

SANDRO PIOLI ZELA

Estudos Estruturais de Proteínas Envolvidas na
Hemostasia e Disrupção de Membranas
Celulares



1910001428



Entregue em
25/08/05



SANDRO PIOLI ZELA

**Estudos Estruturais de Proteínas Envolvidas na
Hemostasia e Disrupção de Membranas
Celulares**



T. 1428/05

orientador: Prof. Dr. Raghuvir Krishnaswamy Arni

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – SP

2005.

577.112

Z49e

07/10/2005

Doação

R\$ 23,00

Autor(a)

Zela, Sandro Pioli.

Estudos estruturais de proteínas envolvidas na hemostasia e disrupção de membranas celulares / Sandro Pioli Zela – São José do Rio Preto : [s.n.], 2005

82 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Raghuvir Krishnaswamy Arni

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biofísica molecular. 2. Serina proteinases - Purificação. 3. Proteínas - Modelagem estrutural. 4. Serpentes - Veneno. I. Arni, Raghuvir Krishnaswamy. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.112



SANDRO PIOLI ZELA

**Estudos Estruturais de Proteínas Envolvidas na
Hemostasia e Disrupção de Membranas
Celulares**

Tese apresentada ao Departamento de Física do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto, para a obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular.

orientador: Prof. Dr. Raghuvir Krishnaswamy Arni
SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – SP

2005.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Raghuvir Arni, pelo acompanhamento ao longo de todo o desenvolvimento do trabalho do doutorado.

Ao Diogo, que me incentivou a continuar o doutorado, mesmo quando já me encontrava em vias de desistir.

Ao Magno, por ter me ensinado a manter a calma nas situações mais absolutamente difíceis.

Ao Mário, à Lisandra e à Simone, os quais me ajudaram continuamente no meu trabalho de purificação de proteínas.

Ao Nelson e ao Hugo, pelo apoio com relação aos problemas que tive nos procedimentos de modelagem molecular.

Aos meus amigos do Dep. de Física, que me suportaram nos meus piores momentos, os quais certamente foram muitos, e que mesmo assim continuaram me apoiando.

Aos Funcionários e Professores do Dep. de Física, que o mantém funcionando com eficiência, mesmo considerando-se a situação sempre instável e precária do serviço público neste país.

Ao CNPq, que financiou meu trabalho de doutorado, por meio do Processo nº 141804/2003-03.



RESUMO

Serino-proteases de venenos de serpentes tem estado em uso no tratamento de doenças de origem trombótica, bem como no controle da coagulação em cirurgias já há alguns anos. Para que se possa entender o seu modo exato de ação, é necessário conhecer a estrutura tridimensional das proteases em detalhe, o que pode ser conseguido com técnicas modernas como cristalografia de raios X e modelagem molecular; até o momento somente a estrutura de uma serino-protease de veneno, a TSV-PA, é conhecida, demandando um estudo mais detalhado desta classe de proteases.

Neste trabalho foi desenvolvido um protocolo de purificação de serino-proteases de serpentes, sendo que testes físico-químicos e bioquímicos posteriores confirmaram a eficácia do método na obtenção das proteases em forma isolada, própria para a realização de experimentos de cristalização necessários à cristalografia de raios X.

Outro resultado obtido foi a determinação da estrutura da catroxase I da *C. atrox*, a partir da modelagem molecular tridimensional da respectiva seqüência; comparação da estrutura modelada obtida com a da quimotripsina, proteína padrão da classe das serino-proteases, e com a TSV-PA, demonstrou que a modelagem foi efetivamente bem-sucedida, demonstrando a eficácia do uso deste método como um complemento à cristalografia.



LISTA DE ABREVIATURAS

ABSTRACT

Serine proteases are used clinically for the treatment of thrombotic disorders and for the control of blood coagulation. The three-dimensional crystallographic structures and molecular modeling techniques are essential for an understanding of the mode of action of these enzymes at the atomic level. Currently, only the structure of TSV-PA, a venom serine protease has been determined.

The aim of this work was to purify and characterize snake venom serine proteases for crystallographic studies. Additionally, the structure of catroxase I from the venom of *C. atrox* was modeled and the structure has been compared with chymotrypsin.

LISTA DOS PROGRAMAS USADOS

Blast	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/
CCP4	http://www.ccp4.ac.uk/main.html
Clustal-W	http://www.biolinux.org/clustalw.html
Derzo	http://www.hkl-argy.com/
Gramm	http://www.bionformatica.ku.edu/research/vakser/resources/gramm/gramm.html
Gromacs	http://www.gromacs.org/installation/prerequisites.php
Hex	http://www.ccd.sdu.ac.uk/hex/
Modeller	http://salilab.org/modeller/download_installation.html
Mosflm	http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/harry/mosflm/
Pal Blast	http://bioportal.weizmann.ac.il/education/materials/gcg/psblast.html
Swiss-Model	http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html
T-coffee	http://apt.bca.ki.ac/bioqna/redhat/3.0/1386/RPMS_biorpm/
Turbo-Erdo	http://afmb.cnrs-mrs.fr
Verify3D	http://www.doc.ic.ac.uk/~cs/Services/Verify_3D/

LISTA DE ABREVIATURAS

BapNa	N α -benzoil-D,L-arginina- <i>p</i> -nitroanilida
BLOSUM	blocks substitution matrix
DLS	dynamic light scattering
pai-1	plasminogen activator inhibitor
PAM	percent accepted mutation
TAME	N α -toluenosulfonilarginina
TIM	triose fosfato isomerase
t-PA	tissue plasminogen activator
Tris	tris-hidroximetil-aminometano
TSV-PA	<i>Trimeresurus stejnegeri</i> venom plasminogen activator
UI	unidade internacional

LISTA DOS PROGRAMAS USADOS

Blasta	http://www.expasy.org/tools/blast/?UniRef100
CCP4	http://www.ccp4.ac.uk/main.html
Clustal-W	http://www.biolinux.org/clustalw.html
Denzo	http://www.hkl-xray.com/
Gramm	http://www.bioinformatics.ku.edu/research/vakser/resources/gramm/gramm1
Gromacs	http://www.gromacs.org/installation/prerequisites.php
Hex	http://www.csd.abdn.ac.uk/hex/
Modeller	http://salilab.org/modeller/download_installation.html
Mosflm	http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/harry/mosflm/
Psi-Blast	http://biportal.weizmann.ac.il/education/materials/gcg/psiblast.html http://xylian.igh.cnrs.fr/blast/psi_blast2.html
Swiss-Model	http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html
T-coffee	http://apt.bea.ki.se/biorpms/redhat/8.0/i386/RPMS.biorpms/
Turbo-Frodo	http://afmb.cnrs-mrs.fr
Verify3D	http://www.doe-mpi.ucla.edu/Services/Verify_3D/

SUMÁRIO

I – INTRODUÇÃO	01
1.1) Classificação das Serino-Proteases	02
1.2) Importância Fisiológica das Serino-Proteases	04
1.3) Estrutura e Atividade das Moléculas de Serino-Proteases	12
II – Objetivos	21
III – Materiais	22
3.1) Amostras Protéicas	22
3.2) Reagentes	22
3.3) Colunas Cromatográficas	22
IV – Métodos	23
4.1) Purificação de proteínas	23
4.2) Caracterização das Proteínas Purificadas	26
4.3) Cristalização de proteínas	35
4.4) Modelagem Molecular para Determinação de Estruturas	40
V – Resultados	51
5.1) Purificação Cromatográfica	51
5.1.1) Cromatografia por Afinidade	51
5.1.2) Cromatografia por Troca Iônica	52
5.2) Eletroforese Desnaturante em Gel de Poliacrilamida	53
5.3) Quantificação das Amostras protéicas	54
5.4) Medidas de DLS das Frações Purificadas	54
5.5) Cristalização de serino-protease de <i>Bothrops jararacussu</i>	56
5.6) Coleta de dados de difração de raios X	57
5.7) Processamento dos dados de difração de raios X	57
5.8) Determinações Bioquímicas	58
5.9) Modelagem Estrutural da Protease de <i>Crotalus atrox</i>	59
VI – Discussão	64
VII – Conclusão	73
Referências	74



LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Reação de substituição em grupamento acila.	01
Figura 2: Reação de hidrólise de ligação peptídica.	01
Figura 3: Mecanismo de ação de cisteíno-proteases, metalo-proteases e proteases aspárticas.	03
Figura 4: Esquema geral da hidrólise protéica.	03
Figura 5: Mecanismo da coagulação sanguínea.	07
Figura 6: Esquema da estrutura tridimensional da quimotripsina.	14
Figura 7: Mecanismo de ação de uma serino-protease.	15
Figura 8: Interações entre o substrato e a serino-protease.	18
Figura 9: Diagrama de uma coluna de resina de troca catiônica.	24
Figura 10: Representação de um grupamento <i>p</i> -aminobenzamidina.	25
Figura 11: Diagrama esquemático do processo físico de DLS.	29
Figura 12: Substratos sintéticos para a determinação da atividade enzimática de serino-proteases.	33
Figura 13: Diagrama de fases esquemático da solubilidade da proteína em função da concentração de precipitante.	37
Figura 14: Aparato experimental usado em cristalização	38
Figura 15: Purificação por cromatografia de afinidade do veneno de <i>B. jararaca</i> , <i>C. d. terrificus</i> e <i>L. m. muta</i> .	51
Figura 16: Purificação mediante cromatografia de troca aniônica dos venenos de <i>B. jararaca</i> , <i>C. d. terrificus</i> e <i>L. m. muta</i> .	52
Figura 17: Eletroforese das frações obtidas por purificação por troca iônica do veneno de <i>B. jararaca</i> , <i>C. d. terrificus</i> e <i>L. m. muta</i> .	53
Figura 18: Experimentos de DLS das frações obtidas por purificação por troca iônica do veneno de <i>C. d. terrificus</i> e <i>L. m. muta</i> .	55
Figura 19: Cristais obtidos e padrão de difração respectivo para serino-protease de <i>B. jararacussu</i>	57
Figura 20: Alinhamento entre as seqüências da cratoxase I (CROT) a das proteínas usadas como molde	60
Figura 21: Valores de escore calculados pelo programa Verify3D para os resíduos de aminoácidos da proteína modelada catroxase I.	61

Figura 22: Gráfico de Ramachandran para a proteína modelada catroxase I	62
Figura 23: Inibidores testados na estrutura modelada da protease de <i>C. atrox</i> .	63
Figura 24: Alinhamento das seqüências de quimotripsina (1ACB) e subtilisina (1SBI)	64
Figura 25: Sobreposição das estruturas da quimotripsina e da subtilisina	65
Figura 26: Alinhamento das seqüências de quimotripsina (1ACB) e catroxase (CROT)	66
Figura 27: Sobreposição das estruturas da quimotripsina e da catroxase I	67
Figura 28: Alinhamento das seqüências de TSV-PA (1BQY) e catroxase I	68
Figura 29: Sobreposição das estruturas da TSV-PA e da catroxase I	69
Figura 30: Catroxase I complexada com os inibidores aminometilciclo-hexano, benzamidina e 4-fenilbutilamina	70
Figura 31: Catroxase I quimicamente tratada com os inibidores diisopropil-fluorofosfato e fenilmetilfluorosulfonato	71

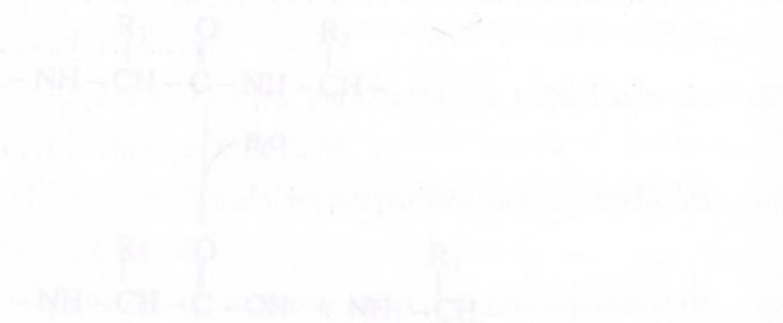


Figura 2: Reação de fosforilação de peptídeos testados (R₁, R₂) com os grupos laterais de resíduos de aminoácidos.

I - INTRODUÇÃO

Proteases catalisam a hidrólise da ligação peptídica, podendo também efetuar a hidrólise de pequenas moléculas contendo ligações amida ou ésteres. Neste tipo de reação, o reagente que se liga ao grupo acila em geral é a água, embora outros nucleófilos possam eventualmente ser usados, de modo que a representação mais geral para a reação catalisada por estas enzimas é vista na figura 1 (March e Smith, 2001, Fersht, 1999):

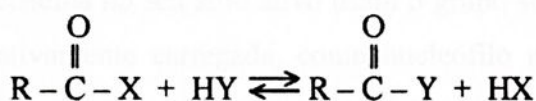


Figura 1: Reação de substituição em grupamento acila (X: grupo de saída, Y: nucleófilo).

Correto afirmar que em condições fisiológicas usuais a principal atividade destas enzimas é efetivamente a hidrólise protéica, a qual ocorre não apenas durante o processo digestivo, mas também no processamento das proteínas produzidas nos ribossomos, as quais muitas vezes encontram-se na forma inativa e necessitam ser seletivamente hidrolisadas para que assumam a sua forma ativa final. A descrição esquemática deste processo é apresentada na figura 2:

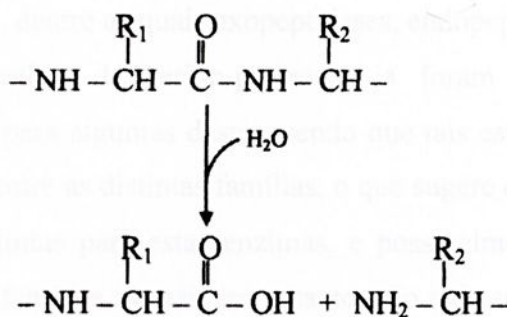


Figura 2: Reação de hidrólise de ligação peptídica (R₁, R₂: cadeias laterais de resíduos de aminoácidos).

1.1) Classificação das Serino-Proteases

Dentre os diversos tipos de proteases conhecidos, destacam-se cinco principais, que contem em seu sítio catalítico, respectivamente, serina, treonina, cisteína, ácido aspártico, ou um íon metálico (Rawlings e Barrett 1993). Dentro de cada um destes grupos é possível identificar várias famílias de proteases, cada qual com seqüências bastante similares, as quais podem ser agrupadas em superfamílias que compreendem conjuntos de famílias com uma mesma origem evolutiva.

Proteases contendo cisteína no seu sítio ativo usam o grupo sulfidríla deste resíduo de aminoácido, na forma negativamente carregada, como nucleófilo no mecanismo catalítico (figura 3a). Quanto às metalo-proteases e às proteases aspárticas, o nucleófilo é uma molécula de água ativada por interação com um grupo carboxila, sendo que em ambos os casos observa-se a existência de um intermediário tetraédrico no mecanismo reacional, o qual se forma transientemente quando o carbono trigonal da ligação peptídica, ativado pelo metal ou por um segundo grupo carboxila (figuras 3b e 3c), reage com o nucleófilo. O mecanismo de ação das serino-proteases é o mais bem compreendido dentre todas as proteases, sendo semelhante ao das proteases contendo treonina, e será descrito em detalhes nas seções seguintes (Fersht, 1999, Creighton, 1992).

Serino-proteases constituem um grupo diversificado de enzimas proteolíticas contendo um resíduo de serina nucleofílico em seu sítio ativo, existentes tanto em bactérias e eucariontes como até em vírus. Neste grupo estão incluídas enzimas com os mais variados tipos de atividade catalítica, dentre as quais exopeptidases, endopeptidases, e oligopeptidases.

Mais de vinte famílias de serino-proteases já foram identificadas, tendo sido determinadas as estruturas para algumas destas, sendo que tais estruturas aparentemente não guardam qualquer relação entre as distintas famílias, o que sugere que haja pelo menos quatro origens evolucionárias distintas para estas enzimas, e possivelmente até mais (Rawlings e Barrett 1994); dentre estas famílias as mais importantes são a da subtilisina e a da tripsina, as quais, embora tenham mecanismos de ação muito similares, não apresentam qualquer similaridade detectável entre si, exceto entre os resíduos de aminoácidos situados no sítio ativo ou em suas vizinhanças, apresentando um dos mais interessantes exemplos de evolução convergente de proteínas em nível molecular; mesmo dentro de uma dada espécie podem existir serino-proteases com os mais distintos tipos de atividade e funções biológicas, como no caso das humanas, que exercem funções que vão da digestão de alimentos à fibrinólise e a coagulação sanguínea e ativação do sistema complemento imune (Yousef et al., 2004).

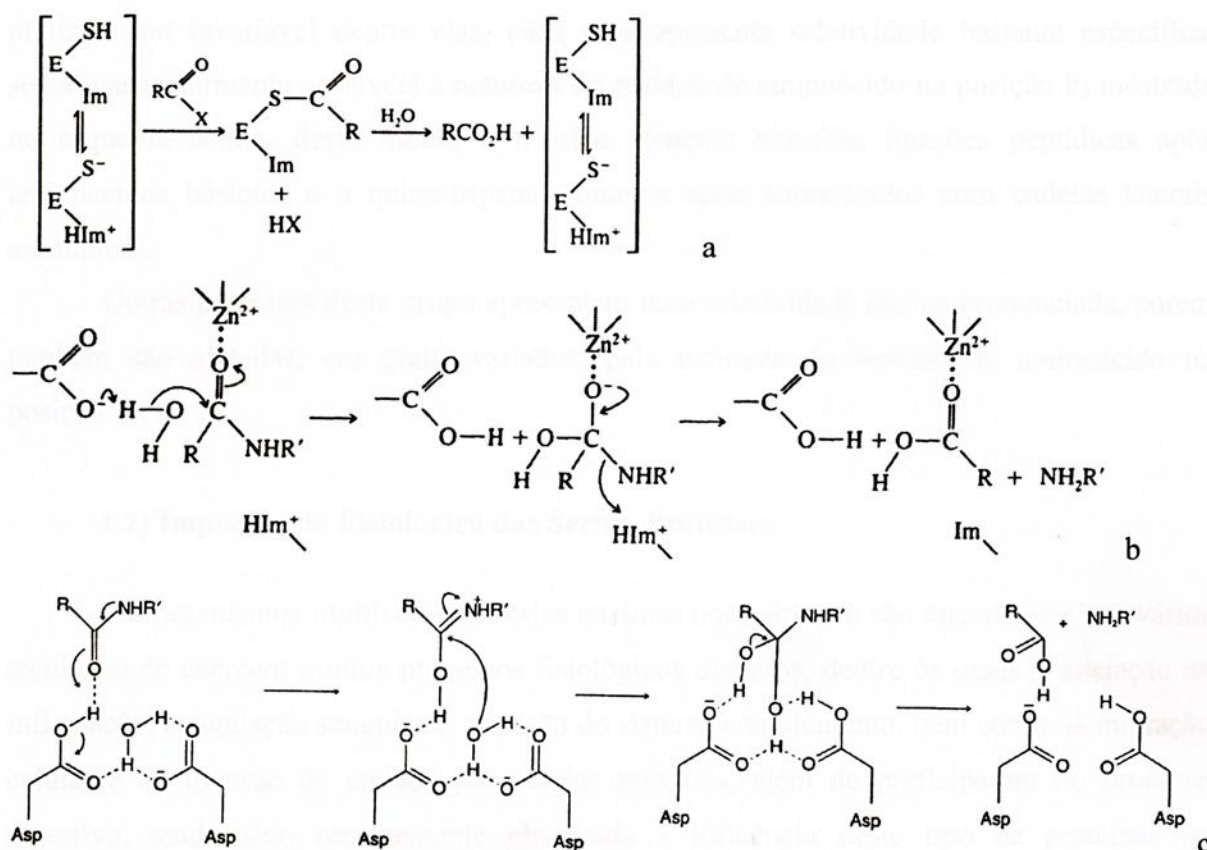


Figura 3: Mecanismo de ação de a) cisteíno-proteases, b) metalo-proteases e c) proteases aspárticas (E: enzima, R,R': resto da cadeia, X: grupo de saída, Im: grupo imidazol, Asp: resíduo de ácido aspártico).

A seletividade das enzimas deste grupo é bastante variável, sendo que a terminologia usada na literatura para descrever a especificidade destas proteases frente a vários substratos baseia-se nas posições dos resíduos de aminoácidos com relação à ligação peptídica sendo clivada (figura 4), sendo P_1 e P_1' os resíduos envolvidos na reação (Schechter e Berger, 1967):

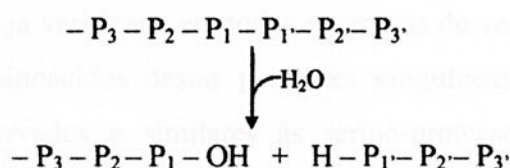


Figura 4: Esquema geral da hidrólise protéica.

Serino-proteases da família S1, cujos exemplos principais são a tripsina, a quimotripsina e a elastase, normalmente exercem atividade catalítica extracelular.

Mesmo sendo o mecanismo de ação das serino-proteases da família da tripsina praticamente invariável dentre elas, cada uma apresenta seletividade bastante específica, sendo particularmente sensíveis à natureza do resíduo de aminoácido na posição P_1 mostrada no esquema acima; deste modo, a tripsina somente hidrolisa ligações peptídicas após aminoácidos básicos, e a quimotripsina somente após aminoácidos com cadeias laterais aromáticas.

Outras proteases deste grupo apresentam uma seletividade menos pronunciada, porém também são afetadas, em graus variados, pela natureza do resíduo de aminoácido na posição P_1 .

1.2) Importância Fisiológica das Serino-Proteases

Em organismos multicelulares estas enzimas normalmente são encontradas em vários tecidos onde exercem muitos processos fisiológicos distintos, dentre os quais a iniciação da inflamação, coagulação sanguínea, ativação do sistema complemento, bem como na migração celular e na invasão de tecidos por células tumorais, além de participarem do processo digestivo, tendo sido recentemente observada a influência deste tipo de proteínas no desenvolvimento do sistema nervoso central bem como no surgimento de patologias (Turgeon e Houenou, 1997).

Em humanos, as serino-proteases são bastante similares entre si, podendo ser classificadas basicamente em apenas duas famílias: a da tripsina/quimotripsina e a das carboxipeptidases. De particular interesse são as serino-proteases da família da tripsina/quimotripsina, algumas das quais estão envolvidas no processo de hemóstase, atuando na coagulação, agregação plaquetária, e controle fibrinolítico da coagulação; elas são produzidas pelo organismo sempre numa forma inativa (zimogênio), sendo posteriormente submetidas à hidrólise parcial, quando sua ação é necessária, gerando a respectiva forma ativa, tendo sido este processo já verificado em todos os grupos de vertebrados. Os primeiros cerca de 250 resíduos de aminoácidos destas proteases sanguíneas, que contem a tríade catalítica, são bastante conservados e similares às serino-proteases digestivas, sendo a diferença entre elas observada na região do N-terminal.

Assim como as proteases com função digestiva (tripsina e quimotripsina), as envolvidas na coagulação sanguínea necessitam ser previamente ativadas mediante clivagem proteolítica controlada; no entanto, as proteases do sistema hemostático diferem das digestivas no sentido de somente sofrerem ativação proteolítica se estiverem presentes no



meio o íon Ca^{2+} e fragmentos de membrana fosfolipídica negativamente carregados (contendo fosfatidilserina), os quais encontram-se no lado citoplásmico das células, de modo que sua ativação ocorre apenas quando há um ferimento causando a exposição destes fosfolípidios ao plasma sanguíneo.

O fragmento N-terminal resultante da clivagem normalmente possui um tamanho igual ou maior que a porção C-terminal e, com exceção da protrombina, estes permanecem unidos entre si por ligações dissulfeto mesmo após a ativação; considera-se que a porção N-terminal seja responsável ao menos em parte pela alta especificidade das proteases do plasma com relação a seus respectivos substratos.

No processo de coagulação, é fundamental a formação de uma malha constituída de moléculas da proteína fibrina ligadas entre si, que ocorre por meio de uma reação proteolítica envolvendo o fibrinogênio, catalisada por uma serino-protease denominada trombina; neste processo, dois dos três pares de cadeias que constituem a estrutura hexamérica do fibrinogênio sofrem hidrólise na porção N-terminal, liberando fibrinopeptídios, e a fibrina resultante então espontaneamente se agrega de modo a formar fibras inicialmente frágeis, as quais, em presença de outra enzima, o fator XIIIa, passam a se unir entre si por meio de ligações amida, formando o coágulo final mais estável.

Embora a principal etapa da coagulação seja a acima descrita, o processo como um todo é bastante complexo, envolvendo ao menos sete reações encadeadas, além de cerca de quatro outras reações acessórias, em grande parte catalisadas por serino-proteases (fatores IIa, VIIa, IXa, Xa, XIa, XIIa, Proteína Ca e calicreína); o mecanismo envolvido é de fato ainda mais elaborado, pois o produto de uma dada etapa pode afetar mais de uma etapa seguinte, havendo também situações em que um dos componentes do sistema pode interferir no próprio processo de sua síntese, como é o caso da trombina, que uma vez formada, além de ativar o fibrinogênio, também ativa os fatores V, VIII e XI por meio da clivagem seletiva de suas respectivas cadeias, acelerando por fim a sua própria síntese, conforme mostrado na figura 5. Deve-se notar ainda que ela também causa ativação do fator III responsável pelo processo de fibrinólise, demonstrando assim sua importância no controle integral do processo de coagulação (Voet e Voet, 1995, Aires, 1999).

Em venenos de serpentes, diversas proteínas e polipeptídios podem ser identificados, muitos dos quais são proteases mais ou menos específicas, as quais se originaram muito provavelmente como enzimas digestivas, tendo ao longo do processo evolutivo se tornado toxinas com atividade substancial sobre o sistema de hemóstase, sendo porém a principal função do veneno de serpentes, a paralisia ou a morte quase instantânea da presa, realizada

basicamente por neurotoxinas e toxinas de ação circulatória direcionadas a órgãos vitais da vítima (Harvey, 1991).

Neste sentido, considera-se a existência destas proteases em geral como sendo um resultado secundário do processo evolutivo das serpentes, o que é confirmado pelo fato de estudos de atividade biológica terem confirmado que a atividade proteolítica do veneno, ainda que possa vir a causar a morte da presa após um período relativamente prolongado, não contribui diretamente para o efeito tóxico agudo do veneno, que ocorre sobre o sistema nervoso, e que é o de importância verdadeiramente fundamental para a serpente (Meier e Stocker, 1984); neste sentido, pode-se afirmar que, excetuando-se casos específicos como no gênero *Bothrops*, em que podem causar choque hipovolêmico, a função principal destas proteases seria a de realizar uma pré-digestão dos tecidos da presa antes da serpente ingeri-la.

Dentre as enzimas proteolíticas encontradas no veneno de serpentes estão as serino-proteases da família S1, com elevado grau de atividade, as quais possuem a capacidade de clivar o fibrinogênio existente na corrente sanguínea gerando coágulos fracos de fibrina que interferem no processo normal de hemóstase, havendo também as que ativam o fator V e a proteína C plasmática, bem como as que, ao clivar o fibrinogênio, o fazem de maneira a gerar fragmentos incapazes de formarem coágulos (Hutton e Warrel, 1993); algumas proteases, por fim atuam de maneira não-seletiva, causando simplesmente a proteólise dos tecidos da vítima (Tabela 1). Todas estas distintas proteases, embora não sendo propriamente letais por si mesmas, ao agirem sobre o sistema circulatório causam danos hemorrágicos intensos; a atividade destas proteases depende obviamente da quantidade presente no veneno, sendo que a abundância destas proteases em serpentes é bastante variável, chegando nos casos dos gêneros Viperidae e Crotalidae a 20% do total do peso seco das proteínas contidas no veneno.

