

RESULTADOS

ESTUDOS BIOLÓGICOS

EXTRAÇÃO DAS GLÂNDULAS DE PEÇONHA

Após sua rápida extração, as glândulas de peçonha estavam praticamente livres de tecido conjuntivo ou muscular, tendo sido muito bem limpas, o que facilitou o processo de homogeneização. Em média, cada glândula pesou 250 mg.

OBTENÇÃO DO RNA TOTAL

Uma das glândulas teve seu RNA total extraído, rendendo aproximadamente 400 µg de RNA total em 100 µl de solução. A relação entre as absorbâncias da solução a 260 e a 280 nm, próxima a 2, revelou seu alto grau de pureza.

10 µl da solução foram aplicados num gel de agarose a 1% com formaldeído para RNA, que permitiu a verificação da eficiência técnica de extração pelo aparecimento das bandas correspondentes ao RNA ribossômico 28S, 18S e 5S, como mostrado na Figura 28.

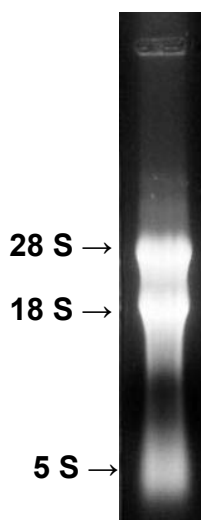


FIGURA 28 – Amostra de RNA total extraída da glândula de peçonha de uma serpente macho, adulta e saudável da espécie *Bothrops alternatus* aplicada em gel de agarose a 1% com formaldeído.

SÍNTESE E AMPLIFICAÇÃO INICIAL DO cDNA CODIFICANTE DA BthaTL

A Reação em Cadeia da Polimerase associada à ação da enzima Transcriptase Reversa possibilitou o cumprimento de três passos importantes:

- ▶ Produção de fitas sense do cDNA de interesse a partir do anelamento do primer Oligo (dT) na cauda poli(A) do RNA mensageiro correspondente e da atividade 5'→3' da transcriptase reversa;
- ▶ Síntese da dupla fita do cDNA de interesse em decorrência do anelamento do primer antisense e da atividade 5'→3' da *Taq* DNA polimerase;
- ▶ Amplificação das moléculas do cDNA a partir do anelamento dos primers Forward (sense) e 3'UTR Reverse (antisense) em suas fitas correspondentes e da atividade 5'→3' da *Taq* DNA polimerase, preenchendo as seqüências até completar novas duplas fitas.

Aplicado num gel de agarose a 1% para DNA, o produto do RT-PCR apareceu com o tamanho esperado de 800 pb, conforme mostrado na figura abaixo:

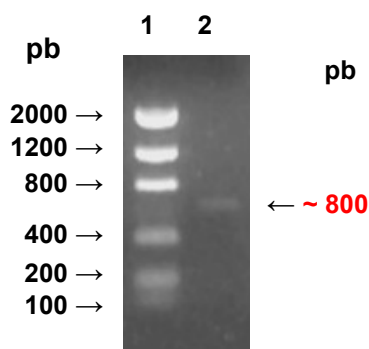


FIGURA 29 – Análise do produto da RT-PCR em gel de agarose a 1% para DNA: 1) Marcador de massa molecular para DNA (Low DNA MassTM Ladder); 2) Produto da reação.

A quantificação, pelo programa Kodak Digital Science 1D, da banda de cDNA obtida revelou uma concentração de 23 ng/μl, considerada baixa para os procedimentos de clonagem. Então, o cDNA foi reamplificado por meio de uma PCR.

REAMPLIFICAÇÃO DO cDNA DE INTERESSE POR PCR

A reação de PCR, utilizando os primers Forward e 3'UTR Reverse, resultou numa banda de cDNA cuja concentração (120 ng/μl) foi considerada suficiente para a clonagem quando analisada em gel de agarose a 1% para DNA (Figura 30).

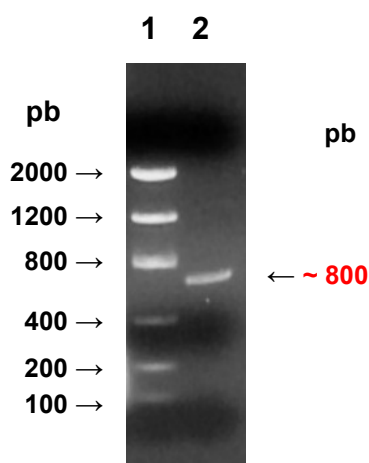


FIGURA 30 – Análise do produto da PCR em gel de agarose a 1% para DNA: 1) Marcador de massa molecular para DNA (Low DNA MassTM Ladder); 2) Produto da reamplificação do cDNA.

LIGAÇÃO DO INSERTO NO VETOR DE CLONAGEM E TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES

O inserto adicionado de uma desoxiadenosina livre na extremidade 3' foi ligado ao plasmídeo pGEM® -T Easy com a enzima T4 DNA ligase na presença de ATP, sem a necessidade do uso de enzimas de restrição, produzindo o DNA recombinante que foi utilizado para a transformação de bactérias da linhagem DH5-α de *E. coli*, visando a amplificação clonal.

Os clones positivos foram primariamente identificados pela resistência ao antibiótico ampicilina (50 mg/ml), e aquelas colônias repicadas em placas com

ampicilina, IPTG e X-gal que cresceram com a coloração branca foram consideradas potencialmente transformadas com o cDNA de interesse.

Uma colônia branca foi selecionada para a realização da análise de restrição. Aplicada num gel de agarose a 1% para DNA (Figura 31), a amostra escolhida apresentou as duas bandas esperadas: uma com aproximadamente 3015 pb, correspondente ao plasmídeo pGEM®T-Easy, e outra com cerca de 800 pb, correspondente ao cDNA de interesse.

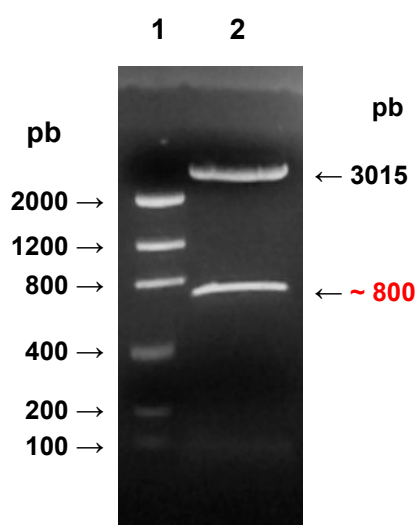


FIGURA 31 – Análise de restrição de uma colônia transformada: 1) Marcador de massa molecular para DNA (Low DNA MassTM Ladder); 2) Produto da análise de restrição da colônia selecionada.

