered forms to a stable α -helical conformation when introducing TFE or SDS into the solution, indicating that TFE and SDS stabilize the α -helical conformation. Especially interesting is a slight dependence of the peptide ellipticity on the concentration in the presence of SDS. This observation suggests an *n*-merization process for anoplin, in accordance with previous studies, which indicate that MP-X forms a tetrameric aggregate in the presence of DMPC vesicles [35]. The biological relevance of the aggregation observed for MP-X and anoplin need further structural and functional studies.

The amphiphilic α -helical peptides exhibit mast cell degranulating, hemolytic and antimicrobial activities. Anoplin showed potent degranulating activity from rat peritoneal mast cells and broad-spectrum antimicrobial activity. Therefore, this peptide is the first antimicrobial component to be isolated from the solitary wasp venom, which indicates that solitary wasp venoms may be a new source of antimicrobial substances. The recent study revealed that a spider venom also contains antimicrobial α -helical peptides, lycotoxins, and suggested that they may play a dual role for prey capture and to prevent potential infection by microorganisms arising from prey ingestion [36]. For the solitary wasp *A. samariensis*, these two roles may be divided into two distinct peptide components; that is, α -PMTX is responsible for prey capture and anoplin prevents potential microbial infection during prey consumption by their larvae.

Antimicrobial peptides are widely distributed in plants, insects, amphibians and mammals, playing an important role in host defense mechanisms [37–39]. They have attracted much attention as a novel class of antibiotics, especially for antibiotic-resistant pathogens, because they non-selectively interact with

cell surface membranes [40]. The results from the CD analysis in the presence of liposomes and the antibacterial activity in high-salt media indicated that anoplin also interacts with cell surface membranes of bacteria. Further studies, however, are needed to define the mechanism of action in more detail.

Anoplin is a rather small peptide compared to the known antimicrobial peptides; it is composed of only 10 amino acid residues, while most others have 15–40 residues. To our knowledge, anoplin is the smallest antimicrobial peptide among those hitherto found in natural sources. Additionally, it has no disulfide bonds which are involved in the majority of such peptides [41]; in other words, anoplin has a very simple chemical structure. This is advantageous for chemical modification and structure–activity relationship studies as well as for investigating its mode of action, which may be useful for the development of a novel class of antibiotics.

Acknowledgements

We are grateful to Drs. Akira Endo (Ritsumeikan University) and Sôichi Yamane (Ibaraki University) for the collection and identification of wasps and their invaluable discussions. This work was supported in part by the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP) and a grant from the Research for the Future Program from the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS). K.K. is a fellow from FAPESP (proc. 1998/11693-5). W.F.A.Jr. (300851/98-7) and M.S.P. (500079/90-0) are researchers of the Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