Tabela 1: Serino-proteases de venenos de serpentes

Classificação	Substrato
Trombina-símile: Ancrod, batroxobin, bilineobin, crotalase	Fibrinogênio A/B
Calicreína-símile: Halystase e gilatoxin	Cininogênio
Outras atividades: Protac RVV-V PA-BJ TSV-PA	Proteína C Fator V Plaquetas Plasminogênio

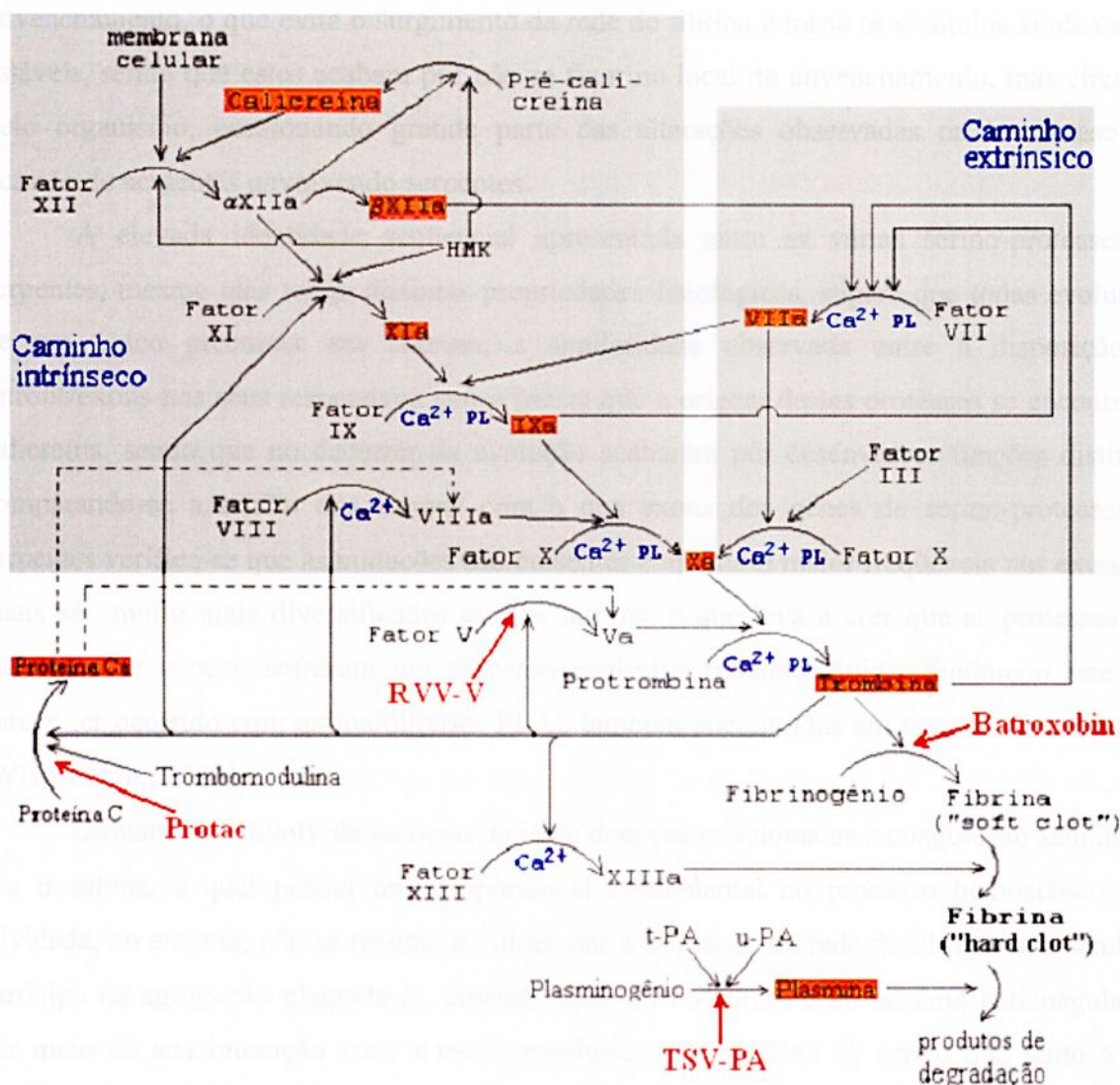


Figura 5: Mecanismo da coagulação sanguínea, com as serino-proteases em destaque (PL: fosfolípido de membrana; linhas tracejadas: inibição; vermelho: proteases de serpentes).

Dentre estas serino-proteases, as mais estudadas são as que clivam o fibrinogênio gerando coágulos, as quais por terem atividade semelhante à da trombina, são denominadas trombina-símbles, encontradas principalmente no gênero Viperidae; estas enzimas se assemelham também à tripsina do intestino de vertebrados, no sentido de hidrolisarem apenas ligações peptídicas envolvendo aminoácidos positivamente carregados (Zhang, 1998).

Como as proteases de origem ofídicas têm atuação distinta das humanas, hidrolisando apenas uma das três cadeias do fibrinogênio, a polimerização dos monômeros de trombina que ocorre é bastante limitada, formando diversos coágulos frágeis; como também são incapazes de ativar o fator XIII do sangue, não se forma o fator XIIIa no processo de

envenenamento, o que evita o surgimento da rede de fibrina e torna os coágulos ainda menos estáveis, sendo que estes acabam por não se fixar no local do envenenamento, mas circulam pelo organismo, ocasionando grande parte das alterações observadas na hemóstase por ocasião de acidentes envolvendo serpentes.

A elevada identidade seqüencial apresentada entre as várias serino-proteases de serpentes, mesmo elas tendo distintas propriedades fisiológicas, sugere que todas evoluíram de um único precursor em comum; a similaridade observada entre a disposição de introns/exons nos seus respectivos genes indica que a origem destas proteases se encontra na calicreína, sendo que no decorrer da evolução acabaram por desenvolver funções distintas; comparando-se a região dos introns com a dos exons dos genes de serino-proteases de serpentes verifica-se que as mutações são presentes com muito maior freqüência nos exons, os quais são muito mais diversificados que os introns, o que leva a crer que as proteases das glândulas de veneno sofreram um processo evolutivo bastante rápido, fenômeno este que parece ter ocorrido com as fosfolipases PLA2 também encontradas em venenos de serpentes (Wisner et al., 2000).

Diretamente envolvida na ocorrência de doenças relacionadas à coagulação sanguínea, é a trombina, a qual possui uma importância fundamental no processo hemostático; sua atividade, no entanto, não se resume a influenciar a formação da rede de fibrina, mas também participa na agregação plaquetária, atuando também no controle do sistema anticoagulante, por meio de sua interação com a trombomodulina e a proteína C, sendo que tanto a sua atividade coagulante como a anticoagulante é exercida pela mesma porção da sua estrutura tridimensional, que contem o sítio ativo e um domínio fortemente básico. De fato, tanto a trombina como o fator Xa tem recentemente sido objeto de estudos para o desenvolvimento de possíveis compostos antitrombóticos, tendo sido verificado que substâncias capazes de reduzir suas atividades respectivas podem ser úteis no tratamento de doenças cardiovasculares como infarto do miocárdio, trombose e angina, não sendo observados maiores efeitos colaterais relativos a hemorragias (Salyers et al., 2004).

Considerando-se que existem algumas proteases de venenos de serpentes que possuem, cada qual, apenas uma ou mais, mas não todas as possíveis atividades exercidas pela trombina, estudos de estrutura-atividade envolvendo estas proteases podem ser úteis para determinar quais os domínios que interagem com cada uma das diversas moléculas-alvo da trombina, o que poderia em princípio ser usado para desenvolver novos tipos de compostos com ação antitrombótica, por meio do ajuste preciso das atividades coagulante e anticoagulante da trombina. A grande relevância do tratamento adequado da trombose é

evidente, e reside no fato de ela ser uma importante causa de doenças cardiovasculares tais como infarto agudo do miocárdio.

Para o tratamento destas doenças os agentes trombolíticos geralmente usados são os ativadores de plasminogênio, os quais estimulam a formação da serino-protease plasmina responsável pela dissolução da rede de fibrina. Um dos principais ativadores de plasminogênio é o t-PA, o qual possui, no entanto diversas desvantagens, incluindo meia-vida de poucos minutos e rápida inativação *in vivo* por interação com o seu inibidor endógeno (pai-1), resultando por fim na recorrência da oclusão coronária e complicações hemorrágicas.

Recentemente, verificou-se existir na serpente *Trimeresurus stejnegeri* uma serino-protease, designada TSV-PA, capaz de afetar o processo de fibrinólise por meio da ativação do plasminogênio; ao contrário do t-PA, não se encontra na estrutura da TSV-PA um domínio responsável pela absorção da proteína pelas células do fígado, o que poderia explicar o fato desta protease apresentar uma meia-vida mais elevada que a do t-PA, já que sua remoção do meio sanguíneo ocorre em uma taxa bem menor, fenômeno este que também já foi observado para a batroxobina, outra protease que não possui o domínio presente no t-PA (Parry et al., 1998).

Outra vantagem da TSV-PA é que não é inibida pelos inibidores fisiológicos de serino-proteases conhecidos como serpins; não se conhece a natureza da resistência da protease a tais inibidores, porem sabe-se que a adição de um laço do t-PA, contendo 36 resíduos de aminoácidos, à cadeia da TSV-PA, resulta em derivados que são inibidos pela pai-1; outra possibilidade para a ausência de ação dos inibidores pode ser o fato de a TSV-PA possuir um resíduo de fenilalanina na posição 193, o que não ocorre em outras serino-proteases, que possuem um resíduo de glicina nesta posição (Braud et. al., 2002).

Como a estrutura tridimensional da TSV-PA já foi determinada, ela poderá servir como um modelo para o estudo das propriedades dos agentes trombolíticos em uso na atualidade, com o objetivo de tentar melhorar a sua atividade, demonstrando assim a relevância da pesquisa de venenos de serpentes na terapêutica de doenças de origem cardiovascular (Wisner et al., 2000).

Dentre as proteases trombina-símeis já em uso, pode-se citar o ancrod, a batroxobina e a crotalase, dentre outros fármacos.

Com relação à ancrod, isolada de *Calloselasma rhodostoma*, além de possuir as mesmas propriedades apresentadas pela trombina, tem ainda a vantagem de não sofrer inibição pela heparina e possuir uma seletividade bem mais elevada, causando a hidrólise somente do fibrinogênio do plasma, tendo porem o inconveniente de ser inativada pelo

sistema imune, ao contrário do que ocorre com a trombina (Pitney e Regoeczi, 1970, Stocker, 1978). A batroxobina isolada de *Bothrops atrox*, por sua vez, apresenta uma menor estabilidade, ainda que sua atividade em si seja praticamente a mesma que a apresentada pela ancrod. Quanto à crotalase, isolada de *Crotalus adamenteus*, apresenta características distintas das proteases citadas, em particular por ter uma atividade similar à da calicreína, de modo que não apenas possui ação similar à da trombina, como também pode gerar por hidrólise a bradicinina com ação sobre o mecanismo de controle da pressão sanguínea (Markland, 1983).

Outras serino-proteases também apresentam potencial terapêutico, ainda que atuem mediante mecanismos totalmente distintos; assim, por exemplo, no veneno de *Trimeresurus mucrosquamatus* foi isolada uma protease, a β -fibrinogenase que digere parcialmente o fibrinogênio, originando um produto incapaz de formar coágulos, enquanto no veneno de *Vipera russelli* e de *Cerastes cerastes* foram encontradas serino-proteases altamente seletivas contra o fator X com elevada atividade coagulante, havendo ainda no veneno de *V. russelli* uma protease que ativa o fator V, não apresentando atividade sobre qualquer outro fator da coagulação (Owyang e Huang, 1979, Furie e Furie, 1976, Franssen et al., 1983, Kisiel e Canfield, 1981). A trombocitina, isolada do veneno de *Bothrops atrox marajoensis*, e a crotalocitina isolada de *C. horridus horridus*, agem em outro setor do processo de coagulação, a agregação plaquetária, possuindo ambas um nível de atividade inferior ao mostrado pela trombina (Niewiarowski et al., 1979, Schmaier et. al, 1986).

A batroxobina, sob o nome comercial de reptilase[®] (batroxobina associada a uma protease ativadora do fator X), é usada em laboratórios de análises clínicas, por exemplo, na determinação quantitativa da taxa de fibrinogênio no plasma de pacientes sob tratamento com heparina, além de ser recomendado o seu uso em testes nos casos em que se suspeite de alterações na trombina do paciente e na detecção de atividade fisiológica das plaquetas, bem como tem se mostrado útil no processo de obtenção dos fatores VIII e XIII em forma pura.

Em experimentos *in vivo*, tanto a reptilase[®] como ancrod, demonstraram exercer uma redução evidente no nível de fibrinogênio no plasma em animais e humanos, diminuindo consideravelmente a viscosidade sanguínea, com efeito positivo sobre órgãos submetidos à hipóxia causada por oclusões trombóticas, não tendo sido observada diminuição na contagem de plaquetas quando da aplicação destas proteases. O uso da batroxobina em animais em que a veia cava foi substituída por material polimérico resultou em melhor aceitação do enxerto que nos animais de controle, sendo que somente nestes foi notada a formação de coágulos na região do enxerto, o que está de acordo com a observação de que ainda que atue causando

defibrinação, a batroxobina apresenta uma tendência muito baixa a causar sangramentos (Stocker, 1990).

O uso clínico efetivo da batroxobina e da ancrod tem ocorrido principalmente na prevenção da formação de tromboembolias, devido à eficiente e segura redução dos níveis de fibrinogênio alcançada por estas proteases, sendo particularmente importante o fato de serem imunologicamente distintas, ainda que apresentem efeitos similares, o que permite o uso de batroxobina em pacientes que fiquem resistentes à ancrod, e vice-versa. Por outro lado, o fato de terem propriedades antigênicas faz com que sua ação no organismo possa ser prontamente interrompida pela administração do respectivo antiveneno se ocorrer algum efeito colateral grave por ocasião de seu uso, o que não pode ser feito no caso de outros tipos de drogas anticoagulantes. O uso destas drogas tem sido citado no tratamento de diversas doenças de natureza circulatória, incluído-se trombose venal (DVT) e arterial, infarto do miocárdio, trombose na retina, embolia pulmonar, e mesmo em tratamento da anemia falciforme (Belch et al., 1982, Pollak et al., 1982). Um estudo detalhado da ação da batroxobina e da ancrod no tratamento de diversos pacientes com complicações circulatórias, envolvendo instituições de vários países, resultou na conclusão de que seu uso como anticoagulante é mais eficiente e seguro que a terapia tradicional com heparina (Latallo, 1983).

Por outro lado, é interessante verificar que as proteases de veneno de serpente constituem um caso quase único na farmacologia, em que um mesmo tipo de droga pode ser usado para se obter reações praticamente reversas; desse modo, o uso de reptilase® e de botropase® (ambas contendo a mesma composição, diferindo apenas nas concentrações) em pequenas quantidades demonstrou ser eficaz no controle de pequenas hemorragias em cirurgias, incluindo estomacais, bem como nas de natureza ginecológica e urológica, e na prevenção de hemorragias no período pós-operatório tanto em pacientes normais como hemofílicos. No entanto, como resultado de um exaustivo conjunto de testes verificou-se que o processo de coagulação induzido por estas drogas parece ser disseminado por todo o plasma, o que torna impossível em princípio prever a ocorrência de complicações decorrentes de seu uso, e embora elas tenham sido usadas regularmente em cirurgias de pequeno alcance e em microcirurgias com bons resultados, sua aplicação em cirurgias de maior porte envolvendo sangramentos sérios poderia interferir no uso de outros tratamentos com conseqüências possivelmente graves para o paciente (Verstraete, 1977).

Deste modo, embora já estejam disponíveis no mercado drogas de natureza protéica há longo tempo, continua sendo necessária a busca de outras substâncias, de mesma natureza ou distintas, que possam ser usadas em intervenções cirúrgicas mais complexas.



1.3) Estrutura e Atividade das Moléculas de Serino-Proteases

Embora tenham substratos distintos, todas estas proteínas possuem a mesma estereoquímica do sítio ativo, conforme mostrado na figura 6 para a quimotripsina, considerada como o padrão para esta classe de proteases, diferindo sua especificidade somente devido a alterações em sua estrutura primária, o que é indicado claramente pelo fato de a identidade seqüencial entre as serino-proteases de venenos de serpentes ser da ordem de 65%, e mesmo a identidade seqüencial com as respectivas proteínas do sistema digestivo é superior a 30%. Embora o tamanho das diversas proteínas deste grupo possa variar bastante, a estrutura essencial destas proteínas é constituída por cerca de 230 aminoácidos, sendo que toda a variação observada na estrutura das serino-proteases tende a ser na sua porção N-terminal, com a parte C-terminal delas sendo bem conservada; as modificações na porção N-terminal são as responsáveis pela ligação destas proteínas a sítios de reconhecimento celular ou a co-fatores necessários ao seu funcionamento.

Analisando-se a estrutura terciária conhecida de mais de vinte serino-proteases similares à quimotripsina, nota-se que ela sempre se mantém bastante conservada, consistindo de uma unidade monomérica contendo dois barris β constituídos por seis fitas cada, quatro das quais dispostas numa seqüência dita chave grega e as duas seguintes dispostas no denominado grampo β ; os dois domínios em barril são separados pela fenda que contem o sítio catalítico de uma hélice α C-terminal, a qual interage com a porção N-terminal da cadeia de modo a ajudar na estabilização da estrutura secundária; sabe-se que estruturas em barril β são usualmente rígidas, e portanto qualquer possível flexibilidade da cadeia está limitada aos laços que conectam as fitas das folhas β conforme mostrado na figura 6. No caso das serino-proteases ofídicas que atuam sobre a hemostasia, encontram-se sempre doze resíduos de cisteína envolvidos em pontes de dissulfeto; mediante o alinhamento de seqüências de proteases de serpentes e humanas, é possível notar que algumas partes da cadeia peptídica das serino-proteases humanas encontram-se sempre ausentes nas respectivas seqüências de serpentes, sendo que a ausência destes resíduos seria a responsável pela sua resistência a inibidores (Perona e Craik, 1997, Parry, 1998, Wisner, 2000).

A reatividade extremamente elevada de um único resíduo de serina da protease com relação à ligação peptídica do substrato ou com inibidores indica que a hidroxila deste resíduo de serina é um nucleófilo desproporcionalmente forte; esta reatividade elevada é essencialmente devida à presença de um resíduo de histidina, o qual atua como uma base retirando o próton do grupo hidroxila, normalmente pouco reativo. O intermediário covalente

formado pelo ataque deste grupo hidroxila ao substrato é denominado de tetraédrico devido à configuração apresentada pelo carbono acílico durante a reação, a qual contrasta nitidamente com a geometria trigonal do mesmo carbono na ligação peptídica original. Para que isto ocorra, é necessário que o carbono alfa desloque-se relativamente ao carbono e o oxigênio do grupo acila, sendo que a forma tetraédrica gerada é instável, sofrendo facilmente a expulsão de um grupo nucleofílico; a repetição deste mecanismo por duas vezes seguidas, envolvendo na primeira etapa o grupo hidroxila da serina, e na segunda etapa uma molécula de água, resulta por fim na separação da cadeia original em duas novas cadeias polipeptídicas menores. Neste mecanismo reacional é fundamental ainda a presença de um aspartato no sítio ativo, o qual estabiliza a carga positiva que surge na histidina no decorrer da reação (Stryer, 1996); um forte indício de que a função deste resíduo deve ser importante para o mecanismo catalítico é o fato de que grupamentos carboxílicos com carga negativa localizados no interior de proteínas são extremamente raros, pois a presença de resíduos de aminoácidos hidrofílicos no núcleo hidrofóbico é supostamente desfavorável ao processo de enovelamento protéico (Miller, 1987, Gregory, 1995).

Ao conjunto de resíduos de aspartato, histidina e serina, localizados bem próximos entre si quase formando um alinhamento na região do sítio ativo, é dado o nome de tríade catalítica, a qual, no caso das proteases da família da quimotripsina, encontra-se numa fenda entre os dois barris β . É importante notar que estes resíduos ocorrem nas diferentes famílias de serino-proteases em diferentes ordens, tais como H57 D102 S195 na quimotripsina ou D32 H64 S221 na subtilisina, o que reforça a idéia de que algumas destas famílias não devem ter um ancestral em comum; uma análise comparativa das estruturas existentes de diversas famílias de serino-proteases permite verificar ainda que a disposição relativa do resíduo aspártico em relação aos de histidina e serina é tão variável, que seria em princípio possível afirmar que, em vez de uma tríade catalítica, o que efetivamente existe no sítio de reação seriam duas díades catalíticas atuando em conjunto, a Asp-His e a His-Ser (Perona, 1997).

Independentemente de sua origem, porem, ambos os tipos de serino-proteases possuem quatro características específicas: a tríade catalítica acima citada, a área do oxiânion, um laço no qual o substrato se liga, e uma área responsável pela seletividade.

A função do denominado poço do oxiânion é a de estabilizar o intermediário tetraédrico formado no decorrer da reação, o que é conseguido dispondo-se espacialmente de maneira adequada grupos capazes de formar ligações de hidrogênio com o átomo de oxigênio negativo presente no intermediário, conforme apresentado na figura 7, de modo a reduzir a carga total presente naquela região do substrato; acredita-se porem que a carga positiva que

aparece na histidina durante a reação também atua no sentido de neutralizar a carga negativa do oxigênio no estado de transição. Por outro lado, a existência destes dois fatores, embora atue na estabilização e favorecimento da formação do intermediário reativo, presumivelmente também desestabiliza o substrato original, contribuindo ainda mais para a diminuição da diferença de energia livre entre o substrato e o intermediário, o que favorecerá ainda mais a ocorrência da reação de hidrólise.

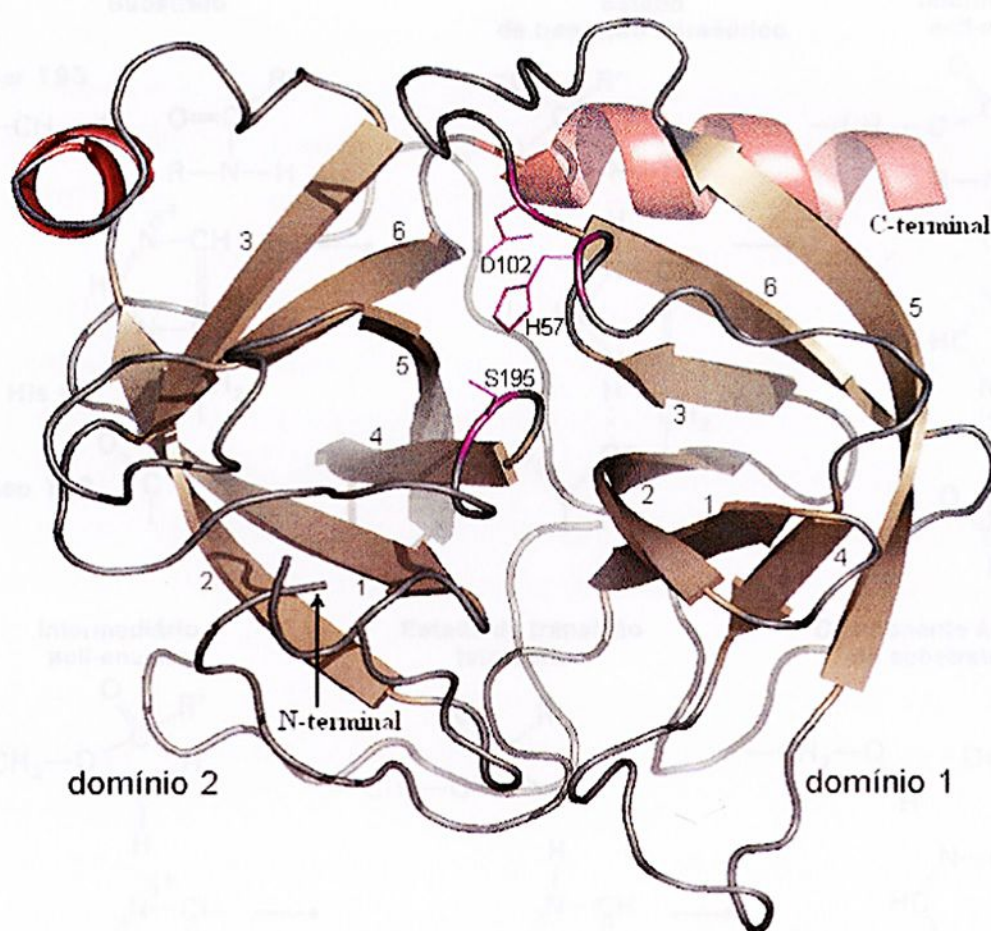


Figura 6: Esquema da estrutura tridimensional da quimotripsina.

Conforme já verificado, as serino-proteases não possuem uma especificidade absoluta com relação à estrutura do substrato, podendo atuar sobre cadeias peptídicas contendo os mais diversos tipos de resíduos, o que pode ser explicado quando se sabe que o substrato é atraído de modo não-específico por meio de ligações de hidrogênio a um laço da cadeia polipeptídica, formando um tipo de folha β anti-paralela, ainda que curta, entre elas. Dados experimentais

considerando a distância entre os átomos atraídos pela ligação de hidrogênio indicam que eles se encontram mais próximos entre si no estado de transição que no início da reação, quando o substrato ainda se encontra na sua forma original, de modo que esta interação não-específica entre a enzima e o reagente contribui também para a estabilização do intermediário da reação, com o correspondente aumento em sua velocidade (Branden e Tooze, 1991).

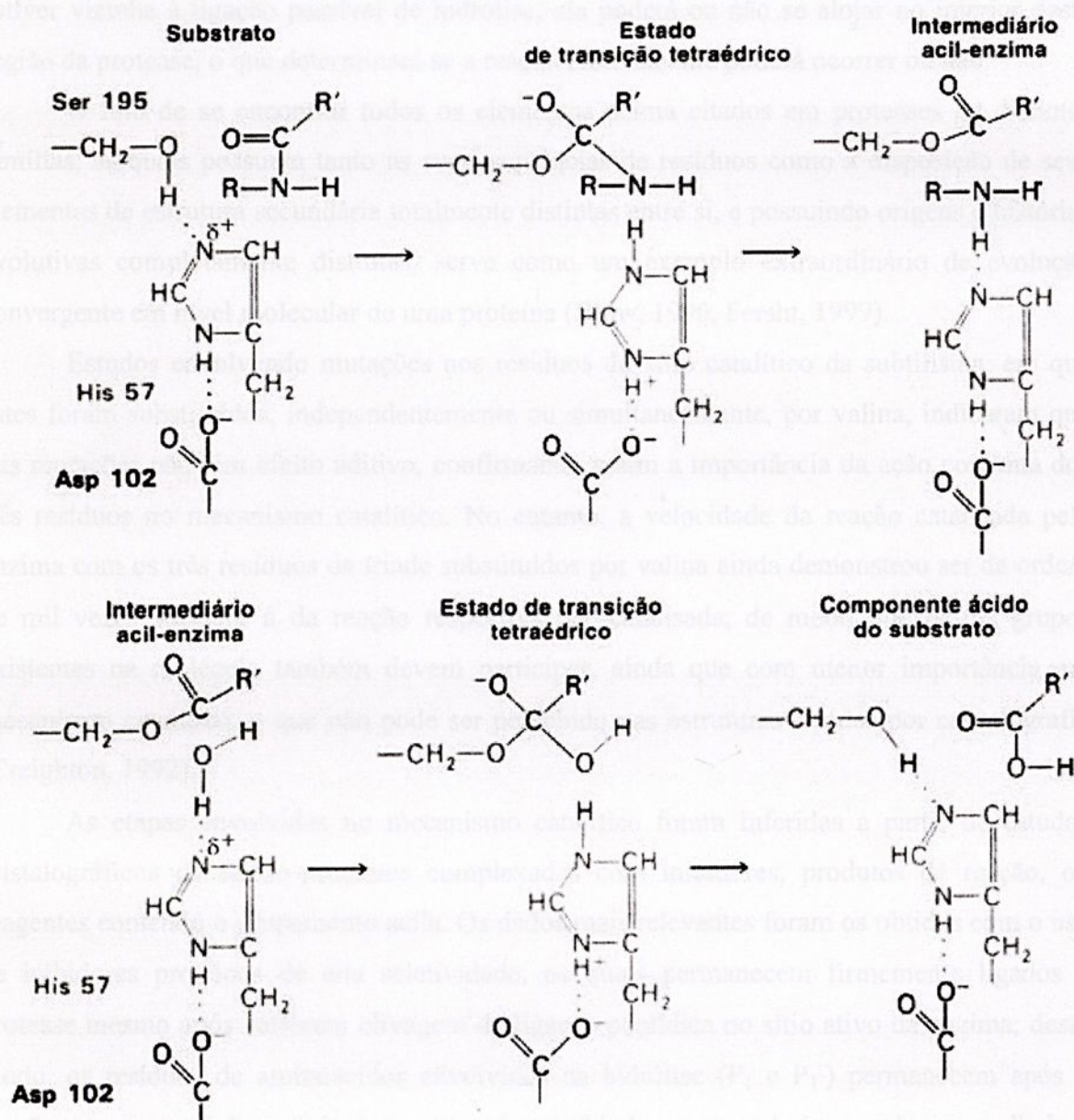


Figura 7: Mecanismo de ação de uma serino-protease.