SUBCLONAGEM NO VETOR DE EXPRESSÃO E TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES

A ligação do inserto retirado do vetor de clonagem pGEM®T-Easy ao vetor de expressão pET-28a originou o plasmídeo recombinante pBthaTL, utilizado na transformação de células competentes da linhagem DH5- α e, posteriormente à amplificação clonal inicial, da linhagem BL21(DE3) de *E. coli*.

Algumas colônias de bactérias da linhagem BL21(DE3) transformadas com o vetor recombinante pBthaTL e crescidas em meio seletivo contendo canamicina (30 mg/ml) foram submetidas à análise de restrição (Figura 32), revelando num gel de agarose a 1% para DNA as duas bandas correspondentes ao vetor de expressão pET-28a (cerca de 5369 pb) e ao inserto (aproximadamente 800 pb). O DNA plasmidial extraído da colônia 2 (Figura 32, amostra número 3) foi submetido a seqüenciamento.

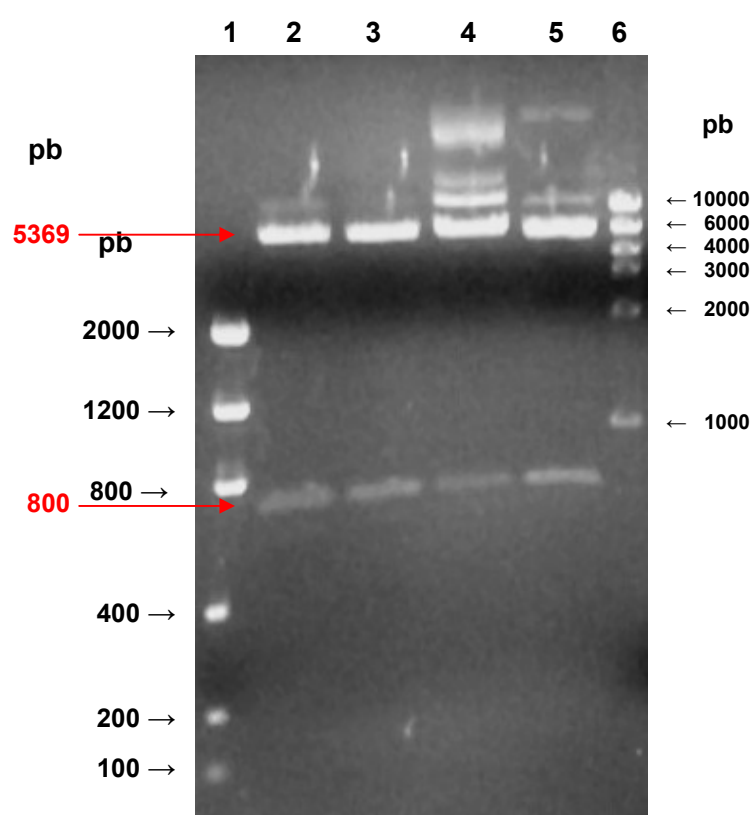


FIGURA 32 – Análise de restrição de colônias da linhagem BL21(DE3) de *E. coli* transformadas com o vetor recombinante pBthaTL. 1) Marcador de massa molecular para DNA (Low DNA MassTM Ladder); 2, 3, 4 e 5) Produtos da análise de restrição das quatro colônias selecionadas; 6) Marcador de massa molecular para DNA (High DNA MassTM Ladder).

SEQÜENCIAMENTO DO INSERTO LIGADO AO VETOR pET-28a

```

1  gttaggcccc gttgggatct ctcccatatg gtcgacctgc aggcggccgc gaattcacta
1  ttaagaagga gatataccAT GGGCAGCAGC CATCATCATC ATCATCACAG CAGCGGCCCTG
61  ttaagaagga gatataccAT GGGCAGCAGC CATCATCATC ATCATCACAG CAGCGGCCCTG
15  V P R G S H M A S M T G G Q Q M G R G S
121 GTGCCGCGCG GCAGCCATAT GGCTAGCATG ACTGGTGGAC AGCAAATGGG TCGCGGATCC
35  V I G G D E C D I N E H R F L A F L Y P
181 GTGATTGGGG GGGATGAATG CGACATAAAT GAACATCGTT TCCTTGCATT CCTGTACCCT
55  G R F F C S G T L I N Q E W V L T V A H
241 GGCAGGTTTT TCTGTAGTGG GACTTTGATC AACCAGGAAT GGGTGCTGAC CGTTGCACAC
75  C D T I S M R I Y L G L H T R S V P N D
301 TGCGACACGA TATCTATGCG CATATACCTT GGTCTGCATA CCCGAAGTGT ACCAAATGAT
95  D E E I R Y P M E K F K C P N R K R S Y
361 GATGAGGAGA TAAGATACCC AATGGAGAAA TTCAAATGTC CCAATAGGAA AAGAAGTTAC
115 I K D K I M L I R L N R P V N D S P H
421 ATAAAAGACA AGGACATCAT GTTGATCAGG CTGAACAGAC CTGTTAACGA CAGTCCACAC
135 I A P L S L P S N P P S V G S V C H V M
481 ATCGCGCCTC TCAGCTTGCC TTCCAACCCT CCCAGTGTGG GCTCAGTTTG CCATGTTATG
155 G W G T T S P S K A T Y P D V P H C A N
541 GGATGGGGCA CAACCTCACC TTCTAAAGCG ACTTATCCCG ATGTCCCTCA TTGTGCTAAC
175 I N L V N D T M C H G A Y N G L P V T S
601 ATTAACCTGG TCAATGATAC GATGTGTCAT GGAGCTTACA ATGGGTTGCC GGTGACAAGC
195 R K F C A G V L Q G G I D T C V G D S G
661 AGAAAATTCT GTGCAGGTGT CCTGCAAGGA GGCATAGATA CATGTGTGGG TGACTCTGGG
215 G P L I C N G Q F Q G I V S W G G K V C
721 GGACCCCTCA TCTGTAATGG ACAATTCCAG GGCATTGTAT CTTGGGGAGG TAAAGTCTGT
235 A R L P R P A L Y T K V F E Y L P W I Q
781 GCCCGACTGC CGGTCCTGC CCTCTACACC AAGGTCTTTG AATATCTTCC CTGGATCCAG
255 S I I A G N T T A T C P L &
841 AGCATTATTG CAGGAAATAC AACTGCGACT TGCCCCCTGT GAaaaactttt gaaaaag

```

FIGURA 33 – Seqüenciamento do inserto no plasmídeo pBthaTL. ■ Nucleotídeos; ■ códon de iniciação da tradução, ■ códon de terminação da tradução; ■ peptídeo sinal; ■ Metionina iniciadora; ■ Cauda de poli-histidinas; ■ Sítio de clivagem pela trombina; ■ seqüência de resíduos de aminoácidos deduzida para o inserto; ■ resíduos de aminoácidos integrantes da tríade catalítica característica das serinopeptidases.