References

- [1] T. Piek, W. Spanjer, Chemistry and pharmacology of solitary wasp venoms, in: *Venoms of the Hymenoptera: Biochemical, Pharmacological and Behavioural Aspects*, Academic Press, London, 1986, pp. 161–307.
- [2] A.T. Eldefrawi, M.E. Eldefrawi, K. Konno, N.A. Mansour, K. Nakanishi, E. Oltz, P.N.R. Usherwood, Structure and synthesis of a potent glutamate receptor antagonist in wasp venom, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 4910–4913.
- [3] H. Karst, R.H. Fokkens, N. De Haan, G. Heuver, B. Hue, C. Kruk, N.M.M. Nibbering, T. Piek, W. Spanjer, Y.C. Tong, W. Van der Vliet, Beta-philanthotoxin, a novel glutamatergic antagonist for the insect neuromuscular synapse, *Comp. Biochem. Physiol.* 97c (1990) 317–327.
- [4] T. Yasuhara, P. Mantel, T. Nakajima, T. Piek, Two kinins isolated from an extract of the venom reservoirs of the solitary wasp *Megascolia flavifrons*, *Toxicon* 25 (1987) 527–535.
- [5] T. Piek, S. Hue, P. Mantel, T. Nakajima, M. Pelhate, T. Yasuhara, Threonine⁶-bradykinin in the venom of the wasp *Colpa interrupta* (F.) presynaptically blocks nicotinic synaptic transmission in the insect CNS, *Comp. Biochem. Physiol.* 96c (1990) 157–162.
- [6] K. Konno, M. Hisada, A. Miwa, Y. Itagaki, H. Naoki, N. Kawai, T. Yasuhara, H. Takayama, Isolation and structure of pompilidotoxins (PMTXs), novel neurotoxins in solitary wasp venoms, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250 (1998) 612–616.
- [7] K. Konno, A. Miwa, H. Takayama, M. Hisada, Y. Itagaki, H. Naoki, T. Yasuhara, N. Kawai, α -Pompilidotoxin (α -PMTX), a novel neurotoxin from the venom of a solitary wasp, facilitates transmission in the crustacean neuromuscular synapse, *Neurosci. Lett.* 238 (1997) 99–102.
- [8] A. Harsch, K. Konno, H. Takayama, N. Kawai, H. Robinson, Effects of α -pompilidotoxin on synchronized firing in networks of rat cortical neurons, *Neurosci. Lett.* 252 (1998) 49–52.
- [9] Y. Sahara, M. Gotoh, K. Konno, A. Miwa, H. Tsubokawa, H.P.C. Robinson, N. Kawai, A new class of neurotoxin from wasp venom slows inactivation of sodium current, *Eur. J. Neurosci.* 12 (2000) 1961–1970.
- [10] K. Konno, M. Hisada, H. Naoki, Y. Itagaki, T. Yasuhara, Y. Nakata, A. Miwa, N. Kawai, Molecular determinants of binding of a wasp toxin (PMTXs) and its analogs in the Na⁺ channels proteins, *Neurosci. Lett.* 285 (2000) 29–32.
- [11] K. Konno, M. Hisada, H. Naoki, Y. Itagaki, N. Kawai, A. Miwa, T. Yasuhara, Y. Morimoto, Y. Nakata, Structure and biological activities of eumenine mastoparan-AF (EMP-AF), a novel mast cell degranulating peptide in the venom of the solitary wasp *Anterhynchium flavomarginatum micado*, *Toxicon* 38 (2000) 1505–1515.
- [12] F. Szoka, D. Papadopoulos, Formation of large unilamellar vesicles by reverse phase evaporation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 4194–4198.
- [13] G.R. Barlett, Phosphorous assay in column chromatography, *J. Biol. Chem.* 234 (1959) 466–468.
- [14] C.A. Rohl, R.L. Baldwin, Deciphering rules of helix stability in peptides, *Methods Enzymol.* 295 (1998) 1–26.
- [15] A. Sali, T.L. Blundell, Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints, *J. Mol. Biol.* 234 (1993) 779–815.
- [16] H. Kusunoki, K. Wakamatsu, K. Sato, T. Miyazawa, T. Kohno, G-protein-bound conformation of mastoparan-X: heteronuclear multidimensional transferred nuclear Overhauser effect analysis of peptide uniformly enriched with ¹³C and ¹⁵N, *Biochemistry* 37 (1998) 4782–4790.
- [17] T. Abe, N. Kawai, A. Miwa, Effects of a spider toxin on the