Considerando-se que, ainda que atuem sobre substratos com os mais distintos resíduos de aminoácidos, as serino-proteases ainda assim catalisam a hidrólise de algumas proteínas com maior eficiência que outras, dependendo do tipo de cadeia lateral presente na vizinhança imediata da ligação peptídica sendo clivada, chega-se à conclusão que existe nas proximidades do sítio catalítico uma região responsável por este poder discriminante da protease, denominado de bolsão de especificidade; dependendo do tipo de cadeia lateral que estiver vizinha à ligação passível de hidrólise, ela poderá ou não se alojar no interior desta região da protease, o que determinará se a reação efetivamente poderá ocorrer ou não.

O fato de se encontrar todos os elementos acima citados em proteases de distintas famílias, as quais possuem tanto as suas seqüências de resíduos como a disposição de seus elementos de estrutura secundária totalmente distintas entre si, e possuindo origens e histórias evolutivas completamente distintas, serve como um exemplo extraordinário de evolução convergente em nível molecular de uma proteína (Blow, 1990, Fersht, 1999).

Estudos envolvendo mutações nos resíduos do sítio catalítico da subtilisina, em que estes foram substituídos, independentemente ou simultaneamente, por valina, indicaram que tais mutações não tem efeito aditivo, confirmando assim a importância da ação conjunta dos três resíduos no mecanismo catalítico. No entanto, a velocidade da reação catalisada pela enzima com os três resíduos da tríade substituídos por valina ainda demonstrou ser da ordem de mil vezes superior à da reação respectiva não-catalisada, de modo que outros grupos existentes na molécula também devem participar, ainda que com menor importância, no mecanismo catalítico, o que não pode ser percebido nas estruturas obtidas por cristalografia (Creighton, 1992).

As etapas envolvidas no mecanismo catalítico foram inferidas a partir de estudos cristalográficos de serino-proteases complexadas com inibidores, produtos de reação, ou reagentes contendo o grupamento acila. Os dados mais relevantes foram os obtidos com o uso de inibidores protéicos de alta seletividade, os quais permanecem firmemente ligados à protease mesmo após sofrerem clivagem de ligação peptídica no sítio ativo da enzima; deste modo, os resíduos de aminoácidos envolvidos na hidrólise (P_1 e P_1') permanecem após a reação em suas posições originais no sítio ativo, inibindo o acesso da água a ele e impedindo a continuação do processo de hidrólise, bem como permitindo ainda a reversão da reação de modo a recuperar a cadeia protéica original; um equilíbrio é normalmente alcançado em que cerca de metade das moléculas de inibidores protéicos encontra-se clivada. Embora os inibidores protéicos não tendam a apresentar identidade seqüencial entre si, todos eles usualmente ligam-se de maneira similar às serino-proteases; a cadeia lateral do resíduo de

aminoácido na posição P_1 liga-se no sítio efetivamente responsável pela seletividade da protease, designado como sub-sítio S_1 , existindo também sub-sítios designados S_2 , S_3 e S_4 , aos quais ligam-se as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos das posições P_2 , P_3 e P_4 do inibidor, respectivamente (figura 8); esta parte do inibidor forma uma estrutura em folha- β antiparalela com uma das fitas- β da protease (Creighton, 1992). Os resíduos de aminoácidos nas posições P_1 e P_2 interagem com menor intensidade com a protease; embora pouco se conheça efetivamente sobre a interação entre as proteases e seus substratos naturais, acredita-se que a descrição acima também se aplique a estes casos, visto haver uma elevada similaridade entre os inibidores das proteases e seus substratos naturais (Bode e Huber, 1992).

A base molecular para a especificidade de cada serino-protease com relação ao resíduo de aminoácido na posição P_1 é percebida claramente a partir das estruturas tridimensionais conhecidas destas proteases. A especificidade da tripsina para os resíduos Arg ou Lys na posição P_1 é devida ao fato de seu sub-sítio S_1 ser profundo e conter um resíduo de ácido aspártico (189) no seu interior, o qual neutraliza a carga positiva presente nestes resíduos no pH fisiológico; a quimotripsina por sua vez é específica para resíduos de Phe, Trp ou Tyr, e possui um sub-sítio longo, estreito e hidrofóbico adequado para acomodar as cadeias aromáticas destes resíduos, com o Asp189 substituído pelo pequeno resíduo de serina de maneira a causar menor impedimento estérico; a elastase, embora tenha a porção S_1 similar à da quimotripsina, possui no fundo dela resíduos de Val e Trp, o que somente permite a ligação de substratos que contenham resíduos apolares pequenos na posição P_1 . Vizinho a estes resíduos encontra-se uma serina ou valina, na posição 190, que ajuda a influenciar o grau de seletividade das proteases similares à tripsina frente aos respectivos substratos, sendo elas mais seletivas para peptídios contendo arginina no caso em que o resíduo 190 da protease é uma serina, porém este efeito é reduzido nos casos em que o substrato interage fortemente com as regiões S_2 a S_4 da protease, o que indica a sua importância na seletividade (Sichler et al., 2002).

Ainda que as informações existentes a respeito das interações protease-substrato sejam substanciais, nem sempre é possível reconhecer relações tão claras como as citadas acima. Deste modo, enquanto a substituição do Asp189 por um resíduo de lisina praticamente elimina a atividade catalítica da tripsina com relação a substratos contendo Arg ou Lys, conforme esperado, não foi observado qualquer nível de atividade para substratos contendo Asp ou Glu na posição P_1 .

Quando se substitui o Asp189 por um resíduo de serina, como ocorre na quimotripsina, a atividade catalítica frente a substratos contendo Arg ou Lys é bastante afetada, porém não se detecta um aumento substancial na capacidade de hidrólise de substratos contendo resíduos hidrofóbicos (Rutter, 1992), o que não seria previsível considerando-se que não existem maiores diferenças entre a tripsina assim modificada e a própria quimotripsina na porção S₁ de ambas; mesmo quando todos os resíduos de S₁ da tripsina são substituídos pelos respectivos resíduos da quimotripsina, não é possível observar-se atividade correspondente a esta na tripsina assim modificada.

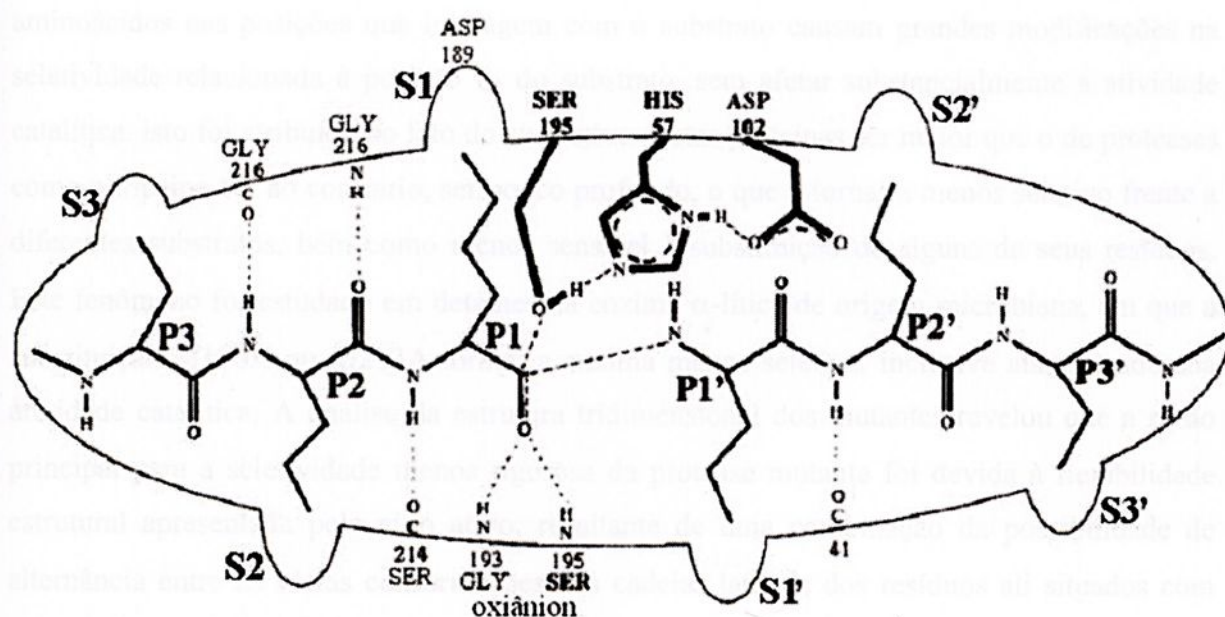


Figura 8: Interações entre o substrato e a serino-protease (--- ligações parciais, ligações de hidrogênio).

Prova de que o processo é bem mais complexo do que aparenta à primeira vista, é o fato de que somente através de mutações em três laços na superfície da tripsina foi possível atingir algum grau de atividade frente a substratos contendo resíduos aromáticos (Rutter et al., 1994); em particular, observou-se também que o resíduo Gly216 deve necessariamente estar presente para que a atividade catalítica seja elevada e para que não se perca a seletividade da protease, sendo que este resíduo, mais afastado do sítio catalítico, somente interage com o resíduo de aminoácido P₃ do substrato. convém notar que o conhecimento da estrutura tridimensional de uma protease isolada pode não ser suficiente para explicar sua seletividade,

conforme se verifica para a trombina, a qual quando complexada com o inibidor BPTI apresenta nítido deslocamento em quatro laços que envolvem o sítio ativo de modo a acomodar o inibidor, o que reforça a idéia que a especificidade destas enzimas deve ser tomada como sendo devida ao conjunto de resíduos de aminoácidos que constituem a estrutura protéica, e não apenas aos poucos aminoácidos que interagem diretamente no local da ligação peptídica que esteja sendo hidrolisada (Locht et al., 1997), havendo indícios de que mesmo moléculas de água ligadas à superfície da proteína podem intervir no mecanismo catalítico por meio de suas interações com o sítio ativo ou com o substrato (Engh et al., 1996).

Foi observado, porem, que no caso de serino-proteases de origem microbiana ou de invertebrados, tenham elas seletividade elevada ou não, a substituição de resíduos de aminoácidos nas posições que interagem com o substrato causam grandes modificações na seletividade relacionada à posição P_1 do substrato, sem afetar substancialmente a atividade catalítica. Isto foi atribuído ao fato do sítio ativo nestas proteínas ser maior que o de proteases como a tripsina ou, ao contrário, ser pouco profundo, o que o tornaria menos seletivo frente a diferentes substratos, bem como menos sensível à substituição de alguns de seus resíduos. Este fenômeno foi estudado em detalhes na enzima α -lítica de origem microbiana, em que a substituição M190A ou M213A tornou a enzima menos seletiva, inclusive aumentando sua atividade catalítica. A análise da estrutura tridimensional dos mutantes revelou que a razão principal para a seletividade menos rigorosa da protease mutante foi devida à flexibilidade estrutural apresentada pelo sítio ativo, resultante de uma combinação da possibilidade de alternância entre as várias conformações das cadeias laterais dos resíduos ali situados com uma maior deformabilidade da própria cadeia peptídica, em particular para os resíduos 216-220 (Agard et al., 1989). Deste modo, assim como para a tripsina, para esta protease a especificidade depende também da porção da cadeia que se liga ao resíduo P_3 do substrato, sendo porem neste caso pouco relevante a função do sub-sítio S_1 . Isto explica como a adição de mutações à proteína nativa não causou danos a sua atividade, pois sua flexibilidade deve ser mais do que suficiente para compensar alterações nas interações envolvendo o resíduo P_1 e o sub-sítio S_1 , o que não pode ocorrer em uma protease como a tripsina, em que tanto as cadeias laterais como a própria cadeia principal desenvolveram, no decorrer da evolução, uma maior rigidez para atingir o objetivo de uma seletividade elevada (Perona e Craik, 1997).

Uma única explicação consolidada para o conjunto destes fenômenos não é evidente a partir dos dados existentes, porem considera-se que as interações entre protease e substrato atuem principalmente emparelhando de modo preciso o substrato com o sítio catalítico. Deste modo, quando as interações entre os resíduos P_1 e S_1 forem significativas, como nos

substratos da tripsina e da quimotripsina, elas tornam-se fundamentais para o adequado emparelhamento do substrato com o sítio ativo no decorrer da reação, sendo que qualquer mudança na estrutura de S_1 causará alterações intensas na seletividade reacional; já para proteases em que S_1 é pequeno e interage fracamente com o substrato, como nas originárias de organismos mais primitivos, as outras interações envolvendo S_2 a S_4 passam a ter maior importância, diminuindo a influência de S_1 na seletividade da protease.

Embora as conclusões acima se baseiem em alguns casos específicos, pode-se em princípio considerar que as enzimas de procariotos e invertebrados, que divergiram anteriormente, tem a capacidade de hidrolisar uma maior diversidade de substratos, com baixa seletividade, enquanto os mamíferos por sua vez desenvolveram um número elevado de serino-proteases, cada qual com alta seletividade, as quais em conjunto conseguem exercer as mesmas funções que o pequeno número de serino-proteases dos organismos mais simples. A razão para este fenômeno pode ser que organismos que divergiram há mais tempo sofreram pressão seletiva para possuírem genomas pequenos, de modo que o processo de duplicação de genes gerando a diversificação genética foi limitado nestas espécies, o que levou à seleção das proteases com estruturas mais flexíveis e capazes de se ligar a diversos tipos de substratos, minimizando assim a necessidade da existência de um grande número destas enzimas nestes organismos. Por sua vez, organismos de evolução mais recente, tendo uma estrutura mais complexa, necessitam de uma maior variedade de proteínas de diversos tipos, cada qual exercendo sua respectiva atividade específica num determinado tecido do organismo (Perona e Craik, 1997).

As proteases de vertebrados, devido à pressão evolutiva no sentido da maior diferenciação e especialização de suas enzimas, seletivamente acumularam um número elevado de mutações em relação à protease ancestral, de modo a perderem sua baixa especificidade original e gerando as serino-proteases atuais altamente específicas. Isto pode explicar o fato de mutações nas seqüências destas proteínas não darem origem em geral a proteases com especificidades alteradas, pois o número de mutações acumuladas é provavelmente tão elevado que cada protease foi otimizada para executar sua função específica, não sendo provável que simples mutações pontuais possam causar uma alteração não-prejudicial à atividade enzimática. É claro que este processo evolutivo, como aqui descrito, não ocorreu exatamente da mesma forma para todas as serino-proteases, e muito menos para outros tipos de enzimas; uma prova disto é, por exemplo, o fato de que a substituição de um único resíduo baste para que a enzima lactato desidrogenase de vertebrados passe a atuar como malato desidrogenase (Holbrook et al., 1988).

II – OBJETIVOS

Neste trabalho pretendeu-se desenvolver uma metodologia para a obtenção de serino-
proteases de venenos de serpentes de *Crotalus durissus terrificus* e *Lachesis muta muta* em
forma pura, usando-se a cromatografia líquida rápida de proteínas (FPLC), seguindo-se de
testes para confirmar a pureza final de cada protease obtida, o que é fundamental para
posteriores tentativas de se efetuar a cristalização.

Uma vez obtida serino-protease em forma pura, procurou-se produzir cristais por meio da metodologia de difusão de vapor, com o intuito de submetê-los ao procedimento de difração de raios X para se determinar a estrutura tridimensional respectiva.

Em paralelo, procurou-se determinar a estrutura da serino-protease catroxase I de *Crotalus atrox*, cuja seqüência já é conhecida, usando-se o procedimento de modelagem molecular tomando-se um conjunto de proteases de estruturas já conhecidas como molde para a obtenção da estrutura do modelo.

III - MATERIAIS

3.1) Amostras protéicas

O veneno de *Lachesis muta muta* (surucucu) foi fornecido pelo Laboratório de Herpetologia e Animais Venenosos da Faculdade de Medicina de Catanduva.

O veneno de *Crotalus durissus terrificus* (cascavel) foi fornecido pelo Laboratório de Herpetologia e Animais Venenosos da Faculdade de Medicina de Catanduva.

O veneno de *Bothrops jararaca* foi adquirido pelo serpentário Uraeus de Cedral/SP.

Todas as amostras foram recebidas na forma liofilizada e armazenadas a 8°C, tendo sido diluídas à medida em que eram usadas, na proporção de cerca de 100 mg para cada 1000µL de tampão tris 25mM e submetidas à centrifugação a 8000xg imediatamente antes de se iniciarem os procedimentos de purificação. O processo de diluição provou ser bem difícil, sendo necessário efetua-lo lentamente para evitar perda de proteína.

3.2) Reagentes

Os tampões ácido bórico pH 9,0, Tris pH 8,6, imidazol pH 7,0, acetato de sódio pH 5,0 e ácido cítrico pH 3,0 foram preparados a partir dos respectivos reagentes obtidos da empresa Sigma-Aldrich.

O NaCl usado no procedimento de cromatografia por troca iônica para eluição com gradiente foi obtido da empresa Carlo Erba.

Usou-se em todos os procedimentos água destilada, filtrada em membrana de nylon Millipore de porosidade 0,45µm.

3.3) Colunas Cromatográficas

As colunas usadas na purificação de proteínas foram adquiridas da Amersham Biosciences, subsidiária da empresa General Electric. Para determinar a melhor condição de purificação para cada proteína, foram efetuados testes em colunas com as seguintes fases estacionárias: resina de troca aniônica Resource MonoQ à base de íon quaternário de amônio, resina de afinidade de sepharose contendo *p*-aminobenzamidina e resina de filtração em gel Sephadex G75. Os procedimentos cromatográficos foram efetuados em um sistema FPLC da Amersham Pharmacia.



IV - MÉTODOS

4.1) Purificação de proteínas

As proteínas podem ser visualizadas e diferenciadas pelos métodos eletroforéticos, que serão descritos posteriormente. Estes métodos podem ser usados para obtenção de pequenas quantidades de polipeptídios, na faixa de até um miligrama, mas para elucidar completamente sua estrutura tridimensional e seu mecanismo de ação são necessárias quantidades substanciais de proteínas purificadas, sendo que a partir desta necessidade foi desenvolvida a técnica de purificação chamada de cromatografia líquida, a qual tem sido amplamente usada na purificação de proteases de venenos de serpentes (Bortoleto-Bugs, 2002, Koh, 2001, Zhang, 1998). Essencialmente, em todos os métodos de cromatografia líquida conhecidos, usa-se uma coluna na qual existe uma fase estacionária, em geral de natureza polimérica, na qual as proteínas ficam separadas devido a suas características básicas e peculiares, como seu ponto isoelétrico e sua afinidade específica por grupamentos químicos, bem como sua massa molecular, e pela coluna passa continuamente uma fase móvel, constituída por um tampão no qual a proteína de interesse seja estável, a qual serve para remover seletivamente da coluna as diversas proteínas da amostra, seletivamente, uma após a outra. A seguir, serão descritos os tipos de separações cromatográficas usadas na purificação de proteínas (Stryer, 1996).

Cromatografia de Troca Iônica: As proteínas podem ser separadas em função de sua carga líquida, no caso da cromatografia de troca iônica. Essa técnica faz uso de uma coluna empacotada com grânulos de uma resina sintética contendo grupos carregados e fixos (figura 9). Estes grupos podem ser aniônicos, os quais se ligam a cátions, sendo as resinas chamadas catiônicas. Ao contrário, existem resinas ditas aniônicas, por possuírem grupos catiônicos, os quais se ligam a ânions. De acordo com o pH do tampão usado e do ponto isoelétrico das proteínas, estas poderão apresentar carga positiva, negativa ou mesmo serem neutras quando introduzidas na coluna. As positivas se ligarão à resina de troca catiônica enquanto que as com carga neutra e negativas passarão pela resina sem se ligarem aos grupos ativos. Ao passar pela coluna um tampão em um dado valor de pH, e contendo NaCl numa concentração de até 0,5M, as macromoléculas ligadas à coluna começarão a sair desta, sendo que proteínas que têm baixa densidade de carga líquida tendem a emergir primeiro, seguidas das que possuem uma maior densidade de carga. Este método de separação cromatográfica é

um dos mais flexíveis, permitindo conseguir um grau de purificação elevado mesmo para as amostras mais difíceis e complexas, bastando para isto ajustar-se adequadamente o pH do tampão usado na eluição, bem como a concentração do sal contido nele, o que a torna adequada como uma etapa de purificação inicial para amostras protéicas brutas, que normalmente não dão bons resultados com outros métodos (Deutscher, 1990). É importante salientar porém que, devido ao fato de algumas proteínas apresentarem uma carga muito elevada no pH em que ocorre a eluição, elas podem ficar retidas definitivamente no interior da coluna, contaminando-a. Em alguns casos, observa-se ainda a ocorrência de desnaturação de algumas das proteínas da amostra, contribuindo também para a contaminação e, quando isto acontece, somente uma lavagem em condições de altas concentrações de NaCl e de extremos de pH podem regenerar a coluna. Deste modo, nem sempre o tampão que consegue efetuar a melhor separação possível das proteínas de interesse é o que garante maior vida útil ao sistema cromatográfico.

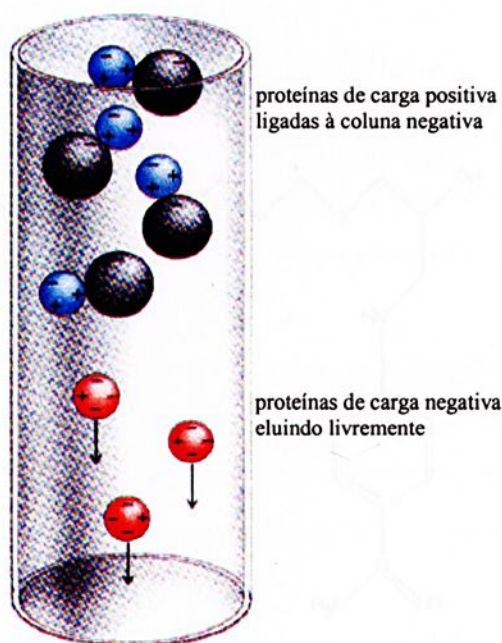


Figura 9: Diagrama de uma coluna de resina de troca catiônica (Resource 15S) com grupos metil-sulfonatos, carregados negativamente. As esferas azuis representam proteínas com alta densidade de carga positiva e que se ligam aos grupos carregados (esferas pretas). As esferas vermelhas representam proteínas com densidade de carga líquida neutra ou negativa no pH do tampão, que passam pelos grupos ativos sem sofrer interações (Stryer, 1996).

Cromatografia por Afinidade: Uma característica notável de muitas proteínas é a sua capacidade de se ligar a grupamentos químicos específicos. Esta propriedade pode ser usada para separar tais proteínas por cromatografia de afinidade. Nesta técnica, uma molécula conhecida como ligante é covalentemente ligada a uma matriz inerte e porosa. É importante que o ligante conserve sua ligação específica pela proteína e que seletivamente a desligue, de maneira que a matriz continue ativa após a eluição. A proteína é então obtida de forma pura quando liberada da matriz cromatográfica, por mudanças das condições de eluição. A eluição é geralmente feita por adição de inibidores ou mudança brusca de pH. Esta técnica pode ser usada vantajosamente na purificação de serino-proteases, pois o sítio ativo das serino-proteases, composto pelos resíduos dos aminoácidos aspartato (102), histidina (57) e serina (195), interage seletivamente com os grupos ativos *p*-aminobenzamidina da resina Benzamidina-Sepharose CL-6B fornecida pela Amersham Biosciences. A figura 10 ilustra a estrutura molecular plana detalhada desse grupo, ligado à resina por uma cadeia linear (espaçador).

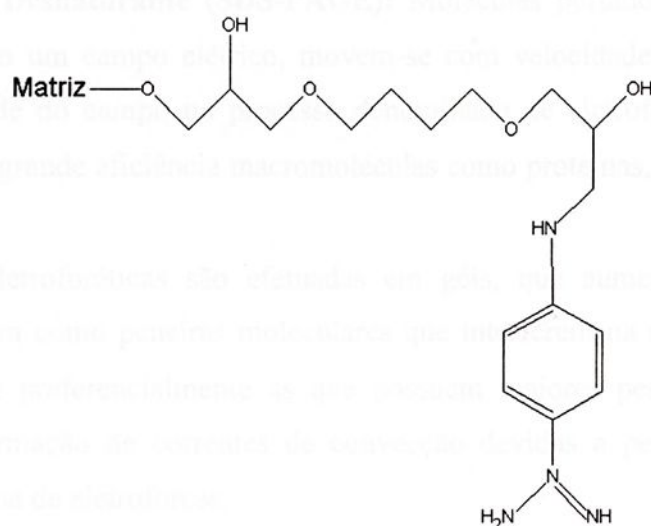


Figura 10: Representação de um grupamento *p*-aminobenzamidina ligado pelo espaçador à matriz de polissacarídeo (Sepharose).

4.2) Caracterização das Proteínas Purificadas

Após o isolamento das serino-proteases de interesse a partir de venenos de serpentes, é necessário certificar-se do seu grau de pureza, e determinar a quantidade efetivamente obtida de proteína; isto é efetuado, respectivamente, pelo uso da técnica da eletroforese desnaturante e descontínua (SDS-PAGE) e quantificação espectroscópica pelo método de Bradford (Deutscher, 1990). Seguindo-se estes procedimentos, é ainda necessário verificar se cada proteína obtida encontra-se em forma homogênea, não formando aglomerados irregulares no meio aquoso; deve-se notar que, quando o objetivo final é a cristalização de proteína para determinação de sua estrutura tridimensional por difração de raios X, um dos principais fatores a influenciar negativamente a tendência da macromolécula a cristalizar é justamente a ocorrência de aglomerados irregulares, e isto pode ser verificado pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) (McPherson, 1999). A seguir serão apresentadas algumas explicações a respeito destes métodos (Deutscher, 1990; Scopes, 1994).

Eletroforese Desnaturante (SDS-PAGE): Moléculas portadoras de carga elétrica, quando colocadas em um campo elétrico, movem-se com velocidade proporcional às suas cargas e à intensidade do campo no processo denominado de eletroforese. Este fenômeno permite separar com grande eficiência macromoléculas como proteínas, ARN e ADN (Hames e Rickwood, 1990).

Separações eletroforéticas são efetuadas em géis, que aumentam a eficiência da separação por atuarem como peneiras moleculares que interferem na mobilidade iônica das proteínas ao reterem preferencialmente as que possuem maiores pesos moleculares, bem como evitando a formação de correntes de convecção devidas a pequenos gradientes de temperatura no sistema de eletroforese.

Devido ao efeito de peneiramento dos géis, tais como o de poliacrilamida, a migração das macromoléculas carregadas através do gel de eletroforese depende não somente das cargas da macromolécula como também de suas massas e do seu formato. No entanto, determinou-se que, quando as proteínas sofrem desnaturação, assumindo assim uma forma totalmente aleatória, a migração eletroforética passa a depender somente de suas cargas e massa molecular. Deste modo, tradicionalmente efetua-se o procedimento eletroforético em condições desnaturantes, adicionando-se o detergente SDS à mistura de proteínas que se deseja analisar. O SDS, sendo uma molécula negativamente carregada, ao ligar-se à proteína, dá ao complexo assim formado uma grande carga negativa, ao mesmo tempo em que causa

sua desnaturação. Como as cargas negativas dos complexos formados com as proteínas das amostras são muito maiores que as cargas das proteínas isoladas, este fator passa a ter pouca importância na separação eletroforética, fazendo com que a separação passe a depender basicamente da massa de cada proteína. Deste modo, como resultado deste procedimento temos a distribuição das proteínas ao longo do gel na relação direta de suas massas moleculares e, se for efetuada em paralelo a separação de uma amostra de proteínas de peso molecular conhecido, será possível determinar diretamente a massa molecular das proteínas da amostra desconhecida, o que é importante para termos uma idéia preliminar da possível composição desta amostra.

A determinação da composição de uma amostra protéica, que normalmente é de grande importância em qualquer tipo de estudo na área de bioquímica de proteínas, torna-se simplesmente imprescindível no caso específico da cristalografia de proteínas, devido ao fato bem conhecido de ser bastante difícil efetuar a cristalização de amostras de proteínas que não estejam puras (Ducruix, 1992).