As seqüências obtidas para o inserto clonado no vetor pGEM®T-Easy (dados não mostrados) e no vetor pET-28a (Figura 33) coincidiram, exceto pela presença adicional do peptídeo de fusão no seqüenciamento do vetor pBthaTL.

A ligação do inserto ao vetor pET-28a ocorreu na fase correta de leitura, sendo que o N-terminal da proteína é idêntico àquele utilizado como molde no desenho do primer forward, aparecendo em seguida ao peptídeo de fusão.

A concordância nas duas seqüências obtidas minimizou bastante a possibilidade de terem ocorrido mutações ou “artefatos de PCR”, derivados da adição incorreta de nucleotídeos pela *Taq* DNA polimerase durante o processo de amplificação dos clones.

ENSAIOS DE EXPRESSÃO E SOLUBILIDADE

Alíquotas das amostras coletadas durante o processo de expressão e solubilidade (T0, T3, S2, S1 e PPT), após receberem a adição do tampão da amostra, foram analisadas por meio de eletroforeses em gel de poliacrilamida na presença de agente desnaturante (SDS-PAGE), conforme apresentado na Figura 34.

A observação do gel corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 permite verificar que, em seguida à indução com IPTG, a expressão de duas bandas protéicas com pesos moleculares próximos, estimados respectivamente em 35 e 30 kDa, foi claramente aumentada.

Percebe-se que as proteínas em questão eram produzidas na forma de corpos de inclusão, solubilizados a partir da adição do agente desnaturante. A quantificação protéica da fração S2 indicou a recuperação de 50 mg das proteínas desnaturadas para cada litro de cultura.

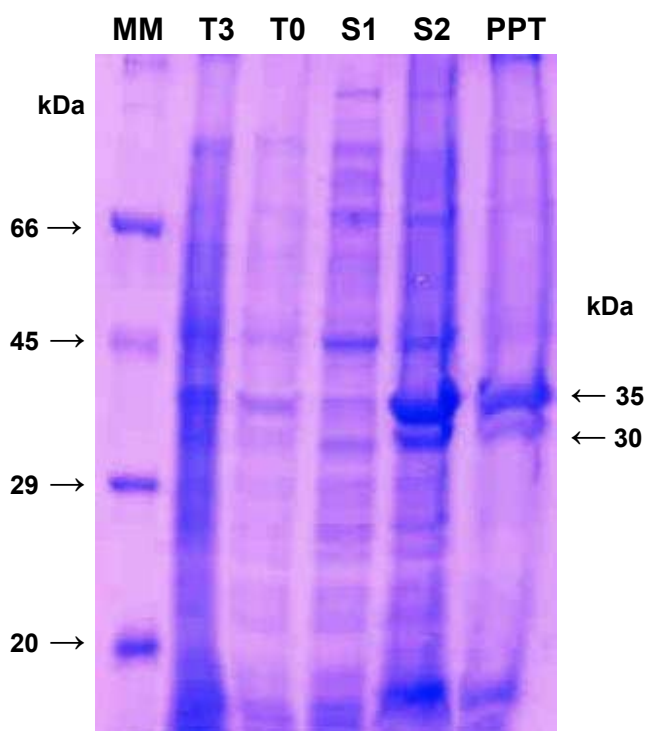


FIGURA 34 – Ensaio de expressão e solubilidade. A intensificação de T3 em relação a T0 confirmou a potencialização da expressão protéica pelas bactérias da linhagem BL21(DE3) de *E. coli* depois da adição do IPTG. As duas bandas protéicas mais intensas presentes em S2 foram parcialmente solubilizadas pela adição de uréia (6M) à cultura. MM representa o marcador de massa molecular.

PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Visando a purificação da proteína de interesse, 25 ml da fração S2, obtida em condições desnaturantes, foram aplicados numa coluna contendo 10 ml de uma resina de cobalto (BD Clontech). As frações obtidas após eluição com 1M de imidazol foram analisadas em gel de poliacrilamida (Figura 35).

O gel evidenciou que a proteína de interesse, adicionada ao peptídeo de fusão (peso molecular estimado em aproximadamente 30 kDa), foi purificada apenas parcialmente, uma vez que duas bandas de menor massa molecular (cerca de 15 e 13 kDa, respectivamente) podem ser visualizadas em cada amostra. A possibilidade

de tais bandas representarem o produto de autólise da proteína de interesse foi descartada pela presença das mesmas em amostras derivadas da purificação, com 1M de imidazol, de proteínas expressas por bactérias da linhagem BL21(DE3) de *E. coli* transformadas com o vetor de expressão não ligado ao inserto.

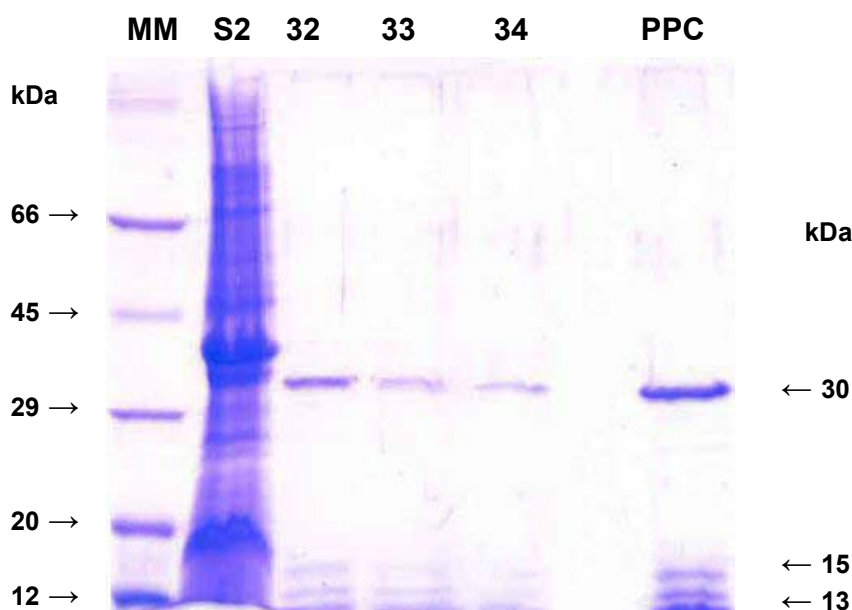


FIGURA 35 – Purificação da proteína recombinante. As frações 32, 33 e 34, obtidas após a passagem do tampão de eluição com 1M de imidazol, apresentaram uma banda com aproximadamente 30 kDa. Algumas bandas de menor massa molecular também se mostraram presentes nas amostras. MM se refere ao marcador de massa molecular.