- glutaminergic synapse of lobster muscle. *J. Physiol.* 339 (1983) 243–252.
- [18] I. Hide, J.P. Bennett, A. Pizze, G.M. Boonen, D. Bar-Sagi, B.D. Gomperts, P.E.R. Tatham, Degranulation of individual mast cells in response to Ca^{2+} and guanine nucleotides: all-or-nothing event. *J. Cell Biol.* 123 (1993) 585–593.
- [19] M. Hisada, K. Konno, Y. Itagaki, H. Naoki, T. Nakajima, Advantages of using nested collision induced dissociation/post-source decay with matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry: sequencing of novel peptides from wasp venom. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14 (2000) 1828–1834.
- [20] T. Nakajima, S. Uzu, K. Wakamatsu, K. Saito, T. Miyazawa, T. Yasuhara, Y. Tsukamoto, M. Fujino, Amphiphilic peptides in wasp venom, *Biopolymers* 25 (1986) S115–S121.
- [21] M. Zasloff, Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 5449–5453.
- [22] Y. Hirai, M. Kuwada, T. Yasuhara, H. Yoshida, T. Nakajima, A new mast cell degranulating peptide homologous to mastoparan in the venom of Japanese hornet (*Vespa xanthoptera*). *Chem. Pharm. Bull.* 27 (1979) 1945–1946.
- [23] A. Argiolas, J.J. Pisano, Isolation and characterization of two new peptides, mastoparan C and crabrolin, from the venom of the European hornet, *Vespa crabro*, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 10106–10111.
- [24] Z. Oren, Y. Shai, Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides, *Biopolymers* 47 (1998) 451–463.
- [25] K. Matsuzaki, Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides, *Biochim. Biophys. Acta* 1376 (1998) 391–400.
- [26] K. Matsuzaki, Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes, *Biochim. Biophys. Acta* 1462 (1999) 1–10.
- [27] F. Canduri, P. Delatorre, V. Fadel, C.C.B. Lorenzi, J.H. Pereira, J.R. Olivieri, J. Ruggiero Neto, K. Konno, M.S. Palma, T. Yamane, W.F. de Azevedo Jr., Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of an eumenine mastoparan toxin. A new class of mast cell degranulating peptide in the wasp venom, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 56 (2000) 1434–1436.
- [28] P. Delatorre, J.R. Olivieri, J. Ruggiero Neto, C.C.B. Lorenzi, F. Canduri, V. Fadel, K. Konno, M.S. Palma, T. Yamane, W.F. de Azevedo Jr., Preliminary cryocrystallography analysis of an eumenine mastoparan toxin isolated from the venom of the wasp *Anterhynchium flavomarginatum micado*, *Biochim. Biophys. Acta* 1545 (2001) 372–376.
- [29] R.A. Laskowski, M.W. MacArthur, D.S. Moss, J.M.J. Thornton, PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *Appl. Crystallogr.* 26 (1993) 283–290.
- [30] T. Higashijima, J. Burnier, E.M. Ross, Regulation of G_i and G_o by mastoparan, related amphiphilic peptides, and hydrophobic amines, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 14176–14186.
- [31] A. Nicholls, K.A. Sharp, B. Honig, Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons, *Proteins Struct. Funct. Genet.* 11 (1991) 281–296.
- [32] V. Kurishnakumari, R. Nagaraj, Antimicrobial and hemolytic activities of crabrolin, a 13-residue peptide from the venom of the European hornet, *Vespa crabro*, and its analogs, *J. Pept. Res.* 50 (1997) 88–93.
- [33] R. Bals, M.J. Goldman, J.M. Wilson, Mouse β -defensin 1 is a salt-sensitive antimicrobial peptide present in epithelia of the lung and urogenital tract, *Infect. Immun.* 66 (1998) 1225–1232.
- [34] M. Shimoda, K. Ohki, Y. Shimamoto, O. Kohashi, Morphology of defensin treated *Staphylococcus aureus*, *Infect. Immun.* 63 (1995) 2886–2891.
- [35] K. Fujita, S. Kimura, Y. Imanishi, Self-assembly of mastoparan-X derivative having fluorescence probe in lipid, *Biochim. Biophys. Acta* 1195 (1994) 157–163.
- [36] L. Yan, M.E. Adams, Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 2059–2066.
- [37] D. Andreu, L. Rivas, Animal antimicrobial peptides: an overview, *Biopolymers* 47 (1998) 415–433.
- [38] M. Simmaco, G. Mignogna, D. Barra, Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us?, *Biopolymers* 47 (1998) 435–450.
- [39] P. Bulet, C. Hetru, J.-L. Dimarcq, D. Hoffmann, Antimicrobial peptides in insects; structure and function, *Dev. Comp. Immunol.* 23 (1999) 329–344.
- [40] R.E.W. Hancock, R. Lehrer, Cationic peptides: a new source of antibiotics, *Trends Biotechnol.* 16 (1998) 82–88.
- [41] K.P. Sai, M.V. Jagannadham, M. Vairamani, N.P. Raju, A.S. Devi, R. Nagaraj, N. Sitaram, Tigerinins: novel antimicrobial peptides from the Indian frog *Rana tigerina*, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 2701–2707.