Espectroscopia: Diversos métodos foram desenvolvidos para a determinação quantitativa de proteínas. Dentre estes métodos, os que se baseiam em espectrofotometria tem se mostrado serem os mais sensíveis e menos demorados, podendo ser executados com o uso de mínimas quantidades de amostra, evitando assim a perda excessiva de proteínas.

O método de Bradford baseia-se na interação de um corante, o azul brilhante G-250, portador de cargas negativas, com os aminoácidos positivamente carregados das proteínas. Este corante tem cor avermelhada e, quando em contato com a carga positiva das proteínas, muda sua cor para o azul, sendo esta alteração proporcional à concentração de proteínas na amostra. Como a variação de cor é praticamente idêntica para diversas proteínas, sendo este procedimento altamente reprodutível, e como o corante não é afetado por outros tipos de macromoléculas biológicas, este método é considerado como um dos mais gerais na determinação quantitativa de proteínas (Deutscher, 1990).

O conhecimento da concentração de proteína na amostra, após ter sido determinado o seu grau de pureza por meio da eletroforese, é de fundamental importância devido ao fato de ser pouco provável conseguir a cristalização de amostras protéicas altamente diluídas, podendo mesmo ser necessário repetir a etapa de purificação caso seja verificado que se dispõe de quantidades muito pequenas de proteína para a etapa de cristalização (McRee, 1999).

Espalhamento Dinâmico de Luz: Ainda que se comprove por eletroforese estar a proteína de interesse em uma forma quimicamente pura, pode ocorrer que no pH e na concentração em que ela se encontra depois de purificada formem-se aglomerados contendo diversas macromoléculas, o que torna a amostra inadequada para fins de cristalização e, portanto, passa a ser necessário o uso de um método que permita verificar se este fenômeno está se manifestando. Um dos métodos disponíveis para determinar rapidamente a ocorrência de formação de aglomerados protéicos é o espalhamento dinâmico de luz (DLS), mediante o qual pode-se medir o diâmetro das macromoléculas existentes no meio; idealmente um gráfico de DLS deveria apresentar um único pico bem definido, o que indicaria a presença no meio de apenas uma forma da macromolécula, porém o mais usual é a presença de picos largos, os quais podem ser tanto devidos às proteínas formando distintos aglomerados com um número variado de componentes, o que é prejudicial à formação de cristais, como à existência de núcleos de cristalização no meio.

Macromoléculas em solução apresentam movimento browniano, dependente da viscosidade do meio, causado pelo choque contínuo das moléculas do solvente contra as macromoléculas protéicas; este movimento, somado ao efeito de espalhamento da luz em todas as direções pelas macromoléculas, causa a existência de uma permanente flutuação da polarização do meio com a conseqüente variação na intensidade da luz espalhada com o tempo. Deve-se notar que esta flutuação é bastante rápida, somente sendo detectada com aparelhos dotados de sensores de alta velocidade de resposta (Bortoleto-Bugs, 2001).

Uma idéia resumida do processo físico envolvido pode ser vista na figura 11, em que $\mathbf{k}_i$ é um vetor correspondente a um feixe de luz proveniente de uma fonte do tipo *laser*, $\mathbf{k}_r$ é o vetor correspondente à luz espalhada, e O e P são as posições inicial e final de uma partícula que se move continuamente no meio líquido; considerando-se que o detector que recebe o feixe de luz espalhado encontra-se a uma distância bem grande da amostra, ao menos quando comparado com o tamanho da própria amostra, pode-se considerar o campo elétrico da radiação espalhada como formando uma esfera, e o campo elétrico total medido pelo detector seria em princípio a soma de cada onda correspondente a cada partícula da amostra, o qual poderia em princípio ser considerado como constante se o ângulo entre fonte do *laser*, amostra, e detector for fixo. Porém, embora a amplitude das ondas detectadas seja praticamente insensível à posição das partículas, o mesmo não é verdade para as fases respectivas, que podem sofrer alterações com o deslocamento das partículas por distâncias tão pequenas quanto o comprimento de onda da luz usada. É esta variação na fase das ondas espalhadas, causada pelo deslocamento das partículas devido ao movimento browniano, a

razão das variações na intensidade da radiação medida pelo detector durante a realização do experimento.

Do ponto de vista operacional, a técnica de DLS, basicamente consiste em incidir uma luz de comprimento de onda definido em uma amostra contendo a macromolécula de interesse, medindo a intensidade da luz espalhada, em um dado ângulo em relação à luz incidente, ao longo de diversos instantes separados entre si por um intervalo de tempo τ .

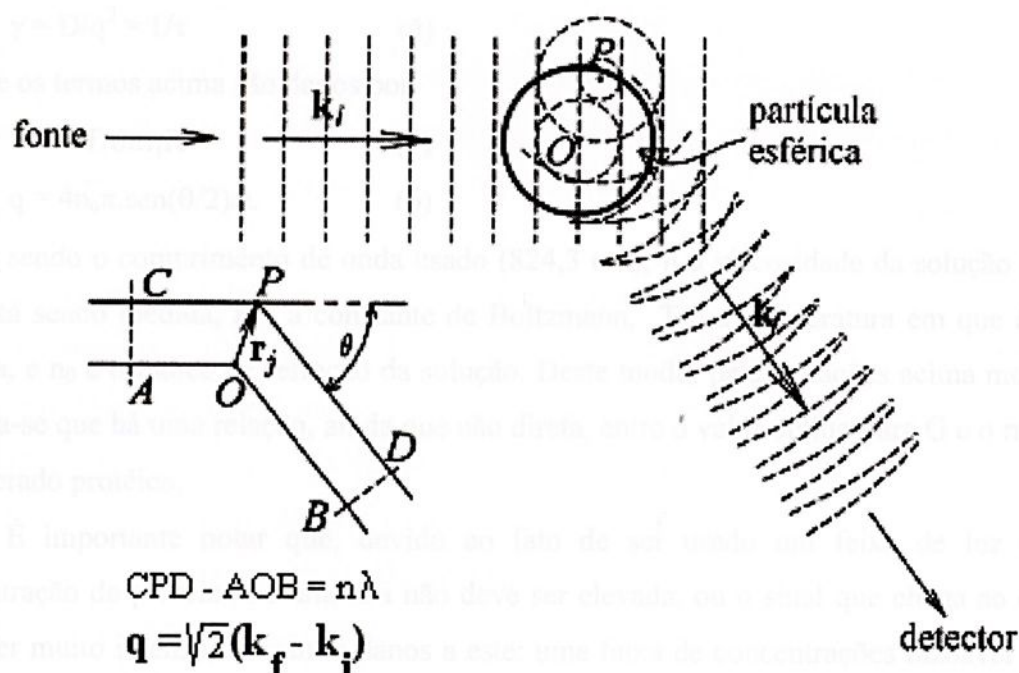


Figura 11: Diagrama esquemático do processo físico de DLS. O sinal espalhado depende, dentre outros fatores, do ângulo de observação θ , o qual no caso do instrumento Dynapro 801 é fixo no valor de 90° (k_f , k_i : vetores correspondentes à onda eletromagnética).

A seguir, calcula-se uma função que correlaciona estas medidas, dada por

$$G = \int I(t).I(t + \tau).dt \quad (1)$$

Na prática não é possível medir um conjunto contínuo de dados, mas somente um número discreto destes e, portanto, a equação acima é reescrita como

$$G = \sum I(t).I(t + \tau).\tau \quad (2)$$

Ou seja, são feitas medidas nos instantes $0, \tau, 2\tau, \dots, n\tau$ segundos e a seguir calcula-se a função de correlação acima; deve-se notar que o valor de τ deve ser bem menor que o tempo necessário para ocorrer a flutuação na intensidade do sinal que chega ao detector, ou não será possível obter um conjunto suficientemente grande de dados; este valor é da ordem de

grandeza do microssegundo. A função então é normalizada de modo a obter-se o valor 1 para $G_{n \rightarrow \infty}$. O valor da função G está relacionado a uma função de decaimento do tipo exponencial, da forma

$$G = 1 + e^{-\gamma t} \quad (3)$$

O termo γ por sua vez relaciona-se com a movimentação aleatória das macromoléculas através do coeficiente de difusão D dos aglomerados protéicos em solução e do vetor de espalhamento de luz q

$$\gamma = D/q^2 = 1/\tau \quad (4)$$

em que os termos acima são dados por

$$D = kT/6\pi\eta R \quad (5)$$

e
$$q = 4n_0\pi.\text{sen}(\theta/2)/\lambda \quad (6)$$

com λ sendo o comprimento de onda usado (824,3 nm), η a viscosidade da solução protéica que está sendo medida, k é a constante de Boltzmann, T é a temperatura em que é feita a medida, e n_0 é o índice de refração da solução. Deste modo, pelas relações acima mostradas, verifica-se que há uma relação, ainda que não direta, entre o valor obtido para G e o raio R do aglomerado protéico.

É importante notar que, devido ao fato de ser usado um feixe de luz laser, a concentração de proteína na amostra não deve ser elevada, ou o sinal que chega ao detector pode ser muito intenso, causando danos a este; uma faixa de concentrações razoável situa-se entre 1 e 5 mg/mL.

Determinações da Atividade Bioquímica das Serino-Proteases: define-se a atividade de uma enzima qualquer como a proporção de uma dada reação que uma quantidade certa da enzima deveria catalisar em um intervalo de tempo específico; esta atividade é determinada medindo-se a quantia de produto formado ou de substrato consumido por unidade de tempo, em condições tais que o substrato encontre-se numa concentração bem elevada, de modo a que cause a total saturação da enzima.

O padrão aceito para a atividade enzimática é a unidade internacional (UI), sendo que 1 UI é definido como sendo a quantidade de enzima necessária para produzir um micromol (μmol) de produto (ou decompor um micromol do substrato) por minuto em condições especificadas de pH, temperatura, e concentração inicial do substrato. Esta padronização permitiu efetuar comparações entre os diversos tipos de enzimas, de mesmas famílias ou de famílias distintas.

Idealmente, a atividade deve ser medida logo no início da reação, quando ainda não se encontra no meio qualquer traço de produtos reacionais; nestas condições, pode-se considerar que a reação está se realizando na sua máxima velocidade. A atividade de uma enzima que siga o mecanismo clássico de Michaelis-Menten, assim determinada, deveria ser exatamente proporcional à concentração da enzima no meio reacional, e se isto não for observado pode indicar que o mecanismo é mais complexo que o usual ou que as condições experimentais não foram adequadamente controladas. Em particular, toda enzima deve ser testada nas condições de pH e temperatura ótimas para ela; como estas condições não são conhecidas em geral, nem podem ser previstas em princípio, na prática devem-se fazer ensaios em diversas condições de temperatura e pH; isto porem é desnecessário quando está sendo testada uma enzima que pertença a uma família de proteínas já bem conhecida, as quais se saiba possuírem um comportamento reacional bem similar entre si.

No caso particular em que já se possui informações sobre a cinética enzimática de proteínas similares à que estiver sendo testada, pode-se prever aproximadamente um valor para a sua constante de Michaelis (K_M); deste modo, pode-se tentar em princípio efetuar a reação enzimática usando-se o substrato numa concentração superior a cerca de cem vezes o valor do K_M previsto, de modo a garantir que este esteja numa condição em que consiga saturar a enzima durante todo o período em que se estiver acompanhando a reação, o que garantirá que a medida do produto formado (ou do substrato consumido) seja linear neste período; a atividade da enzima é então determinada simplesmente como o ângulo da reta de ajuste obtida em um gráfico de concentração (de produto ou de substrato) versus o tempo de reação (Robyt e White, 1987, Fersht, 1999).

Em geral é preferível efetuar várias medidas no decorrer da reação, porem se a quantidade de enzima disponível for escassa, diminui-se proporcionalmente o número de medidas; porem, deve-se lembrar que, como a concentração do substrato pode decrescer rapidamente devido à elevada atividade da enzima, e também como o produto formado tende a estimular a enzima a catalisar a reação no sentido oposto, após algum tempo a relação entre a concentração e o tempo decorrido deixa de ser linear, o que significa que se poucas medidas forem efetuadas, pode-se incorrer no risco de não haver número suficiente delas na região do gráfico em que esta relação é linear, a qual é a única em que se pode ter certeza de levar a determinações de atividade confiáveis.

Existem vários modos de se medir a proporção de substrato consumido ou de produto formado, os quais podem envolver a retirada de uma alíquota em intervalos de tempo definidos para efetuar sua análise química, ou a reação pode ser efetuada no próprio aparelho



em que é feita a análise da substância que esteja reagindo ou sendo formada (análise *in situ*). Independentemente do sistema usado, a maioria das análises efetuadas envolvem métodos espectroscópicos, químicos ou eletroquímicos. Como exemplo do primeiro temos a medida da decomposição do substrato BApNA pela ação de serino-proteases, em que se acompanha a reação por meio de medidas de absorbância, a intervalos regulares de tempo, em $\lambda = 405\text{nm}$ (Erlanger et al., 1961). Embora possam envolver um certo risco, em alguns casos usam-se substratos radioativos, e mede-se a taxa de variação na radiação emitida pelo produto após este ser isolado da amostra.

Nem sempre é possível obter um produto facilmente mensurável, ou partir de um substrato que possua propriedades adequadas para o acompanhamento da reação; numa situação assim, adota-se a metodologia alternativa de ensaios enzimáticos acoplados, em que se adiciona uma segunda enzima, de cinética bem conhecida, ao meio reacional, de modo que o produto da reação sendo estudada seja convertido pela segunda enzima em outra substância que possa ser mais facilmente quantificada. Para que este método funcione adequadamente, a segunda enzima deverá ser adicionada em uma concentração elevada a ponto de não afetar a cinética em estudo, o que pode ser complicado considerando-se que as determinações devem sempre ser feitas no pH e temperatura ótimos para a enzima de interesse, que podem ser bem distintos dos da segunda enzima sendo adicionada.

Com relação ao estudo de proteases de venenos de serpentes, algumas considerações específicas devem ser feitas, devido à complexa composição dos venenos de onde elas são extraídas, e ao fato de sua atividade no meio fisiológico poder ser em alguns casos bem variada. Em primeiro lugar, as ações das proteases *in vivo* e *in vitro* não necessariamente são as mesmas, havendo casos de proteases com atividade pró-coagulante *in vitro* que, dependendo da dose administrada em animais de teste, causa hemorragias; além disso, nos venenos existem diversas proteínas atuando em conjunto, cujo resultado final pode ser bastante distinto do obtido pelo uso de uma única protease isolada em laboratório, podendo ainda ocorrer que uma dada enzima exerça dois ou mais efeitos distintos sobre os diversos fatores agindo no processo hemostático, o que dificilmente poderia ser reproduzido *in vitro*. convém lembrar também que o processo de coagulação, ocorrendo em várias etapas, não pode ser efetivamente simulado em laboratório onde normalmente só uma dada reação enzimática é estudada isoladamente, de modo que os resultados obtidos num dado experimento representam apenas um indício do que esteja realmente ocorrendo no meio fisiológico. O fato de que a atividade das proteases de venenos dependerem das concentrações das várias substâncias existentes no veneno, as quais variam de espécie para espécie, e até entre

indivíduos de uma mesma espécie, torna ainda mais difícil a análise de resultados de medidas de atividade enzimática de serino-proteases de venenos. Levando-se estes pontos em consideração, é evidente que a composição de um dado veneno é consequência de um metabolismo altamente específico, o que, aliado ao fato de que a quantidade de veneno que pode ser obtida de cada indivíduo estar na faixa de 0,1mL ou até menos para diversas espécies de serpentes, tem levado as empresas que atuam nesta área a somente venderem produtos obtidos a partir da mistura de frações obtidas de diversos espécimes e misturadas entre si, de modo a tentar-se sempre obter um produto final com características médias relativamente constantes (Harvey, 1991).

Tendo em vista que as amostras das quais obtivemos as frações de serino-proteases acima citadas foram também obtidas de modo similar, a partir da mistura de venenos de várias serpentes, podemos em princípio considerar que os testes de atividade enzimática por nós realizados são razoavelmente representativos da atividade média da protease no veneno, ainda que se considerem as ressalvas citadas.

No presente estudo, foram usados como substratos para as serino-proteases a $N\alpha$ -benzoyl-D,L-arginina-*p*-nitroanilida (BApNA) e o éster metílico da $N\alpha$ -toluenosulfonyl-arginina (TAME), cujas fórmulas estruturais são mostradas a seguir.

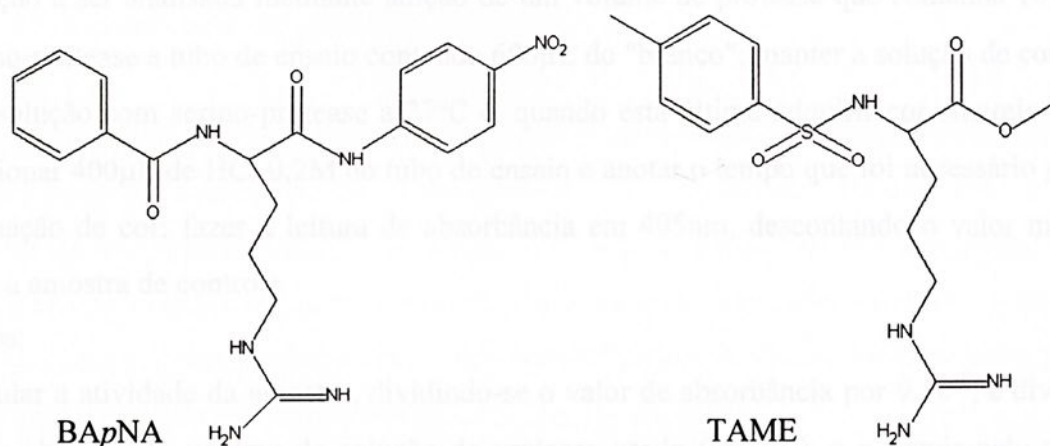


Figura 12: Substratos sintéticos para a determinação da atividade enzimática de serino-proteases.

Os procedimentos experimentais correspondentes às determinações bioquímicas citadas são descritos abaixo.

Determinação de Atividade Coagulante

Adicionar um volume de solução tal que contenha 1 μL de serino-protease a um tubo de ensaio, mantido a 37°C, contendo 200 μL de plasma bovino centrifugado a 4000 $\times g$ com 0,2% Ca^{2+} , e adicionar tampão PBS em volume suficiente para completar 250 μL ; imediatamente a seguir, contar o tempo necessário para se formar a rede inicial de fibrina, após a qual ocorre a rápida coagulação final do plasma.

Repetir para volumes contendo 2, 4 e 8 μL de protease contida; na prática, verifica-se que o tempo para formação do coágulo inicial tende para um valor final constante com o aumento da quantidade total de protease no tubo; anota-se então este tempo (Alvarado *et al.*, 1988).

Determinação da Atividade Esterásica com BApNA

reagentes:

solução A: TRIS/HCl 50mM a pH 7,2

solução B: BApNA 9,0M em DMSO, mantido a 4°C

procedimento:

preparar uma solução de "branco" pela adição de 10 μL de B a 10mL de A; preparar uma solução de controle pela adição de 600 μL do "branco" a um tubo de ensaio; preparar a solução a ser analisada mediante adição de um volume de protease que contenha 10 μg da serino-protease a tubo de ensaio contendo 600 μL do "branco"; manter a solução de controle e a solução com serino-protease a 37°C e, quando esta última adquirir cor amarelo-claro, adicionar 400 μL de HCl 0,2M ao tubo de ensaio e anotar o tempo que foi necessário para a formação de cor; fazer a leitura de absorbância em 405nm, descontando o valor medido para a amostra de controle

cálculos:

calcular a atividade da amostra, dividindo-se o valor de absorbância por $9 \cdot 10^{-6}$, e dividir o valor obtido pelo volume de solução de protease usado (em μL), e a seguir pelo tempo necessário para o surgimento da cor amarela (em minutos); dividindo-se por fim o resultado acima pela concentração da protease na solução original, obtem-se o valor da atividade enzimática em Unidades Internacionais (Erlanger *et al.*, 1961).



Determinação da Atividade Esterásica com TAME

reagentes:

solução A: TAME 0,1M e KCl 0,15M em água deionizada

solução B: KOH 0,1M em água deionizada, com concentração exatamente conhecida mediante prévia titulação ácido-base

procedimento:

adicionar em béquer 7,0mL de solução A; adicionar lentamente solução B, acompanhando com medidor de pH até atingir um valor de pH o mais próximo possível de 8,0; adicionar um volume de solução tal que contenha 10 μ g de protease; adicionar cerca de 5 μ L da solução B, esperar o pH subir até um máximo e, a seguir, anotar o tempo necessário para o pH voltar a abaixar; repetir esta última etapa até que o tempo total medido atinja 10 minutos, usando-se sempre o mesmo volume de solução B em todas as repetições

cálculos:

fazer a média dos tempos em cada adição da solução B ao béquer; dividir a quantidade de KOH usado em cada adição (em mmol) pelo tempo médio (em minutos), e multiplicar o valor assim obtido por 100 para obter o valor final de atividade enzimática em Unidades Internacionais (Silverstein, 1975).

4.3) Cristalização de proteínas

A cristalização de proteínas, que inicialmente serviu para demonstrar a pureza de uma amostra protéica, tornou-se um procedimento de importância fundamental para a determinação de estruturas macromoleculares. Em paralelo a isto, ocorreu uma evolução nos métodos de cristalização, partindo-se dos métodos totalmente empíricos baseados em tentativa e erro para os modernos procedimentos mais racionalizados, fundamentados em bases físicas mais sólidas desenvolvidas recentemente.

A cristalização é um processo físico bem compreendido atualmente, não só devido aos diversos estudos efetuados com pequenas moléculas orgânicas, como com macromoléculas (MacPherson, 1999), e constitui-se basicamente de duas etapas, a nucleação e o posterior crescimento dos cristais. Na etapa de cristalização é necessário que as moléculas em solução se agrupem de forma organizada, o que, além de envolver uma energia de ativação, é um processo físico estatisticamente pouco provável, sendo necessário, portanto que a solução possua um grau elevado de supersaturação para que ocorra. Os núcleos de cristalização assim formados são termodinamicamente instáveis e, somente após um número suficientemente



grande de moléculas se agrupar, a barreira correspondente à energia de ativação de cristalização é ultrapassada e o núcleo formado passa a ser estável; somente alguns dentre os núcleos que se formam em solução atingem o tamanho mínimo necessário para que se tornem estáveis, e os que não o conseguem acabam por se dissolver novamente na solução, o que confirma a necessidade de uma supersaturação elevada para se conseguir a efetiva cristalização da substância, seja ela uma molécula pequena ou macromolécula.

Uma vez atingido o tamanho mínimo em que o núcleo passa a ser estável, ainda microscópico, mais moléculas saem da solução e se depositam sobre a sua superfície, causando assim o crescimento do cristal até atingir dimensões que, no caso de macromoléculas protéicas, em geral são da ordem de 0,1-0,5mm. Um problema nesta etapa consiste no fato de que, pelo menos no caso de macromoléculas, o crescimento do núcleo pode não ser uniforme, com as macromoléculas se agregando de uma forma não-estruturada, o que leva não à formação de cristais, mas de precipitados, o que é bastante comum, bem como de óleos ou géis. Isto é particularmente comum no caso de procedimentos em que a cristalização ocorre rapidamente, demonstrando a necessidade de controlar da melhor maneira possível a velocidade do processo.

Invariavelmente verifica-se que cristais de macromoléculas são menores, em geral, que os de moléculas orgânicas pequenas, mesmo nos melhores casos. Uma explicação definitiva para isto não foi estabelecida, porém há indícios de que, durante o crescimento do cristal, impurezas vão se depositando sobre suas faces, gerando defeitos na sua estrutura; foi proposto que, quando o número de moléculas de impurezas no cristal torna-se elevado, conforme o cristal vai crescendo, o número de defeitos na estrutura cristalina fica tão alto a ponto de prevenir a continuação do processo de crescimento. Isto é coerente com a observação que os cristais maiores e os mais bem formados são os obtidos a partir de soluções protéicas submetidas aos mais cuidadosos procedimentos de purificação (McPherson, 1999).

Ainda que o procedimento de cristalização seja fisicamente bem entendido, convém citar que, devido ao grande número de variáveis envolvidas, não é possível prever rigorosamente, em princípio, se uma dada macromolécula cristalizará, nem em que condição. Dentre as variáveis envolvidas, pode-se citar o nível de homogeneidade da amostra protéica, seu grau de agregação, sua estabilidade em solução, a sua concentração bem como a de reagentes precipitantes adicionados à solução macromolecular, o pH da solução, e a concentração de reagentes adicionados para controlar a velocidade da formação dos cristais. Todas estas variáveis podem influenciar tanto a etapa de nucleação como a de crescimento, e é necessário um equilíbrio delicado entre elas para se conseguir ao final cristais de boa

qualidade, que possuam a propriedade de difratar raios X (Bergfors, 1999). Como a tendência a formação de cristais é maior quando o processo ocorre lentamente, e sendo duas das principais variáveis envolvidas na velocidade de cristalização a concentração da proteína e a do precipitante usado, deve-se procurar exercer o maior controle possível sobre estas; observando-se um diagrama de fases da solubilidade de proteínas em presença de precipitante, pode-se em princípio considerar como mais favorável para cristalização a região de nucleação, e portanto, deve-se em princípio agir de modo a garantir que ao se iniciar a cristalização a concentração de proteína e de precipitante esteja nesta faixa do diagrama de fases (Figura 13).

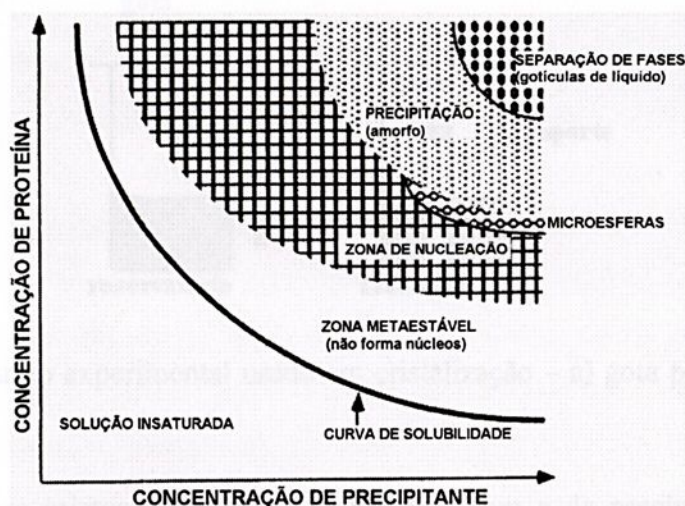


Figura 13: Diagrama de fases esquemático apresentando a solubilidade da proteína em função da concentração de precipitante.

As amostras protéicas a serem cristalizadas normalmente não se encontram em estado supersaturado, ou então correriam o permanente risco de precipitarem espontaneamente; para que possam cristalizar, portanto, é necessário fazer com que atinjam um estado supersaturado, o que normalmente é conseguido pela adição de um precipitante à solução contendo proteína, com ou sem simultânea evaporação lenta da água contida na amostra, sendo que neste caso são mais comuns os métodos ditos de difusão de vapor com gota pendente (“hanging drop”) ou com gota sentada (“sitting drop”). Métodos que não fazem uso da evaporação da água da amostra são menos usados, e consistem, dentre outros, na técnica de diálise e na de cristalização em batelada (“batch”).

O método de cristalização denominado de gota pendente é um dos mais usados, consistindo simplesmente na adição, a um gota de amostra protéica, com um volume de até

20 μ L, de um volume idêntico de solução contendo um reagente precipitante; a mistura assim obtida é depositada sobre uma lamínula de vidro, e esta é por sua vez colocada sobre um recipiente contendo um volume de 0,6 a 1,0mL da solução de precipitante (Figura 14). Entre a lamínula e as paredes do reservatório existe uma fina camada de silicone, o que garante total vedação ao sistema e, como neste método a concentração de precipitante na gota é menor que no reservatório, a água evapora da gota lentamente, difundindo em direção à solução no reservatório, de modo que atinge-se um ponto em que a proteína na gota torna-se supersaturada e inicia-se a nucleação.