As frações detentoras da proteína de interesse (32, 33 e 34) foram reunidas, totalizando 12 ml, e dialisadas para a remoção do agente desnaturante. Posteriormente, os 17 ml da solução protéica resultante foram colocados num concentrador Centriprep-10 (Amicon, Inc.), chegando ao volume final de 1 ml.

A quantificação protéica revelou a recuperação de 1 mg da BthaTL por litro de cultura bacteriana. Uma alíquota de 15 µl do produto concentrado também foi aplicada na SDS-PAGE (Figura 35, PPC), revelando não estar livre de contaminantes.

IMUNODETECÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

A proteína recombinante foi reconhecida pelo anticorpo Anti-BthaTL, específico contra uma serinopeptidase homóloga proveniente de uma espécie pertencente ao mesmo gênero da serpente estudada (setas vermelhas, Figura 36).

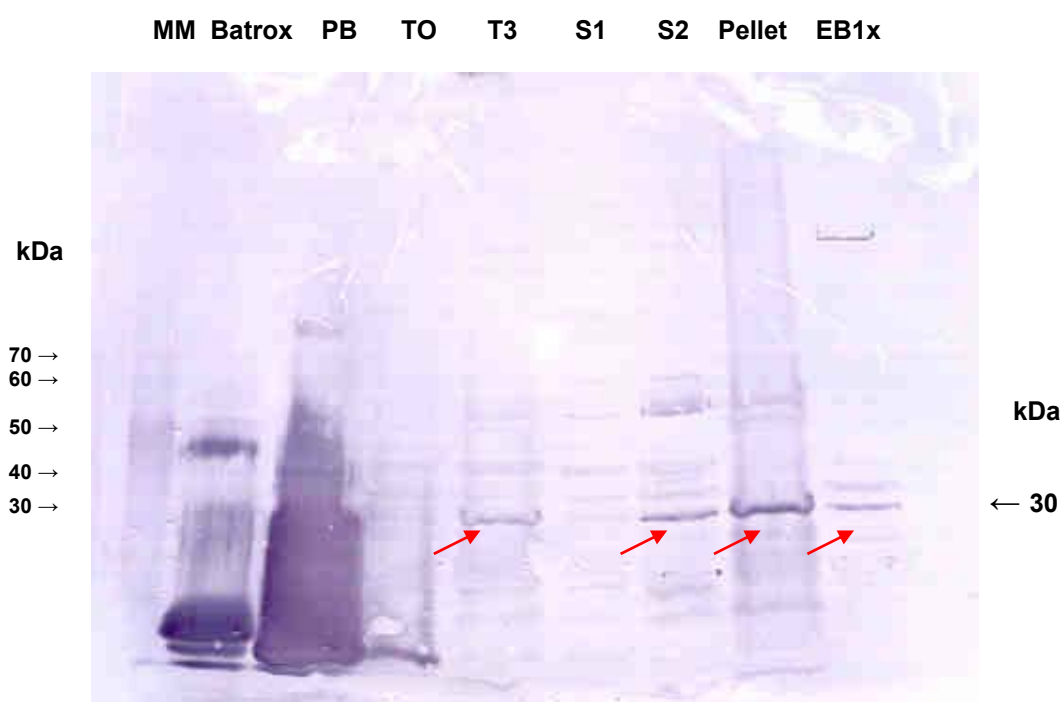


FIGURA 36 – Imunodeteção da proteína recombinante BthaTL. **MM** – marcador de massa molecular; **Batrox** – Batroxobina; **PB** – peçonha bruta de *Bothrops moojeni*; **T0**, **T3**, **S1**, **S2** e **Pellet** – frações obtidas durante a expressão protéica; **EB1x** – amostras eluídas da coluna de cobalto após passagem do tampão de eluição contendo imidazol a 1M. As setas vermelhas indicam o reconhecimento da banda correspondente a BthaTL em algumas frações analisadas.

A figura anterior sugere a ocorrência de reações cruzadas do anticorpo policlonal com outras proteínas presentes nas amostras.

SEQÜENCIAMENTO N-TERMINAL DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

O seqüenciador de proteínas não forneceu uma provável seqüência para a BthaTL recombinante. Especula-se que a causa desta falha resida no fato da quantidade de proteína transferida para a membrana de PVDF não ter atingido a concentração mínima recomendada, que é de 100 pmoles.

ATIVIDADE FIBRINOGENOLÍTICA E CASEINOLÍTICA

Para a verificação da atividade da proteína recombinante, foram utilizados como substratos o fibrinogênio bovino (0,9 mg/ml) e a caseína do leite (3 mg/ml).

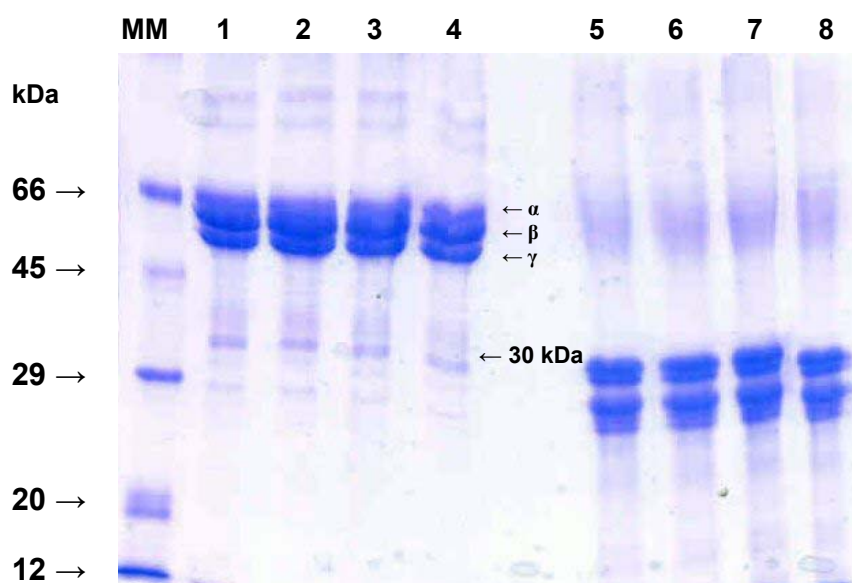


FIGURA 37 – Teste das atividades fibrinogenolítica e caseinolítica da BthaTL. (MM) Marcador de massa molecular. (1) Controle negativo (solução de fibrinogênio sem adição de enzima ou inibidor) incubado por 3h; (2) Incubação por 1h com a enzima; (3) Incubação por 3h com a enzima, (4) Incubação por 3h com a enzima e o inibidor. (5) Controle negativo (solução de caseína sem a adição de enzima ou inibidor) incubado por 3h; (6) Incubação por 1h com a enzima; (7) Incubação por 3h com a enzima, (8) Incubação por 3h com a enzima e o inibidor.

Após incubação a 37°C por 1 hora e também por 3 horas, neste último caso na presença e na ausência do inibidor de serinopeptidases PMSF (1,7 mM), não foi verificada a degradação de nenhuma cadeia polipeptídica dos substratos testados (Figura 37).

BIOINFORMÁTICA

ALINHAMENTO MÚLTIPLO DA BthaTL COM OUTRAS SERINOPEPTIDASES

A sequência da BthaTL (versão de acesso no banco de dados do NCBI → AAT40141; identificador atual no GenBank → gi:48093528) foi alinhada com a de outras serinopeptidases de peçonhas ofídicas com atividade semelhante à da trombina e também com as sequências das serinopeptidases “clássicas”.

	16	20	30	40	50	57	60	70
BthaTL	VIGGDECDIN	EHRFLAFLY-	-PG-RFFCSG	TLINQEWVLT	VAHC-----	----	DTISMR	IYLGHLTRSV
bothrombin	VIGGDECDIN	EHPFLAFMY-	-YSPQYFCGM	TLINQEWVLT	AAHC-----	----	DKTYMR	IYLGHTTRSV
batroxobin	VIGGDECDIN	EHPFLAFMY-	-YSPRYFCGM	TLINQEWVLT	AAHC-----	----	NRRFMR	IHLGKHAGSV
KN-BJ	IIGGRPCDIN	EHRSLALVK-	--YGNFQCSG	TLINQEWVLS	AAHC-----	----	DGEKMK	IHLGVHSSKV
mucofir5	IIGGDECNIN	EHPFLVLVY-	--YDDYQCGG	TLINEEWVLT	AAHC-----	----	NGENME	IYLGMSHKKV
ancrod	VIGGDECNIN	EHRFLALVY-	--ANGSLCGG	TLINQEWVLT	ARHC-----	----	DRGNMR	IYLGMSHNLV
bilineobin	IIGGDECNIN	EHRFLVALYD	VWGSFLCGG	TLINQEWVLT	AAHC-----	----	NMSNIY	IYLGMSHNSV
flavoxobin	VIGGDECNIN	EHPFLVALYD	AWSGRFLCGG	TLINPEWVLT	AAHC-----	----	DSKNFK	MKLGHAHSKV
contortrix	VVGDECNIN	EHRFLVAIFN	--SNGFVCSG	TLINQEWVLT	AAHC-----	----	DSTDFQ	IKLGAHSKKV
TSV-PA	VFGGDECNIN	EHRSLVLFN	--SNGFLCGG	TLINQDWVLT	AAHC-----	----	DSNNFQ	LLFGVHSSKI
FVA	VVGDECDIN	EHPFLVALYT	SSSSTVHCAG	TLINQEWVLT	AVHC-----	----	DRKNIR	IKLGMHSKNI
RVV-Va	VVGDECNIN	EHPFLVALYT	STSSTIHCAG	ALINREWVLT	AAHC-----	----	DRRNIR	IKLGMHSKNI
hGK-1	IVGWGECEKH	SQPWQVAVYS	--HGWAHCGG	VLVHPQWVLT	AAHC-----	----	LKNSIQ	VWLGRHNLFE
H_Tryp	IVGGYTQEN	SVPIQVSLNS	---GYHFCGG	SLINDQWVVS	AAHC-----	----	YKSRIQ	VRIGEHNINV
A_Thromb	IVEGSDAEIG	MSPWQVMLFR	KSPQELLCGA	SLISDRWVLT	AAHCLLYPPW	DKNFTENDLL	VRIGKHSRTR	
	→	→	→	→	→	→	→	
	80	90	100	102	110	120	130	
BthaTL	PNDDEEIRYP	MEKFKCPNRR	RSYIK-----	-----DKDIM	LIRLNRPVND	SPHIAPLSLP	SNPPSV----	
bothrombin	ANDDEVIRYP	KEKFICPNKK	KNVIT-----	-----DKDIM	LIRLNRPVKN	STHIAPISLP	SNPPSV----	
batroxobin	ANYDEVVRYP	KEKFICPNKK	KNVIT-----	-----DKDIM	LIRLDRPVKN	SEHIAPLSLP	SNPPSV----	
KN-BJ	PNKDKQTRVA	KEKFFCLSSK	NYTKW-----	-----DKDIM	LIRLDSPVKN	SAHIAPISLP	SSPPIV----	
mucofir5	PNKDRRRRVP	KEKFFCDSSK	NYTKW-----	-----NKDIM	LIRLNRPVRK	SAHIAPLSLP	SSPSPV----	
ancrod	LNKDALRRFP	KEYYFCLNTR	NDTIW-----	-----DKDIM	LIRLNRPVRN	SAHIAPLSLP	SNPPSV----	
bilineobin	QFDDEERRYP	KEYYFLFRCSK	NFTKW-----	-----DKDIM	LIRLNKPVNR	SEHIAPLSLP	SSPPIV----	
flavoxobin	LNEDEQIRNP	KEKFICPNKK	NTEVL-----	-----DKDIM	LIKLDSVPSY	SEHIAPLSLP	SSPSPV----	
contortrix	LNEDEQIRNP	KEKFICPNKK	NTEVL-----	-----DKDIM	LIKLDSRVSN	SEHIAPLSLP	SSPSPV----	
TSV-PA	LNEDEQTRDP	KEKFFCPNRR	KDDEV-----	-----DKDIM	LIKLDSVSN	SEHIAPLSLP	SSPSPV----	
FVA	RNEDEQIRVP	RRKFFCLNTK	FPNGK-----	-----DKDIM	LIRLRPVKN	SAHIAPISLP	SSPSSP----	
RVV-Va	RNEDEQIRVP	RGKYFCLNTK	FPNGL-----	-----DKDIM	LIRLRPVNTY	STHIAPVSLP	SRSRGV----	
hGK-1	PEDTGQRVPV	SHSFPHPLYN	MSLLKHQSLR	PDEDSSHDIM	LLRLSEPAKI	TDVVKVLGLP	TQEPAL----	
H_Tryp	LEGNEQFVNA	AKIIKHPNFD	RKTL-----	-----NNDIM	LIKLSPPVKL	NARVATVALP	SSCAPA----	
A_Thromb	YERNIEKISM	LEKIYIHPRY	NWREN-----	-----LDRDIA	LMKLKKPVAF	SDYIHPVCLP	DRETAASLLQ	
	→	→	→	→	→	→	→	