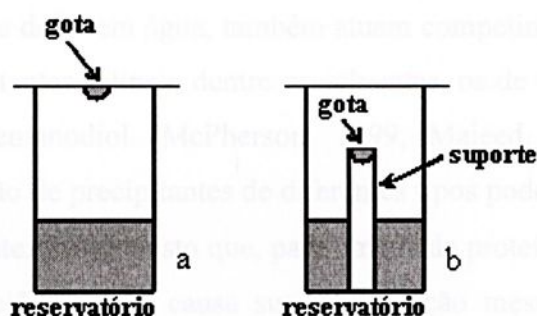


Figura 14: Aparato experimental usado em cristalização – a) gota pendente e b) gota sentada

Idealmente, ao se misturar a solução de proteína com a de precipitante, a gota de mistura resultante deveria ter concentrações tais que se situasse na região de nucleação do diagrama de fases, porém como na prática não há como prever como se comporta a solubilidade de uma dada proteína frente a um determinado precipitante, a única maneira de se efetuar o procedimento de cristalização por gota sentada é testando-se a solução protéica com diversos tipos de precipitantes, em várias concentrações, esperando com isso encontrar ao menos uma condição em que se forme cristais da proteína. Experimentalmente, verificou-se que algumas substâncias químicas são particularmente favoráveis à formação de cristais protéicos, e normalmente estas são as primeiras a serem testadas assim que se inicia um procedimento de cristalização, de modo a aumentar a probabilidade de obtenção de cristais; dentre estas substâncias, destacam-se polímeros, sais orgânicos ou inorgânicos, e solventes. Dentre os polímeros, pode-se citar como mais usados o polietilenoglicol (PEG), principalmente os de massas moleculares entre 2 e 10kDa, e os respectivos éteres monometílicos (PEG-MME); estes precipitantes agem principalmente por efeito de exclusão de volume, pois devido ao grande tamanho de suas cadeias, eles ocupam espaço no solvente que torna-se assim indisponível para a proteína, diminuindo assim sua solubilidade e

favorecendo a formação de cristais. Os sais, dentre os quais os mais usados são sulfatos, fosfatos e citratos, todos com grande afinidade pela água, agem por sua vez dissolvendo-se preferencialmente na solução aquosa, diminuindo assim o grau de interação entre as moléculas de água e de proteína; este processo, denominado de “salting-out”, foi muito usado no passado para obter proteínas parcialmente purificadas, porém pelo uso de sais cuidadosamente escolhidos, em concentrações adequadas, é possível favorecer a formação de cristais protéicos bem formados. Quanto aos solventes orgânicos, seu principal modo de ação envolve o abaixamento da constante dielétrica da água, causando assim um aumento das interações entre as proteínas, que normalmente apresentam cargas em sua superfície, porém devido à elevada solubilidade deles em água, também atuam competindo com a proteína pela água, assim como os precipitantes salinos; dentre os solventes, os de uso mais comum são o 2-propanol e o 2,4-metilpentanodiol (McPherson, 1999, Majeed, 2003). Recentemente verificou-se que a combinação de precipitantes de diferentes tipos pode ser mais eficiente que o uso de um único precipitante; foi proposto que, para uma dada proteína, quando se combina um precipitante de alta eficiência, que causa sua precipitação mesmo quando em baixas quantidades, com outro precipitante de baixa eficiência, este último pode diminuir a ação do precipitante mais eficiente, moderando assim sua ação e eventualmente garantindo a obtenção de cristais mais bem formados (Huang *et al.*, 1999).

Como pode-se verificar, o número de precipitantes disponíveis é razoavelmente elevado e, considerando-se que, para cada distinta proteína há necessariamente uma diferente concentração de precipitante que poderá causar sua cristalização, além de ser normalmente necessário testar também vários valores de pH, o número total de experimentos que deveriam ser realizados torna-se proibitivamente alto, exigindo um dispêndio de tempo e de amostra protéica simplesmente impraticável. Deste modo, para poder tornar o procedimento de cristalização realizável, adotam-se métodos que reduzem o número total de experimentos necessários ao mesmo tempo que tentam obter o máximo de informação a respeito da solubilidade da proteína sendo estudada. Dentre estes métodos, pode-se citar os de matriz esparsa, “screen” randômico, “grid screen” e “footprint screen” (Bergfors, 1999, Rupp, 2003). Dentre estes métodos, o mais usado é o de matriz esparsa, que se baseia em testar a cristalização da proteína de interesse com um número definido de soluções precipitantes, que são escolhidas com base em dados da literatura de proteínas que foram previamente cristalizadas com sucesso (Jancarik e Kin, 1991); deste modo, este procedimento tem uma base estatística fraca, pois não é realmente aleatório, deixando de lado várias condições de cristalização que poderiam viar a produzir cristais adequados para difração; neste método, se

nenhuma condição testada resultar em cristalização, pouca informação será obtida, diminuindo assim a possibilidade de tentar-se realizar modificações posteriores no procedimento de cristalização. A maior vantagem deste método é sua praticidade, visto existirem no mercado prontamente disponíveis vários conjuntos de reagentes com alto grau de pureza, contendo todas as combinações de precipitantes necessárias para efetuar o teste completo de matriz esparsa sem necessitar a preparação destas soluções, o que demanda muito tempo. O “screen” randômico, que procura testar várias condições de cristalização de maneira verdadeiramente aleatória, e o “footprint screen”, que testa apenas alguns precipitantes, mas em diversas concentrações, são mais adequados do ponto de vista estatístico, e fornecem mais informações para a posterior etapa de otimização da cristalização, etapa esta usualmente necessária, visto que os cristais obtidos por meio destes métodos em geral demonstram não serem adequados para o procedimento de difração de raios X. O método de “grid screen”, por sua vez, testa apenas um determinado precipitante, variando sua concentração e seu pH, e em geral é mais útil na etapa de otimização da condição de cristalização, em que já se conhece uma condição de concentração de um dado precipitante e um dado pH em que se forma cristais, e deseja-se determinar qual a condição ótima para se obter os melhores cristais possíveis. Deve-se considerar, porém, que a forma dos cristais obtidos, embora sejam uma boa indicação da qualidade de um cristal, não são uma prova definitiva disto, visto serem conhecidos casos de cristais bem formados que difratam pobremente raios X (Bergfors, 1999).

A etapa de otimização da formação de cristal protéico pode ser bastante elaborada, pois, além da necessidade de testar-se várias concentrações de precipitante e distintos valores de pH, pode-se ainda tentar adicionar à solução precipitante outros reagentes, denominados modificantes, com o objetivo de se obter um ajuste mais preciso do processo; dentre estes modificantes destacam-se sais de cátions divalentes (CaCl_2 , CoCl_2 , NiCl_2), ácidos policarboxílicos (tartarato, malonato), e solventes orgânicos tais como dioxano e DMSO. O modo de ação destes modificantes é bem menos conhecido, tendo sido proposto que ácidos policarboxílicos atuam unindo entre si as moléculas de proteína favorecendo assim a formação de cristais, e que solventes como o dioxano podem perturbar o processo de cristalização, tornando-o mais lento e permitindo assim a formação de cristais com estrutura interna mais regular (McPherson, 1999). Outros métodos incluem o uso de glicerol em concentrações elevadas, ou cristalização em gel de agarose, ambos os quais agem aumentando a viscosidade do meio, de modo a retardar a cristalização (Ducruix e Giegé, 1992).

4.4) Modelagem Molecular para Determinação de Estruturas

Os métodos mais conhecidos e usados para determinação detalhada da estrutura tridimensional de macromoléculas em geral são a cristalografia de raios X e a espectrometria de ressonância magnética nuclear bidimensional (2D-NMR). No entanto, embora estes métodos tenham se mostrado confiáveis após vários anos de uso, sua aplicação é reconhecidamente difícil, sendo que a taxa de novas seqüências protéicas sendo determinadas por sequenciamento dos respectivos c-DNAs é atualmente bem mais elevada que a de determinação de estruturas tridimensionais protéicas por ambos os métodos citados, problema este que foi ainda mais agravado pelo aumento praticamente extraordinário no número de seqüências genéticas que tem sido mapeadas, inclusive o genoma humano que já é essencialmente conhecido por inteiro.

Mesmo havendo em princípio a possibilidade de se conhecer a seqüência de cada uma das proteínas expressas num organismo desde que seja conhecido todo o seu genoma, e sabendo-se quais as partes dele que efetivamente expressam proteínas (os exons), e ainda que seja possível ter uma idéia razoável a respeito da atividade fisiológica de uma dada proteína somente conhecendo-se sua seqüência, uma relação clara e detalhada entre a proteína e o modo como ela exerce sua atividade somente é possível conhecendo-se a sua estrutura tridimensional.

As dificuldades em se obter estruturas protéicas envolvem desde a baixa probabilidade (às vezes mesmo a impossibilidade) de se obter cristais de proteína que tenham a mínima qualidade para se conseguir um padrão de difração aceitável até o fato de que em RMN a resolução e a intensidade dos sinais obtidos são tão baixos a ponto de não permitirem a análise estrutural de cadeias que tenham mais que 150 a 200 resíduos de aminoácidos; estes problemas, dentre outros, levaram ao surgimento de um interesse considerável em métodos teóricos para predizer estruturas tridimensionais a partir da respectiva seqüência de aminoácidos, nos quais é desnecessária a existência de qualquer outra informação a respeito da macromolécula (Peitsch, 2002).

Proteínas pertencentes a uma mesma família apresentam uma nítida similaridade entre suas estruturas tridimensionais, como já citado para o caso das serino-proteases; porem este fenômeno é observado também mesmo em casos que as proteínas apresentam funções biológicas totalmente distintas, como ,por exemplo, as diversas proteínas que possuem a estrutura dita barril-TIM. Devido a esta característica recorrente nas proteínas, foi desenvolvido o procedimento de modelagem comparativa, pelo qual é construído um modelo

tridimensional de uma proteína, da qual somente se conhece a sequência, baseando-se na estrutura conhecida de uma ou mais proteínas relacionadas à de interesse. Para tal, é necessário determinar previamente qual ou quais estruturas serão usadas como molde, e só então partir para ajustar os aminoácidos da proteína de interesse nas respectivas posições do modelo final escolhido; se a função biológica da proteína sendo modelada é conhecida, pode ser relativamente fácil definir qual estrutura tridimensional será usada como molde, mas em outros casos somente é possível deduzir quais proteínas se assemelham à de interesse por meio de uma busca exaustiva de sequências específicas de aminoácidos em proteínas armazenadas em bancos de dados especializados, escolhendo-se como molde a proteína cuja sequência apresentar maior grau de identidade sequencial com a proteína a ser modelada, função esta executada por programas dedicados, tais como o Psi-blast, ClustalX e o T-coffee (Altschull et al., 1997, Higgins et al., 1994, Thompson, 1997, O'Sullivan, 2004).

A função destes programas é posicionar a sequência de interesse relativamente às do banco de dados de modo que as partes das sequências que se alinharem adequadamente entre si possuam características estruturais ou funcionais em comum, tais como elementos da estrutura secundária ou partes constituintes do sítio ativo; os algoritmos usados nestes programas normalmente acabam incluindo nas sequências algumas lacunas correspondentes a regiões da cadeia polipeptídica em que alguns resíduos que formam laços estão presentes em apenas algumas das sequências, porém verifica-se que em geral isto não é relevante para a posterior modelagem estrutural da proteína, pois tais laços são bem flexíveis, conforme determinado por cristalografia de raios X, causando mínima diferença entre a estrutura das proteínas usadas como molde e a proteína de interesse, desde que o alinhamento seja efetuado adequadamente.

Os algoritmos usados nos programas para alinhamento de sequências classificam-se essencialmente em três tipos: alguns algoritmos tentam alinhar as sequências ao longo de todo o seu comprimento, enquanto outros efetuam apenas alinhamentos locais envolvendo seções relativamente pequenas das cadeias protéicas, existindo ainda os que se baseiam em métodos heurísticos; os dois primeiros tipos de métodos, baseados em técnicas de programação dinâmica, exigem elevados recursos computacionais, o que gera uma preferência pelos algoritmos heurísticos, principalmente com o recente aumento no número de sequências protéicas depositadas nos bancos de dados (Needleman e Wunsch, 1970, Smith e Waterman, 1981). Independentemente do método usado, é necessário verificar a qualidade do alinhamento, uma vez tendo ele sido obtido; um procedimento bastante aceito baseia-se no fato de que dois resíduos, ainda que distintos, podem ser topologicamente idênticos em duas

cadeias peptídicas homólogas, devido a possuírem formas, estrutura eletrônica e/ou hidrofobicidade similares, como por exemplo a serina e a treonina; quando tais resíduos de aminoácidos são substituídos entre si em uma cadeia, tende-se a observar pequena alteração na estrutura tridimensional da proteína, e isto deve ser levado em consideração na avaliação do processo de alinhamento de proteínas; mediante a análise da frequência com que os aminoácidos são mutuamente substituídos em diversas seqüências depositadas em bancos de dados, foi possível deduzir tabelas indicando a probabilidade com que um dado aminoácido pode ser substituído em uma cadeia peptídica qualquer por outro aminoácido específico, designadas como matrizes PAM, as quais são usadas no processo de alinhamento para verificar o grau de identidade seqüencial entre as proteínas sendo comparadas (escore). As matrizes PAM foram originalmente obtidas analisando-se um conjunto relativamente pequeno de seqüências bastante relacionadas entre si, e contando-se o número de resíduos substituídos entre as proteínas deste conjunto; já para as matrizes denominadas BLOSUM, criadas posteriormente, foi usado um conjunto maior de proteínas menos relacionadas entre si, o que faz com que sejam em geral consideradas como superiores às matrizes PAM (Dayhoff et al., 1978, Henikoff e Henikoff, 1992).

Dentre os métodos usados no processo de alinhamento de seqüências protéicas, os baseados em programação dinâmica sempre geram o melhor alinhamento possível para uma dada seqüência protéica, e podem ser implementados de modo a encontrar todas as seqüências que tenham um grau de identidade seqüencial superior a um dado escore pré-definido, embora para atingir tão alto nível de eficiência demandem o uso de elevados recursos computacionais. Tendo em vista o crescente aumento no número de seqüências disponibilizadas nas bases de dados voltadas para a área de proteômica, os métodos baseados em heurística passaram a ser bastante usados mais recentemente; embora estes métodos não garantam a obtenção de um conjunto otimizado de seqüências alinhadas entre si, na prática eles raramente deixam de identificar alguma cadeia protéica armazenada na base de dados que tenha similaridade com a proteína de interesse. Eles geralmente procedem mediante a rápida identificação de regiões de potencial interesse ao longo da cadeia e a seguir expandem estas regiões localmente, o que é bem mais rápido que tentar identificar numa só etapa o conjunto inteiro de aminoácidos que apresentam emparelhamento dentre as cadeias protéicas na base de dados.

O programa Blast, dada uma seqüência de aminoácidos, encontrará todos os pares de segmentos com um dado comprimento (em geral 3) que se emparelham com os respectivos aminoácidos de proteínas da base de dados, com um valor de escore determinado pelo uso de uma matriz BLOSUM superior a um mínimo pré-definido; cada segmento é então estendido

em ambas as direções, até que um outro determinado valor de *escore*, também previamente definido no programa, seja atingido e por fim é retornado pelo algoritmo um ou mais conjuntos de alinhamentos locais (Altschul et al., 1990). Convém lembrar, no entanto, que ao se fazer o alinhamento de seqüências relativamente curtas, pode ocorrer freqüentemente de serem encontradas seqüências aparentemente similares, ainda que efetivamente não possuam qualquer relação entre si, devido ao fato de tais seqüências poderem aparecer aleatoriamente nas bases de dados usadas em bioinformática com uma probabilidade não desprezível, e para tentar evitar que o programa encontre erroneamente tais seqüências espúrias, é usado um parâmetro simbolizado por *E*, que descreve o grau de identidade seqüencial que se espera existir entre duas seqüências quaisquer apenas por acaso, e que permite tornar a pesquisa de homólogos de uma dada seqüência tanto mais seletiva quanto menor for o seu valor, lembrando porem que no caso de cadeias realmente curtas, a probabilidade de se encontrar homólogos por acaso é suficientemente elevada a ponto de tornar a busca por identidade seqüencial não-confiável mesmo lançando-se mão do uso deste parâmetro de controle (Leach, 2001).

Como o programa Blast original não permite a presença de lacunas na seqüência, levando à possível não-identificação de seqüências relevantes, foram posteriormente desenvolvidos os algoritmos Gapped-blast e Psi-blast que admitem que diversos alinhamentos locais sejam combinados de modo a aumentar a probabilidade de se encontrar seqüências similares à que estiver sendo testada; a habilidade de incluir lacunas na seqüência significa que, na procura por cadeias similares em uma base de dados, basta que um único bloco de aminoácidos seja alinhado com a seqüência em teste, pois agora ele poderá ser estendido de modo a gerar outros alinhamentos locais, permitindo assim efetuar um alinhamento completo que poderia ter sido irrealizável com o algoritmo do Blast (Altschul et al, 1997).

Quando se sabe que uma dada proteína de interesse pertence a uma dada família, então é usualmente preferível efetuar um alinhamento múltiplo de seqüências, no qual várias seqüências protéicas são submetidas simultaneamente a um processo de alinhamento, pois assim pode-se obter um resultado final mais confiável devido a muito baixa probabilidade de se obter um alinhamento resultante apenas do acaso, havendo ainda a vantagem de este método permitir a localização de possíveis regiões estruturalmente conservadas na proteína, em geral associadas ao sítio responsável por sua atividade ou ao seu núcleo hidrofóbico (Gribskov et al., 1987). O princípio mais usado no alinhamento múltiplo é o do "*clustering*" hierárquico, no qual inicialmente são efetuados diversos alinhamentos entre pares de proteínas de uma mesma família, e a seguir um algoritmo de "*clustering*" é usado para classificar os

mais similares pares de seqüências, formando ao final uma estrutura em árvore, na qual as seqüências são classificadas com base nos respectivos graus de similaridade que apresentem entre si (Thompson et al., 1997). O alinhamento múltiplo assim obtido serve para indicar não somente a existência e localização de seqüências de consenso como também para revelar quais partes da seqüência protéica não são conservadas (regiões estruturalmente variáveis), onde inserções e deleções de resíduos de aminoácidos são mais comuns, as quais em geral constituem regiões de laços na estrutura terciária da proteína, responsáveis pela conexão entre os diversos elementos da estrutura secundária (hélices, fitas e folhas).

Tendo sido efetuado o alinhamento de uma dada seqüência com outras, dentre as quais pelo menos uma possua a estrutura tridimensional conhecida, parte-se finalmente para a etapa fundamental de construção do modelo tridimensional para a seqüência em questão, o que de modo geral pode ser realizado de três modos distintos: um dos métodos envolve simplesmente a união de fragmentos rígidos tomados de diversas proteínas usadas como moldes para a seqüência de interesse, como ocorre no programa Swiss-Model, já outro método baseia-se no caso acima, porem não trata os fragmentos usados como rígidos, permitindo que os seus átomos constituintes movam-se uns em relação aos outros durante o processo de construção do modelo. Um terceiro método, distinto dos anteriores, envolve uma etapa prévia de geração de um conjunto de restrições espaciais a partir dos dados geométricos das proteínas usadas como moldes, os quais são usados num procedimento posterior de otimização para produzir o modelo final da seqüência, cujas dimensões não podem infringir as restrições existentes; este procedimento é usado no programa Modeller (Sali, 1995).

Os dois primeiros métodos, que se baseiam na construção de modelos a partir de fragmentos de hélices e fitas tomados de estruturas protéicas já conhecidas, podem ser usados em sua forma mais simples para efetuar a modelagem apenas dos laços ou da cadeia polipeptídica ou das cadeias laterais dos resíduos (Jones e Thirup, 1986), porem nos casos mais elaborados, em que a molécula inteira sofre modelagem, o processo de montagem da estrutura deve ser necessariamente seguido de uma etapa de recozimento simulado ("annealing") em que ocorre a otimização de uma função contendo tanto termos dependentes da seqüência de resíduos (envolvendo basicamente efeitos eletrostáticos ou hidrofobicidade) como termos independentes (referentes ao modo como as fitas e hélices são empacotadas).

Em particular, há a necessidade fundamental de se determinar a conformação de cada laço da molécula, os quais geralmente são encontrados na superfície em contato com o meio aquoso; na modelagem dos laços leva-se em consideração o fato de que, independente de sua forma, esta deve ser tal que possibilite a eles conectar adequadamente os elementos da

estrutura secundária protéica, bem como possuir um baixo valor de energia interna e não ter qualquer tipo de interação desfavorável com o resto da cadeia da proteína. Em casos mais favoráveis, os laços da estrutura pertencem a certos tipos bem definidos, como no caso das dobras β que unem as fitas constituintes de folhas β ou de alguns laços que aparecem repetidamente nos anticorpos (Wilmot e Thornton, 1988). Em geral torna-se necessário seguir um procedimento alternativo para gerar a conformação adequada para o laço, o qual pode variar desde métodos simples como a busca de um laço com uma seqüência similar à desejada num banco de dados de estruturas de modo a tentar encontrar um que se ajuste adequadamente ao modelo da proteína já parcialmente determinado, até métodos complexos que envolvem o cálculo direto dos ângulos de torção necessários para que o laço adquira as dimensões adequadas para o encaixe no resto da molécula (Scheraga e Go, 1970).

Para o terceiro tipo de procedimento de modelagem de proteínas, essencialmente diferente dos dois primeiros, as restrições geométricas podem provir tanto de uma análise estrutural direta da seqüência sendo modelada em alinhamento com outras seqüências de estrutura conhecida, como de uma determinação estatística das relações espaciais observadas entre os diversos grupos constituintes da proteína, dentre as quais se distinguem as distribuições de distâncias entre os átomos de carbono α , valores de acessibilidade de solvente aos resíduos, e ângulos de torção de cadeias laterais. Particularmente relevantes são as restrições observadas em proteínas muito similares à seqüência em análise, de modo que sempre que possível, por exemplo, a conformação de cada resíduo da cadeia polipeptídica deve ser definida com base em restrições determinadas para um resíduo equivalente encontrado numa proteína homóloga, de preferência numa região da cadeia que apresente similaridade de seqüência entre as proteínas.

O conjunto de restrições, denominadas de funções de densidade de probabilidade, é combinado de modo a formar uma função de natureza molecular, cujas variáveis são as distâncias e ângulos de ligação e diédricos, dentre outros, que possam existir na molécula; a função é então submetida ao processo de otimização, que envolve métodos tais como o cálculo dos gradientes conjugados ou recozimento simulado, efetuando-se primeiro a avaliação das restrições em nível local, e posteriormente no nível da molécula como um todo (Sali e Blundell, 1993).

Embora todos estes métodos possam em princípio construir uma estrutura tridimensional completa, incluindo as cadeias laterais dos resíduos e mesmo os laços, é mais comum realizar-se o procedimento em etapas, cada qual baseando-se em um dos métodos em questão: inicialmente é construída a cadeia polipeptídica correspondente às regiões

estruturalmente conservadas conforme previamente determinado no processo de alinhamento de seqüências; a este núcleo assim obtido são então adicionados os laços e a seguir as cadeias laterais de todos os resíduos. Com a estrutura completa, o modelo é submetido a um procedimento de otimização, tal como a minimização de energia; convém no entanto citar o fato de que, conforme já verificado mediante a comparação de diversos métodos para modelagem de estrutura, em geral a etapa final de minimização de energia é a principal responsável por problemas encontrados nos modelos obtidos, dentre os quais ligações peptídicas não-planas, ângulos de torção irreais, e disposição dos resíduos de aminoácidos em regiões da proteína claramente inadequadas (por exemplo, resíduos apolares na superfície da molécula), o que levou à sugestão de se elaborar procedimentos alternativos para a etapa de refinamento do modelo estrutural (Mosimann et al., 1995, Moult et al., 1999).

Ao final deste processo ficam ainda incompletos os ajustes referentes às conformações das cadeias laterais dos resíduos; enquanto no núcleo hidrofóbico da proteína é usual que os resíduos mantenham-se conservados entre as proteínas usadas como molde e a proteína modelada, de modo a poderem ser usados nesta as informações provenientes daquelas, já nos resíduos expostos ao solvente e principalmente nos laços este procedimento pode ser inaplicável, devendo-se então recorrer a métodos tais como dinâmica molecular por Monte Carlo ou recozimento simulado, ou algoritmos genéticos que tentam se aproximar gradualmente da estrutura final mais provável (Vasquez, 1996). Existem casos em que se pode tentar restringir as conformações destas cadeias laterais aos valores usualmente encontrados em média para resíduos idênticos em proteínas de estrutura conhecida (Ponder e Richards, 1987), bem como incluir informações sobre a conformação da própria cadeia polipeptídica no cálculo final das conformações das cadeias laterais dos resíduos que a constituem (Dunbrack e Karplus, 1993).

Após o encerramento da modelagem estrutural é realizada a sua validação, para verificar se ela se conforma com várias regras conhecidas sobre a geometria das estruturas protéicas, como por exemplo se os resíduos de aminoácidos encontram-se apenas nos estados de energia permitidos no gráfico de Ramachandran, ou se as cadeias laterais dos resíduos apresentam desvios pequenos em relação às estruturas usualmente observadas para proteínas já conhecidas. Testes bem mais complexos são possíveis, tais como o de Eisenberg que se baseia na determinação de três propriedades para cada resíduo, as quais são a área total do resíduo pertencente ao núcleo hidrofóbico da proteína, a estrutura secundária local onde ele se encontra, e a fração da cadeia lateral em contato com o solvente ou átomos polares, sendo que a cada resíduo é dado um escore baseado no grau de adequação dele aos valores normalmente

encontrados nas proteínas em geral (Lüthy et al, 1992). Este método, embora mais elaborado, é bastante útil pois, ao permitir calcular um valor de escore geral para a molécula, torna possível identificar imediatamente uma modelagem incorreta, visto que em geral quando um modelo de estrutura apresenta baixos valores de escore ele possui resíduos em ambientes com os quais eles são incompatíveis, e tais casos não poderiam ser identificados simplesmente avaliando-se os valores de energia obtidos na etapa de modelagem molecular durante a construção do modelo. Outra vantagem deste método é a possibilidade de se identificar dentro de uma dada estrutura, em princípio correta, a ocorrência de regiões de resíduos modelados erradamente, os quais apresentarão em média valores de escore nitidamente inferiores ao esperado.

A etapa seguinte ao procedimento de modelagem protéica, no caso de estudos envolvendo interações proteína-ligante, envolve o uso de um procedimento dito de "*docking*" (ancoragem) do ligante, mediante o qual procura-se sugerir o modo como ocorre a ligação entre as moléculas (Vakser, 2002). O procedimento de "*docking*" envolve muitos graus de liberdade, incluindo-se os três graus de liberdade translacionais e três graus de liberdade rotacionais referentes ao movimento relativo entre as moléculas, além dos inúmeros graus de liberdade referentes às diversas conformações apresentadas pelas proteínas, devendo-se também considerar a possibilidade de existir um elevado número de graus de liberdade pelo menos para alguns ligantes de estrutura mais complexa (peptídios, lipídios, alguns fármacos).

Os algoritmos mais simples usados neste procedimento simplesmente ignoram todos os graus de liberdade devidos às conformações protéicas, tratando a proteína e o ligante como corpos rígidos, submetendo-os apenas a movimentos de translação e rotação até que se encontre uma posição relativa entre eles tal que apresente um mínimo de energia; este é o procedimento implementado no programa Gramm. Este programa executa sua função, assim como outros de mesma natureza, deslocando o ligante a intervalos regulares sobre a superfície da proteína, num movimento que envolve seis graus de liberdade, três translacionais e três rotacionais, calculando a energia de interação entre o ligante e a proteína; ao final do processo, o programa gera uma listagem contendo as estruturas protéicas que apresentaram as maiores energias de ligação calculadas, as quais provavelmente simulam a verdadeira estrutura do complexo proteína-ligante que seria obtida por cristalografia. É fundamental recordar o fato de que se trata somente de um procedimento de simulação, sujeito a todo o tipo de restrições encontradas nesta área, dentre as quais podemos citar a ausência de água no sistema considerado, e a rigidez da proteína, que é tratado como um corpo inflexível, sendo que no máximo alguns programas de "*docking*" efetuam testes de dinâmica das cadeias

laterais envolvidas em interações com o ligante, o que é bastante limitado, pois somente uma pequena fração de todos os possíveis modos de interação proteína-ligante é efetivamente considerada pelo algoritmo.