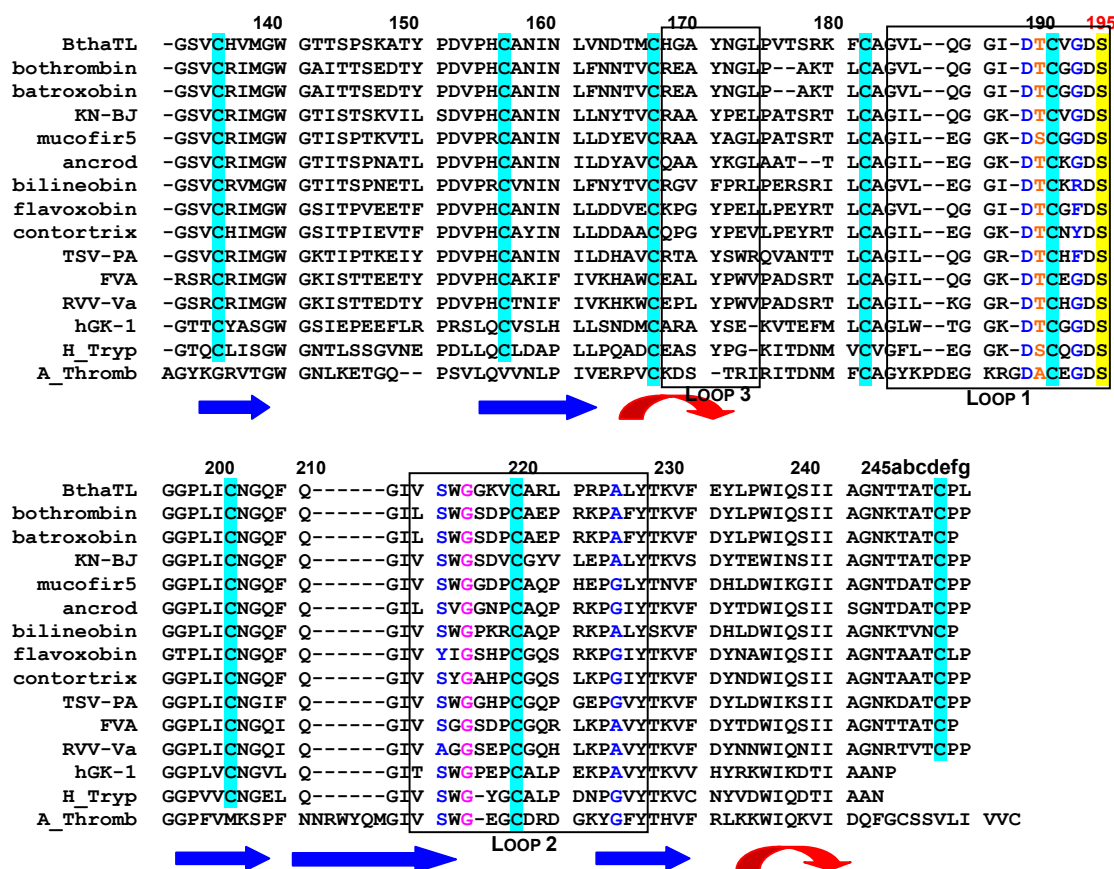


FIGURA 38 – Alinhamento da sequência da BthA TL com diferentes SVTLEs, com a caliceína glandular (hGK-1), a tripsina (H_Tryp) e a α -trombina (A_Thromb) humanas pelo programa Multalin (Corpet, 1988). Os traços representam intervalos inseridos para obter um melhor alinhamento das seqüências. ■ Aminoácidos da tríade catalítica (His57, Asp102 e Ser195); ■ resíduos de cisteína; ■ resíduos envolvidos no reconhecimento do sítio P2 do substrato; ■ resíduos que interagem com a posição P3; ■ resíduos que atuam como doadores ou aceptores de prótons. Nos retângulos estão destacadas as alças (“loops”) 1, 2 e 3 que circundam o sítio catalítico das enzimas. A estrutura secundária foi prevista com o programa Swiss PDB Viewer 3.7 (Guex & Peitsch, 1996), e está indicada na seqüência: α -hélices são representadas por setas vermelhas, e folhas β por setas azuis. A numeração dos resíduos segue o modelo do quimiotripsinogênio (Bode *et al.*, 1992).

O alinhamento múltiplo (Figura 38) evidenciou o elevado grau de identidade existente entre as seqüências das serinopeptidases de peçonhas ofídicas e a BthaTL, o que motivou a denominação BthaTL: “enzima da peçonha de *Bothrops alternatus* com ação trombina-símile” (***Bothrops alternatus* Thrombin-Like enzyme**). Foi verificada uma reduzida identidade das SVTLEs com as serinopeptidases “clássicas”, comprovada pelos dados apresentados na Tabela 07.

TABELA 07 – Porcentagem de identidade (resíduos idênticos) e de similaridade (resíduos idênticos e substituições conservativas) existente entre a BthaTL, algumas serinopeptidases de peçonhas ofídicas e as serinopeptidases “clássicas”.

PROTEÍNA		BthaTL (gi: 48093528)	
		identidade	similaridade
SVTLES	Bothrombina (gi:14285806)	75%	83%
	Batroxobina (gi:62464)	72%	81%
	KN-BJ2 (gi:13959622)	66%	75%
	Mucofirase 5 (gi:602604)	65%	76%
	Ancrod (gi:461512)	65%	75%
	Bilineobina (gi:2134238)	65%	74%
	Flavoxobina (gi:360797)	64%	76%
	Contortrixobina (gi:32469800)	62%	76%
	TSV-PA (gi:1363360)	60%	75%
	FVA (gi:13959656)	61%	71%
	RVV-V α (gi:134129)	57%	69%
Serino peptidases “clássicas”	Tripsina Humana (gi:88941)	38%	59%
	Calicreína Glandular Humana (gi:125174)	37%	54%
	α -Trombina Humana (gi:4503635)	29%	34%

DETERMINAÇÃO TEÓRICA DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA BthaTL

A inserção dos resíduos de aminoácidos que integram a BthaTL no programa Proteparam Tool possibilitou a estimativa de algumas propriedades físico-químicas desta proteína (Tabela 08).

TABELA 08 – Parâmetros físico-químicos estimados para a BthaTL.

PARÂMETROS	BthaTL
Número total de resíduos	233
Massa molecular	25629.5
pI (ponto isoelétrico)	8.01
Índice alifático	83.22
Resíduos negativamente carregados	19
Resíduos positivamente carregados	21
Grande média de hidropaticidade	- 0.094

BUSCA DE MOTIVOS

O programa PROSITE foi empregado para a verificação da ocorrência de inserção ou deleção de motivos específicos na proteína BthaTL (Figura 39).



FIGURA 39 – Procura por inserção ou deleção de motivos na sequência primária da BthaTL realizada pelo programa PROSITE. A numeração dos resíduos segue os parâmetros do quimiotripsinogênio (Bode *et al.*, 1992). Potenciais sítios encontrados: ■ fosforilação dependente de cAMP ou de cGMP; ■ fosforilação por CK-2; ■ fosforilação por PKC; ■ N-glicosilação; ■ N-miristoilação.

MODELAGEM MOLECULAR BASEADA EM HOMOLOGIA

A sequência de resíduos de aminoácidos deduzida a partir do cDNA subclonado no vetor pET-28a foi usada na construção de um modelo para a BthaTL.

Com base em 60% de identidade e em 74% de pareamentos positivos, idênticos ou conservativos (Tabela 07), o molde selecionado foi a estrutura tridimensional da TSV-PA, com 2.5 Å de resolução (Parry *et al.*, 1998), associada ao inibidor Glu-Gly-Arg-clorometilcetona (código de acesso 1bqy no Protein Data Bank).

Na Figura 40, observa-se a grande semelhança estrutural existente entre as duas proteínas.

A raiz quadrada média (RMS) de sobreposição entre molde e modelo, considerando a espinha dorsal (“backbone”) das moléculas, ou seja, a posição relativa dos átomos de C α , além da posição dos átomos de C e N envolvidos nas ligações peptídicas, foi de 0,88 Å. Os maiores desvios estruturais encontram-se nas regiões de alças (“loops”), especialmente naquelas alças situadas entre as folhas β nomeadas como I, J, K e L, na região C-terminal das duas proteínas.

Entre as folhas β I e J estão situadas a alça 3 (resíduos 169-175) e a alça 1 (resíduos 184-195). Já a alça 2 (resíduos 213-228) está posicionada entre as folhas β K e L.