Existem também métodos que levam em consideração os graus de liberdade referentes ao ligante, permitindo a existência de rotações em suas ligações durante a execução do processo, porem não foi desenvolvido um algoritmo que leve em consideração as variadas conformações possíveis para a proteína, pois tais cálculos exigiriam recursos computacionais atualmente não disponíveis, como pode ser verificado se considerarmos que para cada movimento de translação ou de rotação da molécula do ligante seria necessária efetuar um estudo conformacional da proteína, tarefa esta que já é, por si só, extremamente complexa e computacionalmente custosa.

Como no procedimento de "*docking*" pode ser gerado um número realmente elevado de possíveis soluções para o problema de identificar a posição da proteína em que o ligante se ancora, é necessário que se aplique, durante ou após o processo, algum tipo de cálculo que identifique as estruturas proteína-ligante mais prováveis, o qual deve nos permitir identificar com um grau de confiança razoável o modo mais provável de ligação no complexo proteína-ligante. Métodos detalhados de cálculo da energia livre de interação entre a proteína e o ligante seriam, em princípio, o ideal, porem na prática são extremamente lentos para poderem ser efetivamente usados; outros métodos, que consideram a energia livre de ligação simplesmente como sendo devida à combinação linear de termos determinados empiricamente, são mais rápidos e são usados nos programas disponíveis atualmente.

Existem atualmente diversos inibidores de serino-proteases disponíveis comercialmente, além de vários outros que vem sendo desenvolvidos recentemente (Kurinov e Harrison, 1994, 1996, Whithlow et al., 1996), porem em grande parte dos casos eles tem sido testados em proteases humanas, havendo portanto a necessidade de se verificar o modo como estes inibidores podem atuar em proteases de serpentes, o que pode levar a meios de se controlar a sua atividade, permitindo o seu uso mais amplo em cirurgias e em outras situações que necessitem do preciso controle do sistema hemostático. Dentre os inibidores disponíveis atualmente, podem-se destacar dois grupos principais, os que contem grupos básicos, positivamente carregados nas condições usuais de pH fisiológico, e os que contem flúor, que se ligam covalentemente ao resíduo de serina do sítio ativo da protease. A existência destas duas categorias de inibidores indica em princípio a possibilidade de haver dois modos distintos de ação sobre a protease, o que leva a considerar a necessidade de, ao se efetuar o

procedimento de "docking", testar-se ao menos uma substância de cada grupo, de modo a poder-se comparar o modo de ação de cada uma.

3.2) Purificação Cromatográfica

3.2.1) Cromatografia por Afinidade

5

Obteve-se cerca de 100 mg de proteína de origem de *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) por meio de extração com 0,5 M de NaCl em tampão de equilíbrio a 4°C. A proteína foi precipitada por 10% de acetona e lavada com água destilada. O precipitado foi ressuspenso em 1 ml de tampão de equilíbrio a 4°C. A proteína foi quantificada por método de Lowry (1956) e o volume foi ajustado para 1 mg/ml. A proteína foi armazenada a -20°C. Para a purificação, a proteína foi ligada a uma coluna de afinidade com *Concanavalina A* (ConA) acoplada a uma matriz de *agarose* (BioLabs). A coluna foi lavada com tampão de equilíbrio a 4°C. A proteína foi eluída com 0,5 M de NaCl em tampão de equilíbrio a 4°C. O eluato foi precipitado por 10% de acetona e lavada com água destilada. O precipitado foi ressuspenso em 1 ml de tampão de equilíbrio a 4°C. A proteína foi quantificada por método de Lowry (1956) e o volume foi ajustado para 1 mg/ml. A proteína foi armazenada a -20°C.

Os resultados da purificação da proteína de origem de *Salmonella typhimurium* são mostrados na Figura 15. Não são apresentados os resultados da purificação da proteína de origem de *Escherichia coli*.



Figura 15: Purificação por afinidade da proteína de origem de *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) por meio de *Concanavalina A* (ConA) acoplada a uma matriz de *agarose* (BioLabs).



V - RESULTADOS

5.1) Purificação Cromatográfica

5.1.1) Cromatografia por Afinidade

Diluiu-se cerca de 100 mg de amostra de veneno liofilizado em tampão Tares 25mM pH 8,0, centrifugando-se a seguir a 10000 $\times g$ por 10 minutos a temperatura de 11°C. O sobrenadante foi aplicado em coluna Sepharose CL-6B/benzamidina (20mL de volume útil) previamente lavada e equilibrada com tampão Tris 25mM pH 8,0 à temperatura de 11°C. As amostras foram eluídas com o mesmo tampão durante 30 minutos à vazão de 1,2 mL/min; esta vazão foi usada também nas etapas posteriores de eluição. A seguir, passou-se na coluna tampão Tris 25 mM pH 8,0 contendo 0,5 M de NaCl durante 20 minutos para remover o restante das substâncias adsorvidas não-especificamente à coluna. Deixou-se a coluna atingir a temperatura ambiente e então a fração contendo serino-proteases foi obtida mediante eluição com tampão glicina 20 mM pH 3,2, recolhendo-se em tubo ao qual adicionou-se cerca de 2 mL de tampão Tris 250 mM pH 8,0. A fração contendo serino-protease foi concentrada em centrífuga a 4000 $\times g$ mediante ultrafiltração em filtro Centriprep da Millipore, até um volume final de 400 μ L.

Um cromatograma, apresentando a etapa final de eluição com glicina, é mostrado na figura 15. Não são apresentados os outros cromatogramas, por serem quase idênticos.

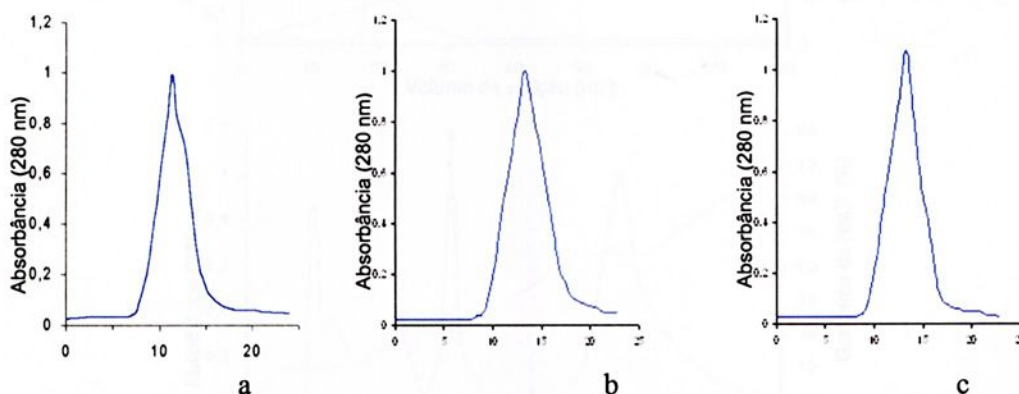
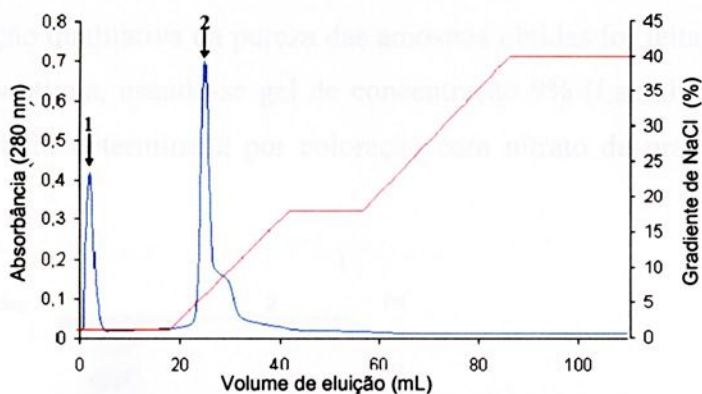


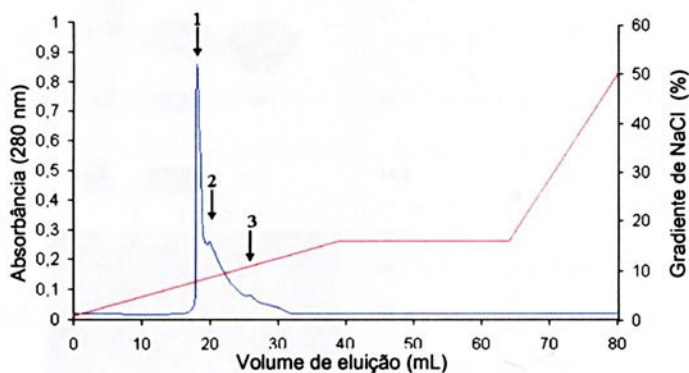
Figura 15: Purificação por cromatografia de afinidade do veneno de a) *B. jararaca*, b) *C. d. terrificus* e c) *L. m. muta*

5.1.2) Cromatografia por Troca Iônica

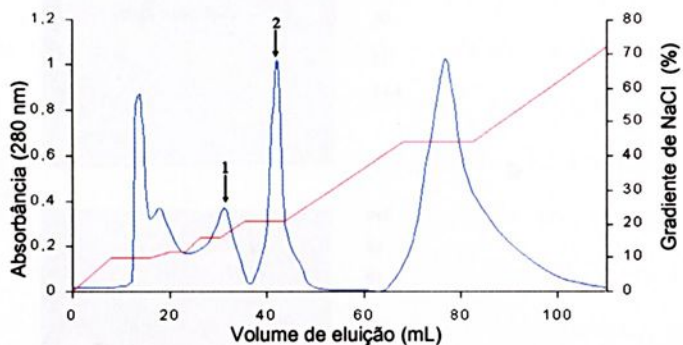
A fração contendo serino-protease obtida na etapa anterior foi aplicada em coluna de troca aniônica MonoQ (1 mL de volume útil) previamente equilibrada com tampão Tris 25 mM pH 8,6. Eluiu-se durante 20 minutos com o mesmo tampão, à vazão de 2,0 mL/min, para remover impurezas não-ligadas à coluna. A seguir, iniciou-se um gradiente com tampão Tris 25 mM pH 8,6 contendo 0,5 M NaCl à vazão de 2,0 mL/min, num volume total de 150 mL.



a



b



c

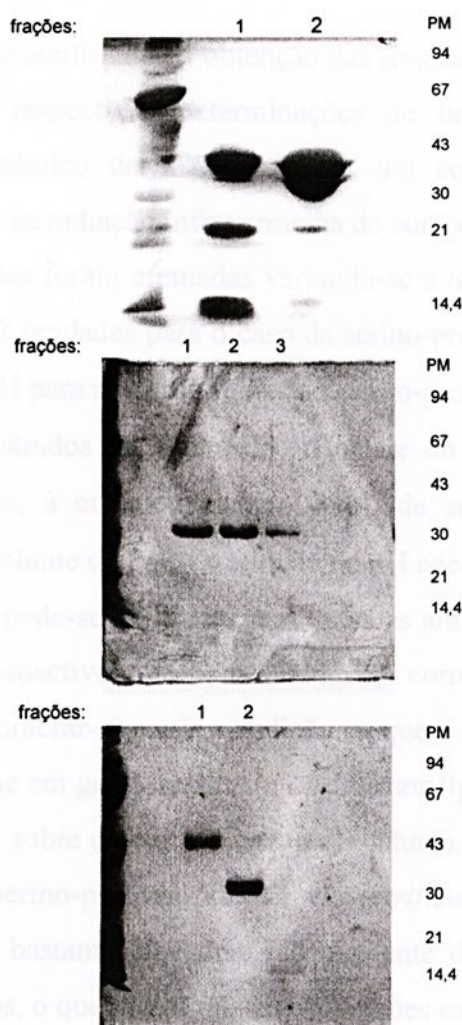
Figura 16: Purificação mediante cromatografia de troca aniônica, após prévia purificação por cromatografia de afinidade, dos venenos de a) *B. jararaca*, b) *C. d. terrificus* e c) *L. m. muta* (os números correspondem às frações analisadas por SDS-PAGE).

Os cromatogramas correspondentes à purificação das amostras de *B. jararaca*, *C. durissus terrificus* e *L. muta muta* são mostrados em seqüência, respectivamente, na figura 16.

No caso de amostras provenientes de *C. durissus terrificus* e de *B. jararaca* um pico foi observado no cromatograma, enquanto que para *L. muta muta* foram obtidas quatro frações. Cada fração obtida foi concentrada em filtro Centriprep como na etapa anterior.

5.2) Eletroforese Desnaturante em Gel de Poliacrilamida

A determinação qualitativa da pureza das amostras obtidas foi feita mediante a técnica de SDS-PAGE descontínua, usando-se gel de concentração 9% (Laemli, 1970), e a posição das proteínas no gel foi determinada por coloração com nitrato de prata (Heukeshoeven e Dernick, 1985).



a

b

c

Figura 17: Eletroforese das frações obtidas por purificação por troca iônica do veneno de a) *B. jararaca*, b) *C. d. terrificus* e c) *L. m. muta* (PM: peso molecular em kDa).

Para ter uma idéia aproximada da massa molecular de cada amostra analisada, adicionou-se, em paralelo, marcadores de peso molecular, os quais consistem de proteínas com as seguintes massas: 14,4kDa, 21kDa, 30kDa, 43kDa, 67kDa e 94kDa (Figura 17).

5.3) Quantificação das Amostras protéicas

Depois de confirmada a pureza de cada fração protéica, determinou-se a respectiva concentração por meio do método de Bradford usando-se corante Coomassie R-250 (Bradford, 1976). Os valores obtidos para as proteases de *B. jararaca*, *C. d. terrificus*, e para a 1ª e a 2ª frações de *L. m. muta* foram respectivamente de 4,7 mg/mL, 3,2 mg/mL, 5,2 mg/mL e 7,3 mg/mL.

5.4) Medidas de DLS das Frações Purificadas

Tendo sido confirmada a obtenção das frações protéicas de forma quimicamente pura, foram feitas as respectivas determinações de homogeneidade estrutural por meio de espalhamento dinâmico de luz, usando-se um equipamento DynaPro 801 da Protein Solutions, usando-se radiação infravermelha de comprimento de onda 824,3 nm.

As medições foram efetuadas variando-se a temperatura em intervalos de 5°C e o pH em intervalos de 2 unidades para o caso da serino-protease de *C.d. terrificus*, e em intervalos de 1 unidade de pH para as duas frações de serino-proteases obtidas de *L. m. muta*, obtendo-se os resultados mostrados na figura 18; o ajuste do nível de acidez do meio foi efetuado mediante a adição, à cubeta contendo 20µL de solução protéica numa concentração de 5mg/mL, de um volume de 5µL de tampão no pH adequado na concentração de 1M.

Conforme pode-se verificar, para todas as amostras observa-se na faixa de pH neutro um mínimo no respectivo raio hidrodinâmico, correspondendo a uma menor tendência de cada proteína aglomerar-se nesta condição, o que é esperado considerando-se que esta é a faixa de pH em que em geral se situam os diversos tipos de fluidos biológicos, incluindo-se o plasma sanguíneo, sobre o qual estas proteases atuam. Deve-se considerar porém que, no caso da amostra de serino-protease de *C. d. terrificus*, os valores de raio hidrodinâmico determinados são bastante elevados, independente da faixa de temperatura ou de pH que sejam considerados, o que indica que nas condições experimentais usadas a proteína encontra-se agregada; não foi possível encontrar uma explicação conclusiva para este fenômeno, porém, conhecendo-se a necessidade da presença de íons para manter proteínas em solução,

pode-se considerar que a força iônica das amostras analisadas não seja suficiente para manter as moléculas protéicas em forma não-aglomerada.

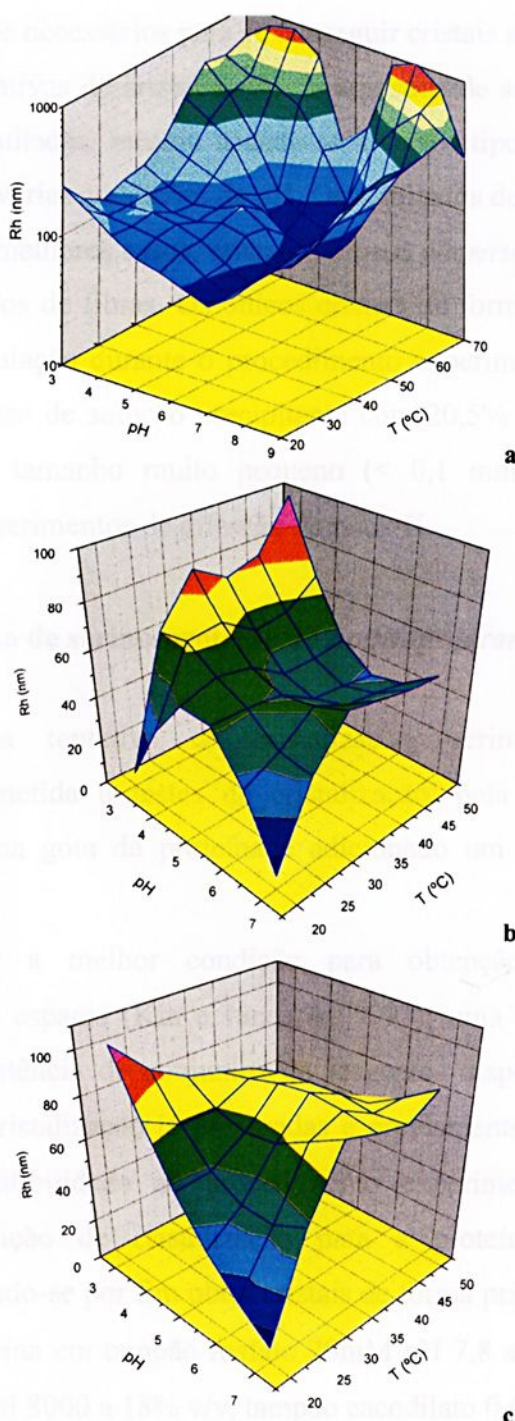


Figura 18: Experimentos de DLS das frações obtidas por purificação por troca iônica do veneno de a) *C. d. terrificus*, b) *L. m. muta* (1ª fração) e c) *L. m. muta* (2ª fração).

Não obstante a observação acima, em princípio pode-se sugerir, com base nestes resultados, que uma possível tentativa de se cristalizar as serino-proteases obtidas seja efetuada em condições próximas ao pH neutro, minimizando assim o elevado número de experimentos usualmente necessários para se conseguir cristais adequados de proteínas.

No entanto, tentativas de cristalização de amostras de serino-protease de *B. jararaca* não levaram a bons resultados, mesmo usando-se diversos tipos de soluções precipitantes e aditivos, bem como em várias condições de pH. Os resultados de uma maneira geral, obtendo-se precipitados ou, nos melhores casos, cristais fibrosos dispersos na solução de cristalização ou formando aglomerados de fibras. Os únicos cristais de formato prismático, que é o mais adequado para a manipulação durante o procedimento experimental de difração de raios X, foram os obtidos pelo uso de solução precipitante com 20,5% v/v de PEG 10k em pH 5,5, porem estes foram de tamanho muito pequeno ($< 0,1$ mm) para poderem ser usados satisfatoriamente em experimentos de difração de raios-X.

5.5) Cristalização de serino-protease de *Bothrops jararacussu*

Prosseguindo na tentativa de cristalização, serino-protease de veneno de *B. jararacussu* foi submetida a testes de cristalização, pela difusão de vapor em gota pendente, em que a uma gota da proteína é adicionado um volume idêntico de solução precipitante.

Para determinar a melhor condição para obtenção de cristais, seguiu-se o procedimento de matriz esparsa (Kin e Jancarik, 1991); uma das vantagens práticas deste método consiste na existência de conjuntos de reagentes disponíveis comercialmente com todas as condições de cristalização já preparadas e previamente filtradas, o que garante um maior grau de reprodutibilidade ao procedimento experimental. Uma vez tendo sido identificada uma condição de cristalização para a proteína, procurou-se otimizar o procedimento, conseguindo-se por fim obter cristais de forma prismática mediante a adição de $1\mu\text{L}$ da solução da proteína em tampão fosfato 20mM pH 7,8 a $1\mu\text{L}$ da solução precipitante contendo polietilenoglicol 8000 a 18% v/v, tampão cacodilato 0,1M pH 6,5, e 0,2M de CaCl_2 .

5.6) Coleta de dados de difração de raios X

Os cristais foram transferidos para uma solução contendo, além da solução precipitante, 20% do crio-protetor glicerol e, mantidas sob um fluxo de N_2 a 100K, foram submetidos a procedimento de difração de raios X na linha CPR do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS; o comprimento de onda da radiação usada foi de $1,54\text{\AA}$, gerando padrões de difração com resolução de $2,28\text{\AA}$ (Figura 19).

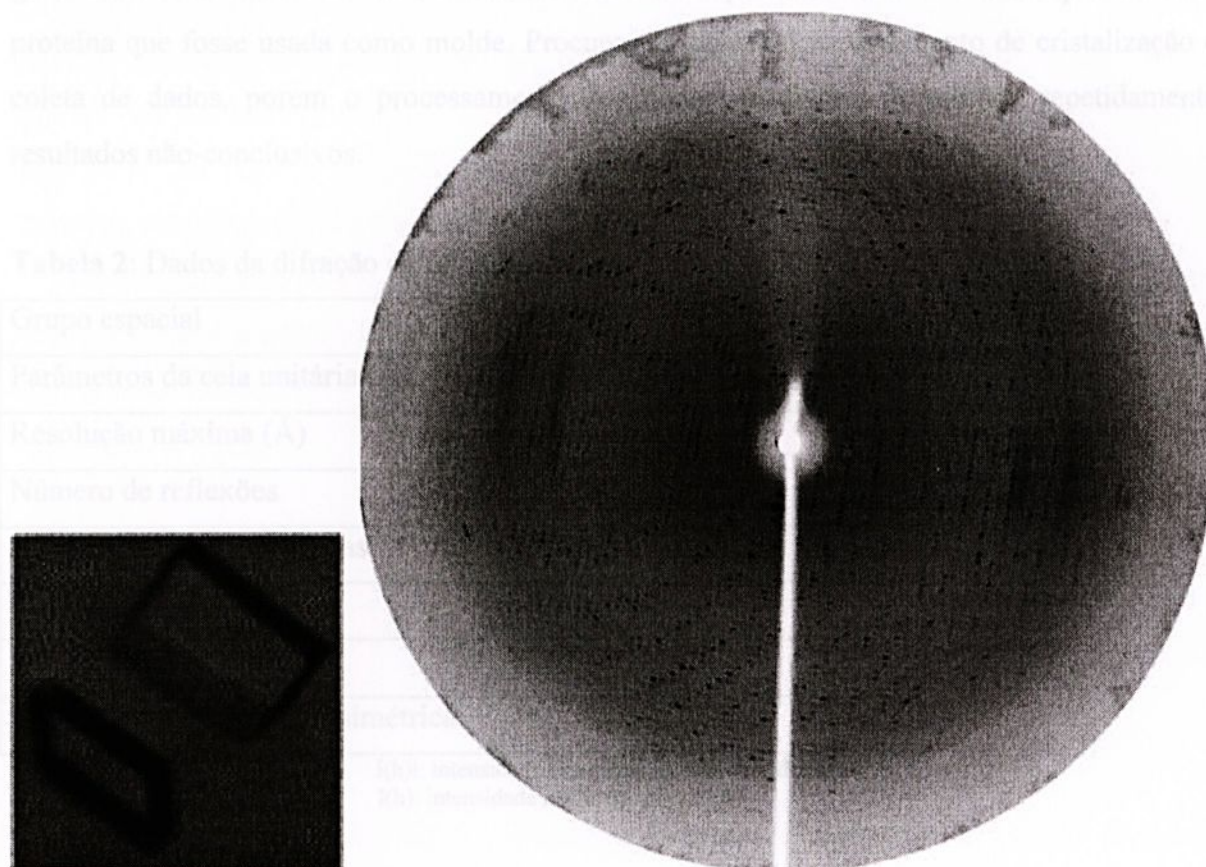


Figura 19: Cristais obtidos e padrão de difração respectivo para serino-protease de *B. jararacussu* (resolução $2,28\text{\AA}$)

5.7) Processamento dos dados de difração de raios X

A visualização e análise das imagens foram realizadas usando o programa XDISP. A indexação e integração dos dados foram obtidas com o uso do programa DENZO. Os dados posteriormente foram escalonados usando SCALEPACK e transformados em um formato compatível para as tentativas de substituição molecular, desde que havia moldes

tridimensionais de proteínas homólogas pertencentes à mesma família. A estrutura cristalina pertence ao grupo espacial ortorrômbico P2₁2₁2₁ (os parâmetros resultantes do processamento são mostrados na tabela 2).

Os dados processados foram subseqüentemente submetidos às tentativas de substituição molecular usando como molde a estrutura TSV-PA (PDB: 1BQY) e os programas AMoRe, MOLREP e PHASER (Navaza, 1994, Vagin, 1997, McCoy, 2005). Os resultados de rotação e translação não indicaram nenhuma solução clara, apresentando em geral fator R acima de 50 % e coeficiente de correlação inferior a 40 %, independente da proteína que fosse usada como molde. Procurou-se repetir o procedimento de cristalização e coleta de dados, porem o processamento dos dados resultantes apresentou repetidamente resultados não-conclusivos.

Tabela 2: Dados da difração de raios X

Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Parâmetros da cela unitária (Å)	a=94,63 b=116,04 c=155,78
Resolução máxima (Å)	2,28
Número de reflexões	579595
Número de reflexões únicas	65695
R _{merge} (%)	5,9
V _M (Å ³ /Da)	2,78
Moléculas por unidade assimétrica	6

$R_{merge} = \frac{\sum (\sum |I(h)_i - I(h)|)}{\sum I(h)}$ I(h)_i: intensidade da i-ésima medida da reflexão h
I(h): intensidade média da reflexão h

5.8) Determinações Bioquímicas

A determinação das atividades enzimáticas (em unidades internacionais UI) e coagulante foram efetuadas para as serino-proteases obtidas de *C. d. terrificus* e *L. m. muta*, conforme descrito abaixo, e os resultados são apresentados na tabela 3.

Tabela 3: Resultados das determinações bioquímicas

Método \ Amostra	<i>C. d. terrificus</i>	1ª fração <i>L. m. muta</i>	2ª fração <i>L. m. muta</i>
coagulação (s)	15	-	15
BApNA (UI)	75	38	112
TAME (UI)	89,6	-	-

Não foi possível efetuar todos os testes para as proteases obtidas de *L. m. muta*, devido às baixas quantidades extraídas por separação cromatográfica do respectivo veneno.

5.9) Modelagem Estrutural da Protease de *Crotalus atrox*

Em paralelo ao procedimento de purificação e cristalização de serino-proteases, foi efetuada a determinação estrutural de serino-protease mediante o método de modelagem. Dentre as serino-proteases de veneno de serpente já identificadas, escolheu-se na base de dados Expasy/Embl a catroxase I, isolada do veneno de *Crotalus atrox*, cuja seqüência primária é inteiramente conhecida; foi então efetuado o seu alinhamento contra todo o conjunto de proteínas depositadas no banco de dados PDB, usando-se o programa Psi-blast, o qual gerou um arquivo contendo diversas seqüências de proteínas similares à de interesse, dispostas em ordem decrescente de identidade seqüencial.

A seguir, selecionou-se dentre estas proteases quatro que apresentaram as seqüências mais próximas à seqüência da proteína a ser modelada. Os códigos do PDB para as proteínas usadas como moldes, bem como o grau de identidade seqüencial entre elas e a catroxase I, são mostrados na tabela 4.

Tabela 4: Percentagem de identidade seqüencial entre proteínas-molde e catroxase I

Código PDB	% Identidade
1bqyB.pdb	72,16
1op0A.pdb	70,13
1co7E.pdb	44,72
1a0jD.pdb	43,05

O alinhamento entre as seqüências, conforme efetuado com o uso do programa ClustalX, é apresentado na figura 20.

Este conjunto foi então submetido ao procedimento de modelagem por meio do servidor Swiss-model (Peitsch et al, 1999, Peitsch et al, 2003), o qual gerou a estrutura tridimensional desejada e a submeteu à checagem pelo algoritmo WhatCheck. Este algoritmo, por sua vez, indicou não haver qualquer erro grosseiro tanto nos parâmetros envolvendo ângulos e distâncias de ligação para a cadeia principal como para os resíduos de aminoácidos, bem como não tendo encontrado sinais de empacotamento inadequado dos átomos no interior da molécula (Vriend, 1990).

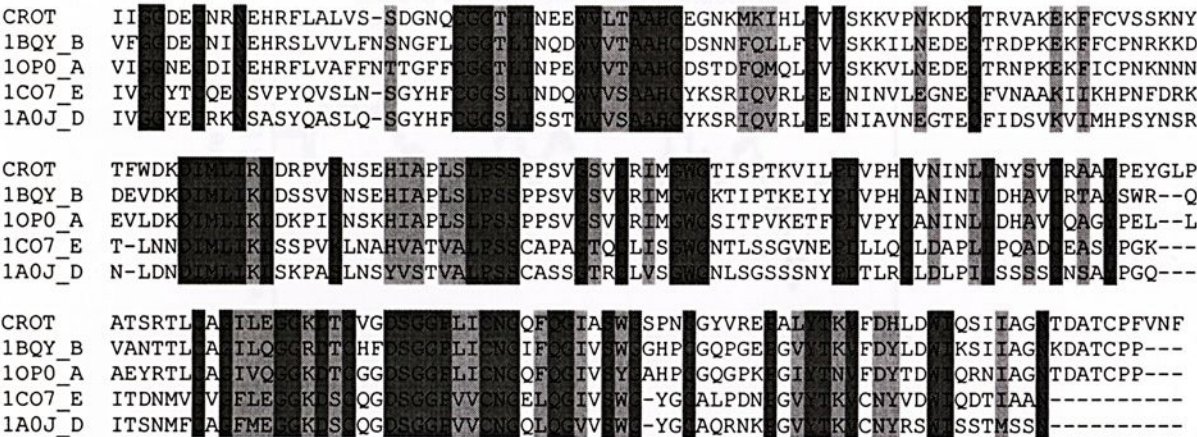


Figura 21. Valores de escore calculados pelo programa Verify3D para as regiões de

Figura 20: Alinhamento entre as seqüências da cratoxase I (CROT) a das proteínas usadas como molde; em cinza escuro são destacados os resíduos homólogos idênticos, e em cinza os resíduos de natureza similar

Dentre os resultados fornecidos pelo programa WhatCheck, podem-se destacar os seguintes:

- RMS dos desvios de comprimentos de ligação: 0,017Å
- RMS dos desvios de ângulos de ligação: 2,38°
- fração de resíduos com ângulos torsionais phi ou ômega proibidos: < 5%

Os parâmetros acima apresentados indicam que a estrutura modelada para a cratoxase I não apresenta desvios significativos do esperado, considerando-se os dados de estruturas protéicas já existentes na base de dados PDB.

Outro teste para se verificar se a estrutura gerada é fisicamente correta foi efetuado por meio do programa Verify3D, que analisou se os resíduos de aminoácidos do modelo apresentam-se dispostos conforme seria previsto considerando-se suas respectivas polaridades. Conforme visto na figura 21, os valores de escore calculados para cada resíduo pelo programa não atingiram, em ponto algum da seqüência, valores negativos, o que, caso ocorresse, indicaria uma possível falha no modelo, pois representaria a existência de um resíduo numa posição fisicamente pouco acessível a ele.

Outro valor que merece ser considerado é o designado como S, e que é igual à soma de todos os valores de escore dos resíduos de aminoácidos, o qual para este modelo é de 107,28; este valor é bem próximo ao valor teórico previsto de 112,65 para proteínas com o mesmo número de resíduos de aminoácidos da cratoxase (Luthy et al., 1992).

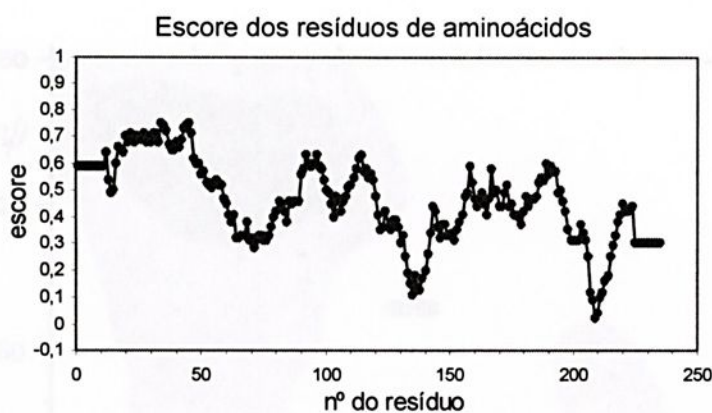


Figura 21: Valores de escore calculados pelo programa Verify3D para os resíduos de aminoácidos da proteína modelada catroxase I

A confirmação da viabilidade da estrutura modelada pode ser vista no gráfico de Ramachandran (Figura 22), na qual verifica-se claramente que a grande maioria dos resíduos apresenta valores de ângulos de ligação ϕ e ψ efetivamente dentro das regiões permitidas. As únicas exceções presentes são referentes a resíduos de glicina, aos quais a avaliação do gráfico de Ramachandran efetivamente não se aplica, e a alguns resíduos polares presentes na superfície da molécula modelada, distantes da região pertencente ao sítio ativo da protease modelada.

Tendo sido confirmada a validade da estrutura modelada, passou-se à etapa de inserção de possíveis ligantes na estrutura protéica, com o fim de estudar como ocorre a interação entre cada um destes e a superfície da proteína. Dentre os diversos inibidores de serino-proteases existentes, foram escolhidos dois que interagem eletrostaticamente, benzamidina e aminometilciclo-hexano, e outros dois que reagem quimicamente com o resíduo ativo de serina, PMSF e DFP (Figura 23).

Considerando-se a natureza diversa dos inibidores testados, a modelagem da estrutura da protease inibida somente foi conseguida mediante o uso de dois programas distintos. Inicialmente, foi feita a introdução de inibidores contendo flúor na estrutura modelada, DFP e PMSF, usando-se o programa Turbo-Frodo, mediante o qual posicionou-se cada inibidor aproximadamente na posição em que se esperaria que ele se localize na estrutura final, ou seja, próximo ao resíduo de serina do sítio ativo.

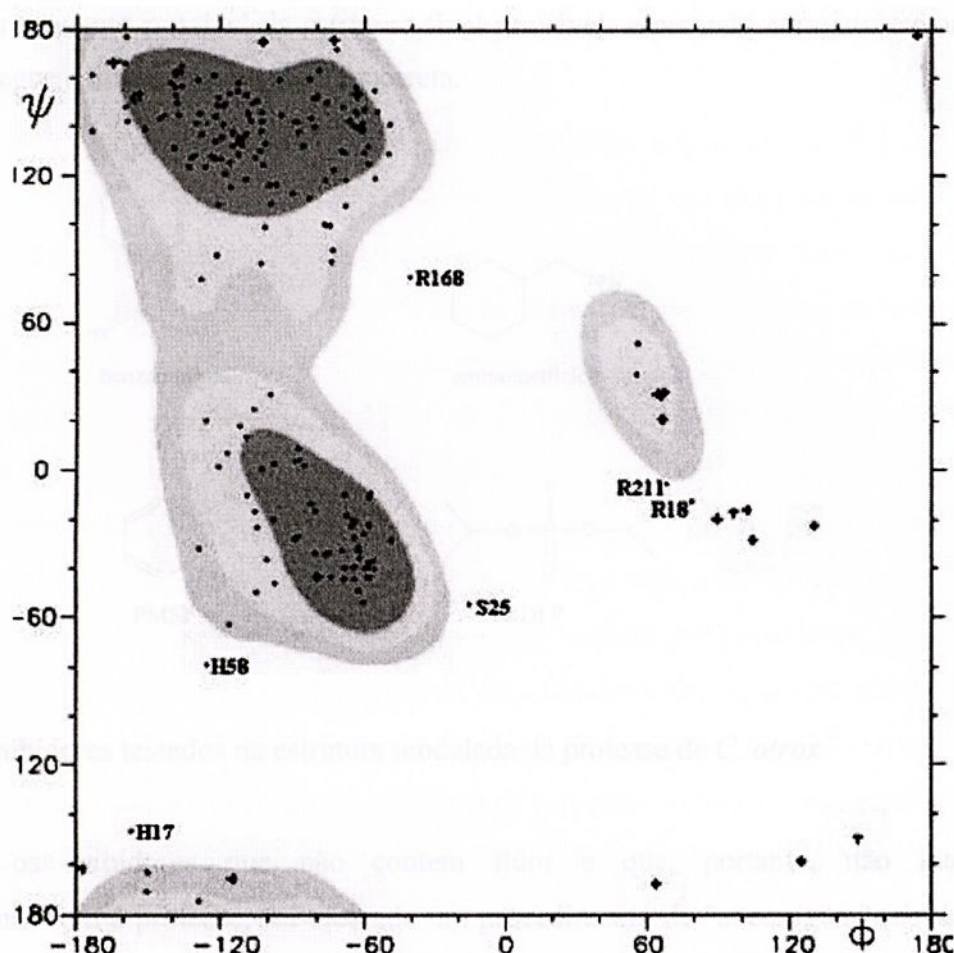


Figura 22: Gráfico de Ramachandran para os resíduos de aminoácidos da proteína modelada catrocase I (+ glicina).

Tendo sido montada a estrutura de cada complexo proteína-inibidor, procedeu-se à etapa de minimização de energia, levando por fim à obtenção das estruturas da protease inibida. Para os casos da protease ligada ao DFP e PMSF, submeteu-se cada complexo ao programa Gromacs, o qual mediante o uso do algoritmo denominado de “*steepest descent*” procura determinar o ponto de mínima energia para o sistema, de modo a encontrar a estrutura mais provável para o complexo.

É importante considerar o fato de que, se a estrutura originalmente fornecida ao programa for muito diferente da verdadeira estrutura mais estável, o algoritmo pode acabar não conseguido encontrá-la, chegando a um resultado final não relacionado à verdadeira estrutura; como obviamente não se conhece a estrutura do complexo antes de se iniciar o processo de minimização de energia, o que se faz é, levando-se em conta o que já se conhece sobre a proteína e outras similares a ela, procurar fornecer ao programa uma estrutura que

esteja tão perto quanto possível da estrutura final provável, esperando com isto evitar que o algoritmo chegue a uma estrutura final incorreta.

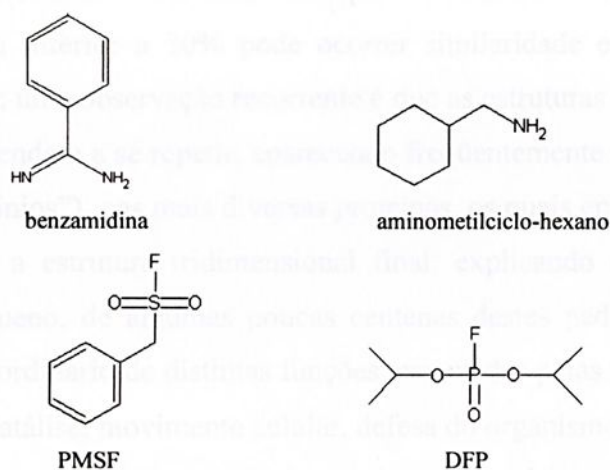


Figura 23: Inibidores testados na estrutura modelada da protease de *C. atrox*

Para os inibidores que não contem flúor e que, portanto, não interagem covalentemente com a protease, foi efetuado um procedimento de "ancoragem" (*docking*) do inibidor sobre a proteína, usando-se o algoritmo Gramm, específico para este tipo de procedimento (Vakser, 2002). Considerando-se que este procedimento é apenas aproximado, submeteu-se a seguir cada uma dos complexos proteína-inibidor à minimização de energia com uso do programa Gromacs, para determinar a disposição efetiva do inibidor na superfície da proteína, com uso do algoritmo dito "*steepest descent*".

VI – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Sabe-se que, mesmo em casos em que a identidade sequencial entre duas cadeias polipeptídicas seja inferior a 30% pode ocorrer similaridade estrutural entre as proteínas sendo comparadas; uma observação recorrente é que as estruturas obtidas por cristalografia de raios X ou RMN tendem a se repetir, aparecendo freqüentemente os mesmos tipos de padrões estruturais (“domínios”) nas mais diversas proteínas, os quais em geral se combinam entre si de modo a gerar a estrutura tridimensional final, explicando o fato de que um número relativamente pequeno, de algumas poucas centenas destes padrões, possa ser responsável pelo número extraordinário de distintas funções executadas pelas proteínas, incluindo os mais diversos tipos de catálise, movimento celular, defesa do organismo, dentre outras.

É interessante verificar que o fenômeno inverso também pode acontecer, a presença de duas proteínas com seqüências similares porem com algumas diferenças em suas estruturas tridimensionais, o que demonstra a complexidade envolvida nesta questão (Orengo et al., 1993). Deve-se notar, entretanto, que a existência de estruturas distintas não necessariamente implica funções diferentes, como é exemplo o caso da subtilisina e da quimotripsina, que apresentam seqüência e estrutura tridimensional claramente diferentes, e ainda assim possuem os mesmos resíduos nos respectivos sítios catalíticos, atuando segundo um mesmo mecanismo. Isto pode ser claramente observado na figura 25a, obtida por sobreposição no Turbo-Frodo, em que nota-se a total diferença entre as estruturas da quimotripsina (código PDB: 1ACB) e da subtilisina (PDB: 1SBI), e na figura 25b, em que são mostradas as distâncias entre os átomos de carbono alfa dos resíduos das duas proteases, com a maioria apresentando uma distância mútua superior a 2Å; ambas as observações estão de acordo com o baixo grau de identidade sequencial apresentado entre elas (13% conforme verificado pelo programa ClustalX) como mostrado no alinhamento (figura 24):

```

1SBI  AQSVPYGVSQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAGGASEVPSETNPFODNNSHGT-VAGTVAAALDNSI
1ACB  -----CGVPAIQP-----V-LSGLSRIVNGEEAVPGSWPQVSLQDKTGEHFCGGSLLINENWVVTAA-CGVTTSDVVVA

1SBI  GVLGVAPSAS-LYAVKVLGADGSGQYSWIINGIEWATANNM-VINMSLGGPSGSAALKAAVDKAVASGVVVVAAAGNEGT
1ACB  GEEFDQGSSEKIQLKIAKVFKNKYNST-----INN---ITLLKIST---AASESQTVSACVCLPSASDDFAAGTTCV

1SBI  SSSSTVGYP-ARYPSVIAVGAVDSSNORASFSSVGPELDVMAPGVSLCSTLPGNKYGAYSST-MASPHVAGAAALIIISK
1ACB  ITGWGLTRYTNANTEDRIQQASLPLLSNTNCKKYWGTK---IKD-AMICAGA--SGVSSCMGDGGPLVCKKNGAWTVG

1SBI  HPNWTNTQ-VRSSLENTTTKLGDSEFYGKGLINVQAAAQ
1ACB  IVSWGSSST-CSTSTPGVYARVTALVNWVQOTLAAN-----

```

Figura 24: Alinhamento das seqüências de quimotripsina (1ACB) e subtilisina (1SBI); em cinza são destacados os resíduos idênticos ou de mesma natureza, e em cinza-escuro a tríade catalítica

Observando-se as estruturas sobrepostas, nota-se que os únicos resíduos que efetivamente se sobrepõem são os três do sítio catalítico, a glicina do poço de oxianion, e as duas glicinas responsáveis pelas interações não específicas com o substrato.

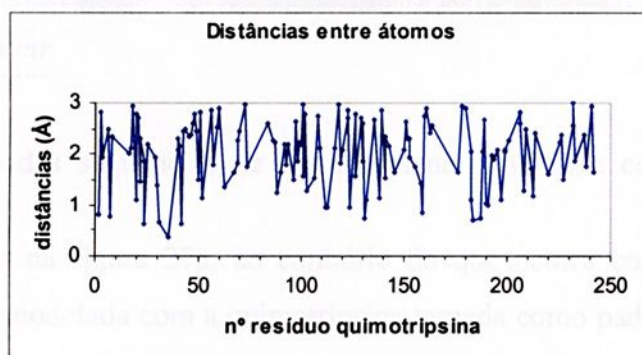


Figura 25: a) Sobreposição das estruturas da quimotripsina (cinza) e da subtilisina (azul) com os resíduos dos respectivos sítios ativos em destaque b) Gráfico mostrando a distância entre os átomos de C- α respectivos mais próximos no espaço

Neste trabalho, em que se procurou verificar o modo como inibidores interagem com serino-proteases, tendo sido escolhida como molécula padrão para estudo a serino-protease catroxase I da *Crotalus atrox* designada como Q8QHK3 na base EXPASY (bo.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?Q8QHK3) é fundamental certificar-se de que a estrutura modelada desta enzima esteja correta, o que é apenas em parte garantido pelos testes feitos com o uso dos programas WhatCheck e Verify3D, sendo ainda necessário fazer uma

comparação visual entre a estrutura modelada e outras proteases com seqüências similares, em princípio pertencentes à mesma família. Com base nesta idéia, foi efetuada a sobreposição entre as estruturas da protease modelada com a quimotripsina para se verificar se efetivamente se encontraria uma similaridade elevada entre suas estruturas; para realizar a sobreposição, efetuou-se o procedimento Rigid no programa Turbo-Frodo. Independente de qualquer outro teste, é previsível que o modelo obtido apresente alguma semelhança estrutural com as proteases da família S1, considerando-se a existência de identidade seqüencial entre as seqüências da catroxase I e das proteínas desta família, conforme apresentado na figura 26 no alinhamento entre as seqüências da catroxase I, que foi designada com o código CROT, e a quimotripsina:

```

CROT  -----IIGDECNRNEHRELALVSSDG--NCCGGLINEEWVLTAA--CEGNKMKIHLGVHKKVPNKDK
1ACB  CGVPAIQPVLSGLSR--IVNGEEAVPGSWPQVSLQDKTGFFCGGSLINENWVVTAACGVTTSDVVVAGEFDGSSSEK

CROT  QTRVAKKFFCVSSKNYTFWDKIMLIRLDRPVSNSEHIAPISLPSSPP--SVGSVCRIMGWTISPTKVILEDPVPCVN
1ACB  IQKLKIAKVEKNSKYNLSLTINNITLLKLISTAASFQTVSAVCLPSASDDFAAGTCVTTGWLTRYTNANTPDRLOAS

CROT  INLLNYSVCRAAPPEYGLPATSRITLCAGILEGGKDTCVGDGGPLIC--NG--QFQIASWGSNCGYVREFALYTKVFD
1ACB  LPLLSNTNCKKYNGTK---IKDAMICAGA--SGVSSCMGDDGGLVCKKNGAWTLVGIVSWGSSST-CSTSTEGVYARVTA

CROT  HLDWIQSIIAGNTDATCPFVNF
1ACB  LVNWWQOTLAAN-----

```

Figura 26: Alinhamento das seqüências de quimotripsina (1ACB) e catroxase (CROT)

Como pode-se ver na figura 27a, ao contrário do que ocorre com a subtilisina, a sobreposição da estrutura modelada com a quimotripsina tomada como padrão é bem precisa, praticamente não se encontrando diferenças significativas entre ambas, mesmo considerando-se que o grau de identidade seqüencial entre elas, da ordem de 29%, conforme verificado pelo programa ClustalX, pode ser considerado apenas razoável; isto é confirmado pelo gráfico em anexo, no qual pode-se ver que a maior parte das distâncias mostradas situa-se numa faixa de até 1,5 Å (figura 27b).

Dentre as diferenças que foram observadas, a maior parte envolve os laços da superfície das moléculas expostos ao solvente, devendo-se notar que no caso dos situados dentro das estruturas sendo comparadas não se observa variação, o que seria de se esperar considerando-se que em três dos laços internos estão situados os resíduos críticos para a atividade catalítica; também os resíduos situados na região responsável pelas interações não-específicas com o substrato permanecem conservados, o que indica a importância deles para a ação catalítica, ainda que não contribuam significativamente para a seletividade.

Em particular, nota-se uma diferença específica no resíduo situado no bolsão de seletividade, que na quimotripsina é uma serina, e na protease de *C. atrox* passa a ser aspartato; neste ponto em particular, a catroxase I assemelha-se mais à tripsina, cuja seletividade é mais elevada para peptídeos com aminoácidos básicos na vizinhança da ligação a ser hidrolisada.

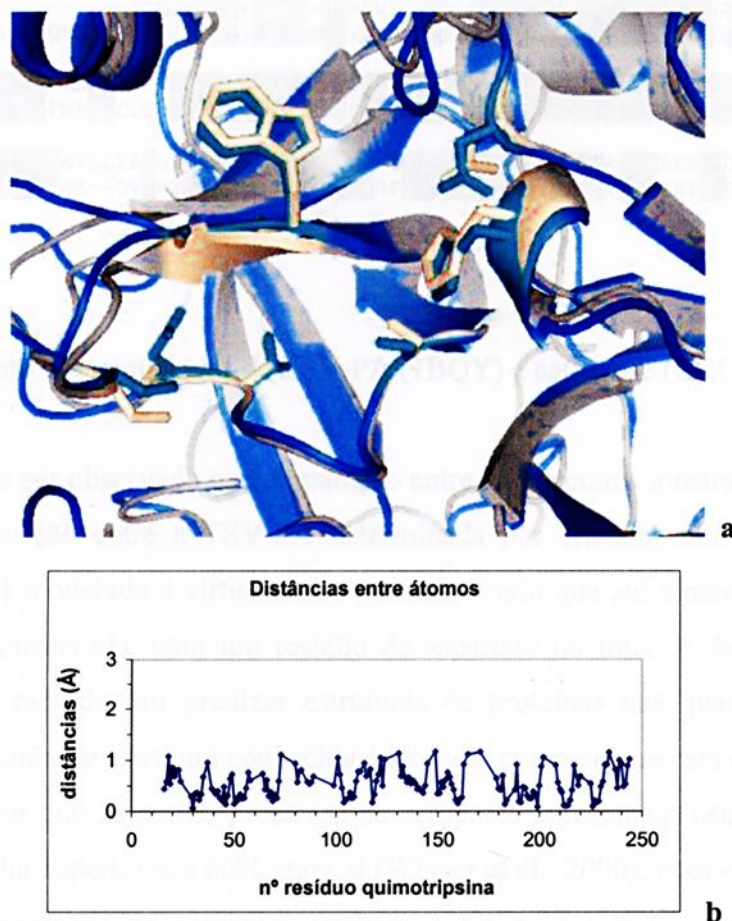


Figura 27: a) Sobreposição das estruturas da quimotripsina (cinza) e da proteína modelada (azul) com os resíduos dos respectivos sítios ativos em destaque b) Gráfico mostrando a distância entre os átomos de C- α respectivos mais próximos no espaço

Embora várias serino-proteases de serpentes sejam conhecidas, tendo sido obtidas em forma pura a partir das mais diversas espécies, somente a TSV-PA da *T. stejnegeri* teve a sua estrutura tridimensional determinada até o presente momento (PDB: 1BQY); comparando-se o alinhamento da sequência da TSV-PA com a da catroxase I (figura 28), verifica-se um alto grau de similaridade entre as respectivas sequências de resíduos. Com relação a isto, é

interessante verificar como distintos programas podem levar a resultados diferentes para um mesmo parâmetro, pois como já mostrado, o servidor Swiss-Model, ao avaliar a identidade seqüencial entre estas seqüências, indicou um valor de 72%, enquanto o programa ClustalX indicou um valor da ordem de 63%.

```

CROT  -----IIGGDECNRNEHR-FLAIVSSDGNQCGGTLINEEWVLTAA-CEGNKMKIHLGVHSK
1BQI  MELIRVLNLLILQLSYAQKSSSELVFGGDECNINEHRSLVVLFNSNGFLCGGTLINQDWVVTAA-CDSNNFQLFGVHSK

CROT  KVPNKDKQTRVAKEKFFCVSSKNYTFWDKIMLIRLDRPVSNSEHIAPLSLPSSPPSVGSGVCRIMGWTISPTKVILPDV
1BQI  KILNEDEQTRDPKEKFFCPNRKKDDEVDKIMLIKLDSSVSNSEHIAPLSLPSSPPSVGSGVCRIMGWTIPTKEIIPDV

CROT  PHCVNINLLNYSVCRAAYPEYGLPATSRITLCAGILEGGKDTGVGD-GGPLICNGQFQGIASWGSFNCGYVREPALYTKVF
1BQI  PHCANINILDHAVCRTAYSWR--QVANTITLCAGILQGGRTCHFD-GGPLICNGIFQGIIVSWGHPCCGPGEFPGVYTKVF

CROT  DHLDWIQSII
1BQI  DYLDWIKSII

```

Figura 28: Alinhamento das seqüências de TSV-PA (1BQY) e catroxase (CROT)

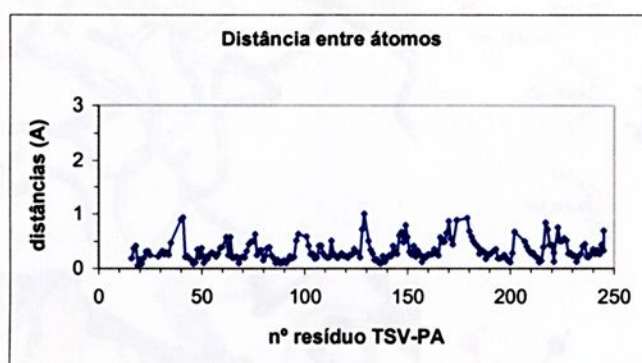
Conforme pode ser observado na comparação entre as estruturas mostradas nas figuras 29a e 29b, a sobreposição entre a TSV-PA determinada por cristalografia (código PDB: 1BQY) e a catroxase I modelada é virtualmente perfeita, sendo que até a natureza do bolsão de especificidade é conservada, com um resíduo de aspartato no interior de ambas, o que indica o poder deste método em predizer estruturas de proteínas nas quais a identidade seqüencial com um padrão de estrutura conhecida é elevada, como no caso em questão.

Considerando-se que as serino-proteases de serpentes apresentam usualmente níveis de identidade seqüencial superiores a 60% entre si (Wisner et al., 2000), pode-se em princípio esperar que outras proteases de serpentes venham a ter suas estruturas tridimensionais determinadas, sem a necessidade do elaborado procedimento cristalográfico, tendo em vista o resultado claramente favorável obtido neste trabalho.

Tendo-se certificado da validade da estrutura modelada, passou-se à etapa de inclusão dos inibidores de serino-proteases à molécula. Observando-se o conjunto de estruturas modeladas da protease com cada um dos dois inibidores que não contem flúor, mostradas nas figuras 30a-b, nota-se que não há um padrão específico das interações polares ou hidrofóbicas entre o inibidor e a proteína. Já as figuras 31a-b demonstram que, para os inibidores fluorados, após o processo de minimização de energia surge uma ligação química entre o inibidor e a hidroxila do resíduo de serina 186 do sítio ativo, conforme já esperado considerando-se as estruturas obtidas por difração de raios X para outras serino-proteases complexadas com inibidores deste tipo.



a



b

Figura 29: a) Sobreposição das estruturas da TSV-PA (cinza) e da proteína modelada (azul) com os resíduos dos respectivos sítios ativos em destaque b) Gráfico mostrando a distância entre os átomos de C- α respectivos mais próximos no espaço

Independente do modo como ocorre a ligação, nota-se de um modo geral que todos os inibidores ao se ligarem ao modelo posicionam-se entre o laço que contém o Asp 189 responsável pela seletividade e o laço contendo os resíduos responsáveis pelas ligações não-seletivas com o substrato, com a exceção do PMSF, que ao se ligar ao resíduo de serina projeta-se na direção da superfície da molécula modelada. A localização dos inibidores nesta exata posição aparentemente é um efeito basicamente devido a interações hidrofóbicas, sendo as interações polares essencialmente responsáveis por manter os resíduos ligados à proteína, ao menos nos casos dos inibidores sem flúor. Uma vez tendo-se assim posicionado, mesmo os inibidores que não se ligam covalentemente ao resíduo de serina tornam impossível a

aproximação de um substrato ao sítio catalítico. Em resumo, o modo da ação dos inibidores é portanto claramente distinto nos casos acima, sendo que para os que contem grupamentos amidino ou amino, as interações de natureza polar ou hidrofóbica com a região do bolsão de seletividade podem em princípio serem revertidas, o que não acontece com os inibidores que reagem com o resíduo de serina, em que a ligação formada, do tipo S-O ou P-O é normalmente bem estável.

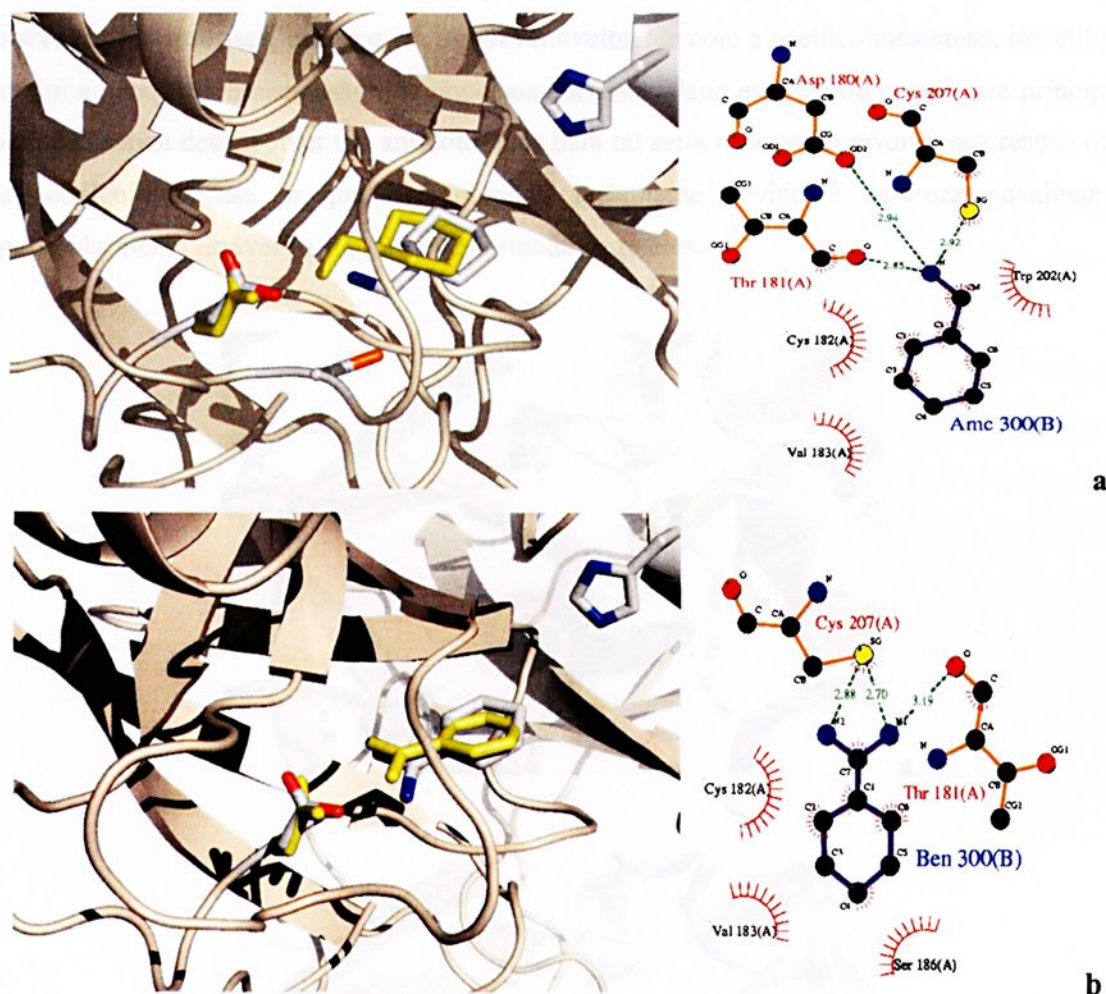


Figura 30: Diagramas mostrando o sítio ativo da catroxase I complexada com - a) aminometilciclo-hexano e b) benzamidina, com os respectivos gráficos representando as interações existentes, obtidos mediante o programa Ligplot, à direita

Embora existam diversos inibidores capazes de se ligar quimicamente a proteínas diversas, e não somente às proteases, a maioria das substâncias testadas para uso como

medicamentos atuam mediante interações não-covalentes. O desenvolvimento de inibidores que interagem com as enzimas sem envolver reações químicas é certamente preferível, devido ao fato de que é usualmente mais difícil produzir substâncias que reajam de maneira altamente seletiva com um único grupo funcional de uma dada molécula, ainda mais considerando-se a grande complexidade química encontrada nos seres vivos.

Um exemplo disto é o inibidor DFP, considerado como altamente tóxico assim como o PMSF (Wilson e Walker, 1974, Fahrney e Gold, 1963), não propriamente devido a sua ação sobre serino-proteases, mas por reagir irreversivelmente com a acetilcolinesterase, impedindo assim a adequada transmissão dos impulsos nervosos, dano este contra o qual, em princípio, não é possível desenvolver um antídoto, pois para tal seria necessário reverter sua reação com a acetilcolinesterase, o que é impossível justamente devido à natureza covalente e particularmente estável da ligação P-O formada entre eles.

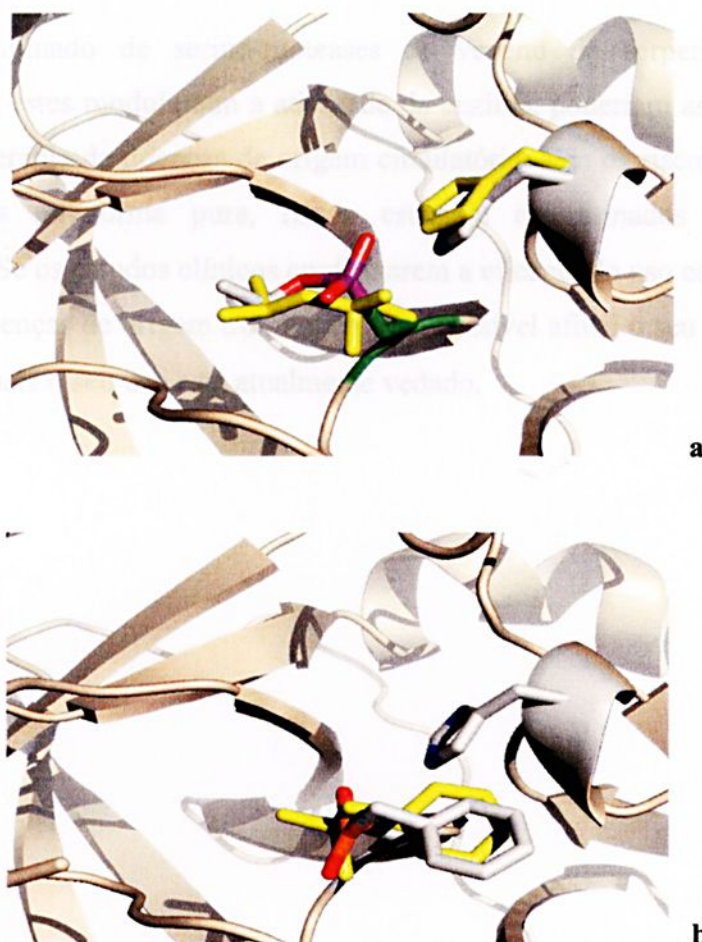


Figura 31: Diagramas mostrando o sítio ativo da catroxase I quimicamente tratada com - a) diisopropilfluorofosfato (DFP) e b) fenilmetilfluorosulfonato (PMSF)

É importante salientar ainda que, além deste problema, por ocorrer em princípio irreversivelmente com qualquer serino-protease, a ação destes inibidores não pode ser facilmente anulada, caso dê início a reações colaterais indesejáveis, o que não ocorre no caso dos inibidores reversíveis, cuja atividade por sua própria natureza ocorre somente por um tempo limitado; a importância deste fator não deve ser desconsiderada, se for considerado o fato de que seu uso muitas vezes ocorre em cirurgias, nas quais o organismo do paciente já se encontra debilitado, e em que uma possível hemorragia fora de controle pode vir a ser extremamente perigosa.

O interesse em inibidores irreversíveis, restrito mais ao uso na quimioterapia de infecções, na qual seu efeito prolongado acaba por ser benéfico, demonstra portanto ser de pouca relevância no tratamento de problemas circulatórios, tendo sido incluído no estudo de modelagem apenas para fins de comparação entre o seu modo de ação e o dos inibidores reversíveis.

O uso combinado de serino-proteases de veneno de serpente com inibidores reversíveis, no qual estes modulariam a atividade da enzima, poderiam assim representar um grande avanço na terapia de doenças de origem circulatória, sem os riscos associados ao uso de serino-proteases na forma pura, riscos estes já determinados experimentalmente (Verstraete, 1977). Se os estudos clínicos confirmarem a eficácia do uso combinado de drogas no tratamento de doenças de origem trombótica, será possível afinal o seu uso em cirurgias de grande porte, nas quais o seu uso está atualmente vedado.



VII – CONCLUSÃO

Neste trabalho conseguiu-se efetuar a purificação de serino-proteases de *C. d. terificus* e *L. muta muta*, bem como determinar a faixa de estabilidade destas proteases por meio de medidas de espalhamento dinâmico de luz.

Em paralelo, foi realizada a modelagem da estrutura tridimensional de crotaxase da serpente *C. atrox*, por meio do programa Swiss-Model. Na estrutura modelada foi feito o “docking” de inibidores, seguido de um procedimento de minimização de energia de modo a determinar como estes compostos interagem com a serino-protease.

- Alvarado, J., Llorca, B., Benito, C., Gasc, J.-L., Muz, R. *Rev. Biol. Trop.* 1988, 36:563-65.
- Balek, J. J., Mock, D. R., Lewis, G. D., Clappell, A. P., Young, A. B., Forbes, C. D., Pringle, C. B. Subcutaneous tunnel as protection of deep vein thrombosis after hip replacement surgery. *Thromb. Res* 1993, 72:21-31.
- Bergers, T. Protein crystallization. Techniques, strategies and tips. International University Line, 1995.
- Bow, D. *Microscopic analysis*. Nature 1976, 263:299-304.
- Bridg, W. A., Fisher, E. Natural protein protease inhibitors and their interaction with enzymes. *Eur. J. Biochem.* 1992, 204(2):433-44.
- Burkhardt-Rugg, R. K. B. Transformações estruturais e função de fosfolipase. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2001.
- Burkhardt-Rugg, R. K. B., Macchiani, M. T., Watanabe, L., Soares, A. M., Avel, E. R. Purification, characterization and crystallization of Iannocardin-I, a fibrinogen-cleaving enzyme isolated from the venom of *Bothrops asper*. *Toxicon* 2002, 40(9):1307-12.
- Goodell, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72:248-54.
- Grandon, C., & Tesson, J. Introduction to protein structure. Garland Publishing Inc., 1991.
- Grand, S., Durieux, H. F., Ben, C., Wessier, A. The elastase utilized by the plasminogen activator from the snake *Trimeresurus alpegeti* to escape zarpain. *Biochemistry* 2002, 41(26):8478-84.
- Creighton, T. Proteins Structures and molecular properties. W. H. Freeman, 1993.

REFERÊNCIAS

- Agard, D. A., Bone, R., Silen, J. L. Structural plasticity broadens the specificity of an engineered protease. *Nature* 1989, 339:191-5.
- Aires, M. M. *Fisiologia*. 2 ed. Guanabara Koogan, 1999.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 1990, 215(3):403-10.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J. Miller, W., Lipman, D. J. Gapped Blast and Psi-Blast: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acid Res.* 1997, 25(17): 3389-402.
- Alvarado, J., Lomonte, B., Bonilla, C., Gene, J. A., Mata, E. *Rev. Biol. Trop.* 1988, 36:563-65.
- Belch, J. J., Meek, D. R., Lowe, G. D., Campbell, A. F., Young, A. B., Forbes, C. D., Prentice, C. R. Subcutaneous ancrod in prevention of deep vein thrombosis after hip replacement surgery. *Thromb. Res.* 1982, 25(1-2):23-31.
- Bergfors, T. Protein crystallization: Techniques, strategies and tips. International University Line, 1999.
- Blow, D. More on the catalytic triad. *Nature* 1990, 343(6260):694-5.
- Bode, W & Huber, R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur. J. Biochem.* 1992, 204(2), 433-51.
- Bortoleto-Bugs, R. K. B. Transformações estruturais e função de fosfolipase. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2001.
- Bortoleto-Bugs, R. K. B., Murakami, M. T., Watanabe, L., Soares, A. M., Arni, R. K. Purification, characterization and crystallization of Jararacussin-I, a fibrinogen-clotting enzyme isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. *Toxicon* 2002, 40(9):1307-12.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72: 248-54.
- Branden, C. e Tooze, J. Introduction to protein structure. Garland Publishing Inc., 1991.
- Braud, S., Bonniec, B. F., Bom, C., Wisner, A. The stratagem utilized by the plasminogen activator from the snake *Trimeresurus stejnegeri* to escape serpins. *Biochemistry* 2002, 41(26):8478-84.
- Creighton, T. Proteins. Structures and molecular properties. W. H. Freeman, 1993.

- Dayhoff, M. O., Schwartz, R., Orcutt, B. Atlas of Protein Sequence and Structure vol.5 pp. 345-52.
- Deutscher, M. Methods in enzymology vol. 182. Academic Press Inc, 1990.
- Ducruix, A. e Giege, R. Crystallization of nucleic acids and proteins. A practical approach. IRL Press, Oxford, 1992.
- Dunbrack, R. L. e Karplus, M. Backbone-dependent rotamer library for proteins. Application to side-chain prediction. J. Mol. Biol. 1993, 230(2):543-74.
- Engh, R. A., Brandstetter, H., Sucher, G., Eichinger, A., Baumann, U., Bode, W., Huber, R., Poll, T., Rudolph, R., von der Saal W. Enzyme flexibility, solvent and 'weak' interactions characterize thrombin-ligand interactions: implications for drug design. Structure 1996, 4(11):1353-62.
- Engh, R.A., Huber, R., Bode, W., Schulze, A.J. Divining the serpin inhibition mechanism: a suicide substrate 'spring'? Trends Biotechnol. 1995, 13(12):502-10.
- Erlanger, B.F., Kokowsky, N., Cohen, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Arch. Biochem. Bioph. 1961, 95:271-8.
- Fahrney, D. e Gold, A. M. Sulfonyl fluorides as inhibitors of esterases. Rates of reaction with acetylcholinesterase, α -Chymotrypsin and trypsin. J. Am. Chem. Soc. 1963, 85:996-1000.
- Fersht, A. Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding. 3 ed. W. H. Freeman & Company, 1999.
- Franssen, J.H., Janssen-Claessen, T., van Dieijen, G. Biochim. Purification and properties of an activating enzyme of blood clotting factor X from the venom of Cerastes cerastes. Biophys. Acta 1983, 747(1-2):186- 90.
- Furie, B. C. e Furie, B. Methods in enzymology, vol. 45, pp. 191-205. Academic Press Inc., 1976.
- Gregory, R. B. Protein-solvent interactions. Marcel Dekker Inc., 1995.
- Gribskov, M., McLachlan, A.D., Eisenberg, D. Profile analysis: detection of distantly related proteins. Proc. Nat. Acad. Sci 1987, 84(13):4335-58.
- Hames, B. D. e Rickwood, D. Gel electrophoresis of proteins: a practical approach. Oxford University Press, 1990.
- Harvey, A. L. Snake toxins. in International encyclopedia of pharmacology and therapeutics. Pergamon Press Inc., 1991.
- Henikoff, S. and Henikoff, J. G. Amino acid substitution matrices from protein blocks. Proc. Nat. Acad. Sci USA 1992, 89:10915-9.



- Heukeshoven, J. and Dernick, R. Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. Electrophoresis 1988, 9(1):28-32.
- Higgins, D., Thompson, J., Gibson, T., Thompson J. D., Higgins, D. e Gibson T. J. ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 1994, 22:4673-80.
- Holbrook, J.J., Wilks, H. M., Hart, K. W., Feeney, R., Dunn, C. R., Muirhead, H., Chia, W. N., Barstow, D. A., Atkinson, T., Clarke, A.R. A specific, highly active malate dehydrogenase by redesign of a lactate dehydrogenase framework. Science 1988, 242:1541-4.
- Huang, Q. Q., Teng, M. K. e Niu, L. W. Protein crystallization with a combination of hard and soft precipitants. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 1999, 55(8):1444-8.
- Hutton, R. A. e Warrell, D. A. Action of snake venom components on the haemostatic system. Blood Rev. 1993, 7(3):176-89.
- Jancarik, J. e Kim, S. H. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. J. Appl. Cryst. 1991, 24:409-11.
- Jones, T. A. e Thirup, S. Using known substructures in protein model building and crystallography. EMBO J. 1986, 5(4):819-22.
- Kisiel, W. e Canfield, W. M. Methods in enzymology, vol. 80(C), pp. 272-85. Academic Press Inc., 1981.
- Koh, Y. S., Chung, K. H., Kim, D.S. Biochemical characterization of a thrombin like enzyme and fibrinolytic serine protease from snake venom Toxicon 2001, 39(4):555-60.
- Kurinov, I. V. e Harrison, R. W. Prediction of new serine proteinase inhibitors. Nat. Struct. Biol. 1994, 1(10):735-43.
- Kurinov, I. V. e Harrison, R. W. Two crystal structures of the leupeptin-trypsin complex. Protein Sci. 1996, 5(4):752-8.
- Laemmli, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970, 227:680.
- Latallo, Z. S. Retrospective study on complications and adverse effects of treatment with thrombin-like enzymes - a multicentre trial. Thromb. Haemost. 1983, 50(2):604-9.
- Leach, A. Molecular Modelling: Principles and Applications. Prentice-Hall inc., 2001.
- Locht, A. van de, Bode, W., Huber, R., le Bonniec, B. F., Stone, S. R., Esmon, C. T. Stubbs, M.T. The thrombin E192Q-BPTI complex reveals gross structural rearrangements:

- implications for the interaction with antithrombin and thrombomodulin. *EMBO J.* 1997, 16(11):2297-84.
- Lüthy, R. Bowie, J. U., Eisenberg, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature* 1992, 356:83-5.
- Majeed, S., Olek, G., Belachew, A., Huang, C. C., Zhou, T., Kwong, P. D. Enhancing protein crystalization through precipitant synergy. *Structure* 2003, 11:1061-70.
- March, J. e Smith, M. B. *March's advanced organic chemistry: reactions, mechanisms, and structure.* 5 ed. Wiley Interscience, 2001.
- Markland, F. S. Rattlesnake venom enzymes that interact with components of the hemostatic system. *J. Toxicol. Toxin Rev.* 1983, 2:119-60.
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Storoni, L. C. e Read, R. J. Likelihood-enhanced fast translation functions. *Acta Cryst. D* 2005, 61:458-64.
- McPherson, A. *Crystallization of macromolecules.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.
- McRee, D. E. *Practical protein crystallography.* 2 ed. Academic Press, San Diego, 1999.
- Meier, J. and Stocker, K. Modification of the toxicity of *Bothrops atrox* poison by interventions in the coagulation and kallikrein system of prey. *Folia Haematol.* 1984, 111(6):877-82.
- Miller, S., Janin, J., Lesk, A. e Chothia, C. Interior and surface of monomeric surfaces. *J. Mol. Biol.* 1987, 196(3):641-56.
- Mosimann, S., Meleshko, R., James, M. N. A critical assessment of comparative molecular modeling of tertiary structures of proteins. *Proteins* 1995, 23(3):301-17.
- Moult, J., Zemla, A., Venclovas, C., Fidelis, K. Processing and analysis of CASP3 protein structure predictions. *Proteins* 1999, Suppl. 3:22-9.
- Navaza, J. *Acta Crystallogr. A* 1994, 50:157-63.
- Needleman, S. B. and Wunsch, C. D. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.* 1970, 48(3): 443-53
- Niewiarowski, S., Kirby, E. P, Brudzynski, T. M., Stocker, K. Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom. 1. Purification and characterization of the enzyme. *Biochemistry* 1979, 18(16):3570-7.
- Orengo, C. A. Flores, T. P., Jones, D. T., Taylor, W. R., Thornton, J. M. Recurring structural motifs in proteins with different functions. *Curr Biol.* 1993, 3(3):131-9.

- O'Sullivan, O., Suhre, K., Abergel, C., Higgins, D. e Notredame, C. 3DCoffee: Combining Protein Sequences and Structures within Multiple Sequence Alignments. *Journal of Molecular Biology* 2004, 340:385-95.
- Otwinowski, Z. e Minor, W. *Methods in enzymology* vol. 276. Academic Press Inc, 1997.
- Owyang, C. e Huang, T. Alpha and beta-fibrinogenases from *Trimeresurus gramineus* snake venom. *Biochim. Biophys. Acta* 1979, 571(2):270-83.
- Parry, M. A., Jacob, U., Huber, R., Wisner, A., Bon, C., Bode, W. The crystal structure of the novel snake venom plasminogen activator TSV-PA: a prototype structure for snake venom serine proteinases. *Structure*. 1998 Sep 15;6(9):1195-206.
- Peitsch, M. C. About the use of protein models. *Bioinformatics* 2002, 18(7):934-8.
- Peitsch, M. C. Protein modelling for all. *Trends Biochem. Sci.* 1999, 24:364-7.
- Peitsch, M. C., Schwede, T., Kopp, J., Guex, N. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modelling server. *Nucl. Acids Res.* 2003, 31(13):3381-5
- Perona, J. J. e Craik, C. S. J. Evolutionary divergence of substrate specificity within the chymotrypsin-like serine protease fold. *Biol. Chem.* 1997, 272(48):29987-90.
- Pitney, W. R. e Regoeczi, E. Inactivation of Arvin by plasma proteins. *Br. J. Haematol.* 1970, 19(1):67-81.
- Pollak, V. E., Glueck, H. I., Weiss, M. A., Lebron-Berges, A., Miller, M. A. Defibrination with ancrod in glomerulonephritis: effects on clinical and histologic findings and on blood coagulation. *Am. J. Nephrol.* 1982, 2(4):195-207.
- Ponder, W. L. e Richards, F. M. Tertiary templates for proteins. Use of packing criteria in the enumeration of allowed sequences for different structural classes. *J. Mol. Biol.* 1987, 193(4):775-91.
- Rawlings, N. D. e Barrett, A. J. Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.* 1993, 290:205-218.
- Rawlings, N. D. e Barrett, A. J. Families of serine peptidases. *Methods Enzymol.* 1994, 244:19-61.
- Robyt, J. F. e White, B. J. *Biochemical techniques: theory and practice*. Waveland Press Inc., 1987.
- Rupp, B. Maximum-likelihood crystallization. *J. Struct. Biol.* 2003, 142:162-9.
- Rutter, W. J., Hedstrom, L., Szilagyi, L. Converting trypsin to chymotrypsin: the role of surface loops. *Science* 1992, 255:1249-53.
- Rutter, W. J., Hedstrom, L., Farr-Jones, S., Kettner, C. A. Exogenous acetate reconstitutes the enzymatic activity of trypsin Asp189Ser. *Biochemistry* 1994, 33:8757-63.



- Sali, A. Modeling mutations and homologous proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1995, 6(4):437-51.
- Sali, A. e Blundell, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 1993, 234(3):779-815.
- Salyers, A. K., Szalony, J. A., Suleymanov, O. D., Parlow, J. J., Wood, R. S., South, M. S., Nicholson, N. S. Assessment of bleeding propensity in non-human primates by combination of selective tissue factor/VIIa inhibition and aspirin compared to warfarin and aspirin treatment. *Pharmacology* 2004, 70(2):100-6.
- Schechter, I. e Berger, A. On the size of active site in proteases. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 1967, 27:157-62.
- Scheraga, H. A. and Go, N. Ring closure and local conformational deformations of chain molecules. *Macromolecules* 1970, 3(2):178-87.
- Schmaier, A. H., Smith, P. M., Purdon, A. D., White, J. G., Colman, R. W. High molecular weight kininogen: localization in the unstimulated and activated platelet and activation by a platelet calpain(s). *Blood* 1986, 67(1):119-30.
- Schuttelkopf, A. W. e Aalten, D. M. F. PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2004, 60(8):1355-63.
- Scopes, R. Protein purification. 3 ed. Springer-Verlag, 1994.
- Sichler, K., Hopfner, K. P., Kopetzki, E., Huber, R., Bode, W., Brandstetter, H. The influence of residue 190 in the S1 site of trypsin-like serine proteases on substrate selectivity is universally conserved. *FEBS Lett.* 2002, 530(1-3):220-4.
- Silverstein, M. The determination of human plasminogen using N-CBZ-lysine p-nitrophenyl ester as substrate. *Anal. Biochem* 1975, 65:500-6.
- Smith, T. F. e Waterman, M.S. Identification of common molecular subsequences. *J. Mol. Biol.* 1981, 147(1): 195-7.
- Stocker, K. Medical Use of Snake Venom Proteins. CRC Press, 1990.
- Stryer, L. Bioquímica. 4 ed. Editora Guanabara Koogan, 1996.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.* 1997, 25:4876-82.
- Turgeon, V. e Houenou, L. J. The role of thrombin-like (serine) proteases in the development, plasticity and pathology of the nervous system. *Brain Res. Rev.* 1997, 25(1):85-95.
- Vagin, A. MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Cryst.* 1997, 30:1022-5.

- Vakser, I. A., Well, C. A., Tovchigrechko, A. Docking of protein models. *Protein Sci.* 2002, 11(8):1888-96.
- Vasquez, M. Modelling sidechain conformation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1996, 6:217-21.
- Verstraete, M. Haemostatic drugs. Martinus Nijhoff Medical, 1977.
- Voet, D. e Voet, J. Fundamentals of biochemistry. Wiley-Interscience, 2001.
- Vriend, G. WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J. Mol. Graph.* 1990, 8(1):52-6.
- Whitlow, M., Arnaiz, D. O., Buckman, B. O., Davey, D. D., Griedel, B., Guilford, W. J., Koovakkat, S. K., Liang, A., Mohan, R., Phillips, G. B., Seto, M., Shaw, K. J., Xu, W., Zhao, Z., Light, D. R., Morrissey, M. M. Crystallographic analysis of potent and selective factor Xa inhibitors complexed to bovine trypsin. *Acta Crystallogr. D* 1999, 55(8):1395-404.
- Wilmot, C. M. e Thornton, J. M. Analysis and prediction of the different types of beta-turn in proteins. *J. Mol. Biol.* 1988, 203(1):221-32.
- Wilson, B. W. e Walker, C. R. Regulation of newly synthesized acetylcholinesterase in muscle cultures treated with diisopropylfluorophosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1974, 71(8):3194-8
- Wisner, A., Braud, S, Bon, C. Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie* 2000, 82(9-10):851-9.
- Yousef, G. M., Elliott, M. B., Kopolovic, A. D., Serry, E., Diamandis, E. P. Sequence and evolutionary analysis of the human trypsin subfamily of serine peptidases. *Biochim. Biophys. Acta* 2004, 1698(1):77-86.
- Zhang, Y., Gao, R., Lee, W. H., Zhu, S. W., Xiong, Y. L., Wang, W. Y. Characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from *Trimeresurus stejnegeri* venom, and comparative study with other venom proteases. *Toxicon* 1998, 36(1):131-42.



CURRICULUM VITAE

- Formação Acadêmica:

Graduação: Química Industrial - Universidade Federal do Paraná-UFPR

Período: 1987-1990

Mestrado em Química Orgânica: Universidade de São Paulo - USP

Período: 1991-1993

Doutorado em Biofísica: Universidade Estadual Paulista -UNESP

Período: 2003-2005

- Artigos:

Publicados:

S.P. Zela, M.F.Fernandes Pedrosa, M.T. Murakami, S.A. de Andrade, R.K. Arni e D.V. Tambourgi. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of Smase I, a shingomyelinase from *Loxosceles laeta* spider venom. Acta Cryst. 2004, D60:1112-1114.

M. T. Murakami, L.M. Gava, S.P. Zela, E.Z. Arruda, P.A. Melo, J.M. Gutierrez, R.K. Arni. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of suramin, a highly charged polysulfonated naphthylurea, complexed with a myotoxic PLA2 from *Bothrops asper*. Biochim. Biophys. Acta 2004, 1703:83-85.

M. T. Murakami, L. Watanabe, L. M. Gava, S.P.Zela, A.C.O. Cintra e R.K.Arni. Initial structural analysis of an a4b4 C-type lectin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. Acta Cryst. 2003, D59:1813-1815.

M. T. Murakami, S.P.Zela, L. M. Gava, S. Michelin-Duarte, A.C.O. Cintra e R.K.Arni. Crystal structure of the platelet activator convulxin, a disulfide-linked cyclic tetramer from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. BBRC 2003, 310:478-482.

Submetido

M. T. Murakami, M.F.Fernandes-Pedrosa, S.A Andrade, S.P. Zela, C. Betzel, D.V. Tambourgi e R.K. Arni. Molecular modelling and structural classification of *Loxosceles* sphingomyelinase D. Biochemistry 2005.