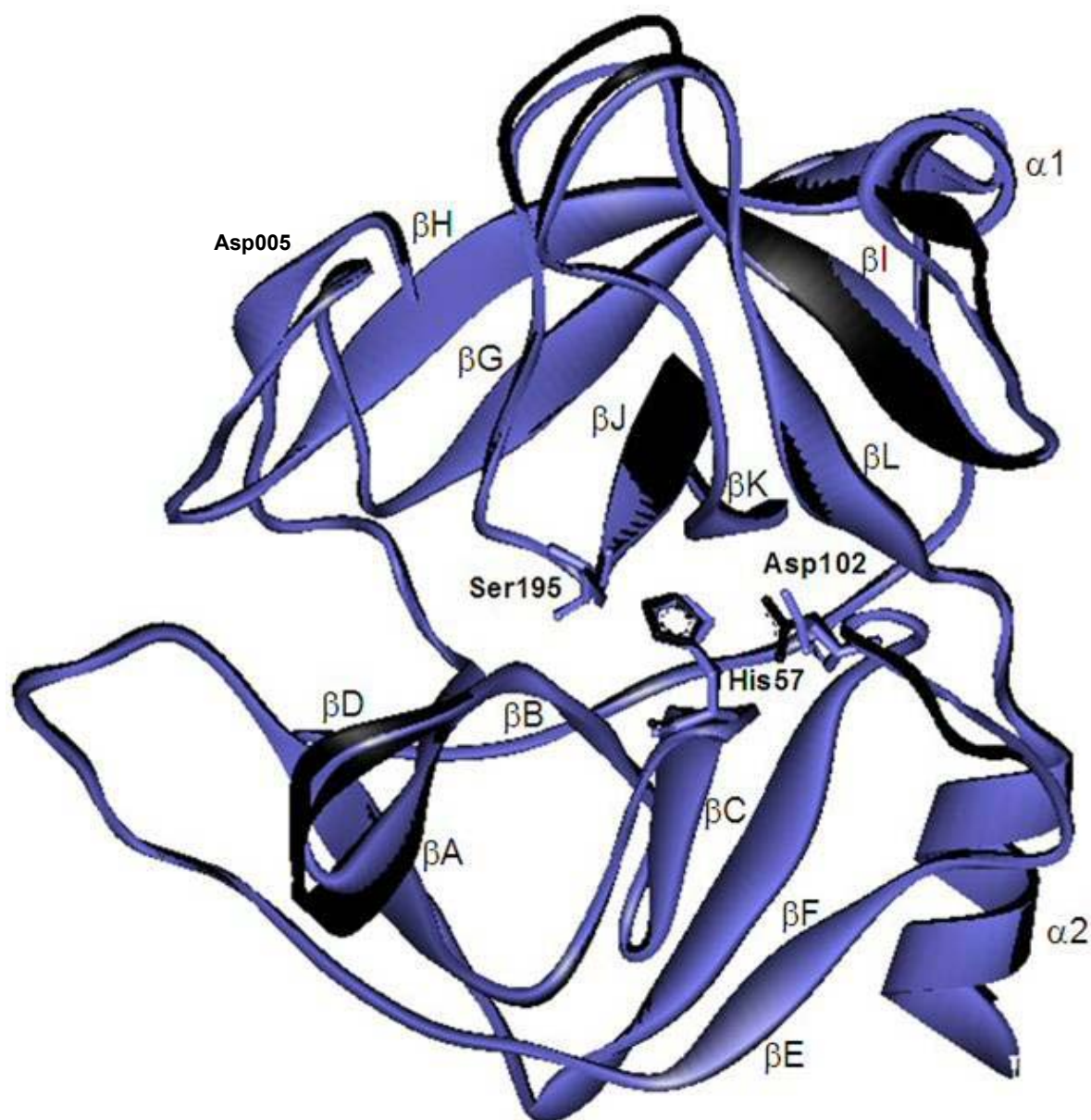


FIGURA 40 – Alinhamento dos modelos moleculares da TSV-PA (preto) e da BthaTL (azul). As estruturas tridimensionais estão representadas em forma de fitas (“ribbons”). Os elementos de estrutura secundária, α -hélices e folhas β , foram nomeados respectivamente com números e letras, a partir da região N-terminal. Os resíduos da tríade catalítica (His57, Asp102 e Ser195) aparecem como pequenos bastões (“sticks”). O resíduo Asp005 está identificado na superfície da molécula. A imagem foi construída com o programa WebLab Viewer Pro 3.5.

Em termos de estrutura secundária, a BthaTL conserva as características peculiares à família da tripsina, pertencente ao clã da quimiotripsina, exibindo 12 folhas β e 2 α -hélices arranjadas num enovelamento β/β hidrolase (Figura 41).

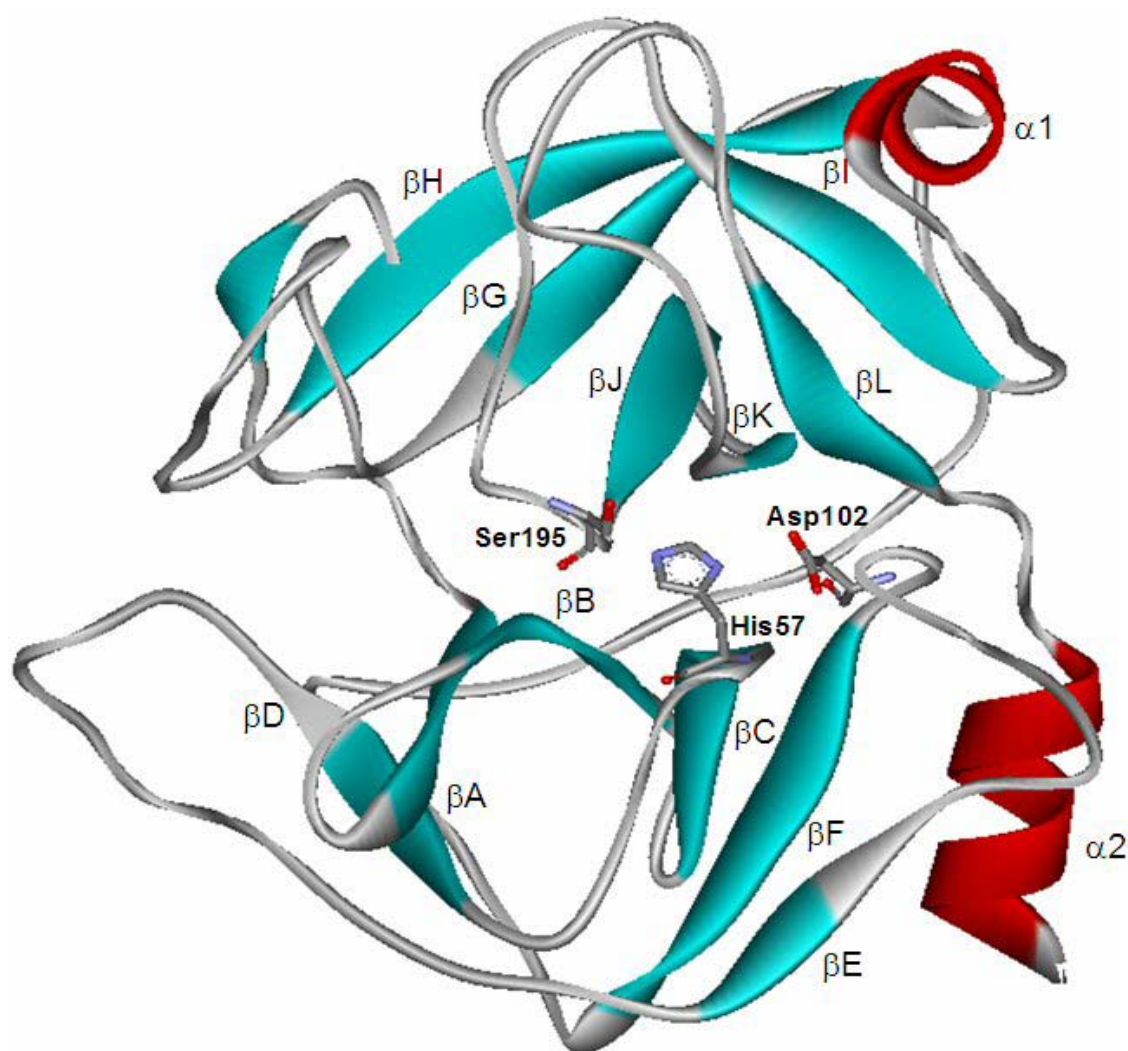


FIGURA 41 – Modelo molecular da BthaTL. A estrutura tridimensional está representada em forma de fitas (“ribbons”). Folhas β são mostradas em azul e nomeadas alfabeticamente a partir da região N-terminal. α -hélices aparecem em vermelho, numeradas a partir da região N-terminal. Os resíduos catalíticos estão representados como pequenos bastões (“sticks”). A imagem foi construída com o programa WebLab Viewer Pro 3.5.

A Figura 42 evidencia que os 12 resíduos de cisteína presentes na sequência da BthaTL interagem entre si, aos pares, garantindo a manutenção da estrutura terciária e a estabilização da molécula. As pontes dissulfeto são formadas em posições estratégicas, que aproximam os arranjos das estruturas secundárias e determinam um formato protéico globular e compacto.

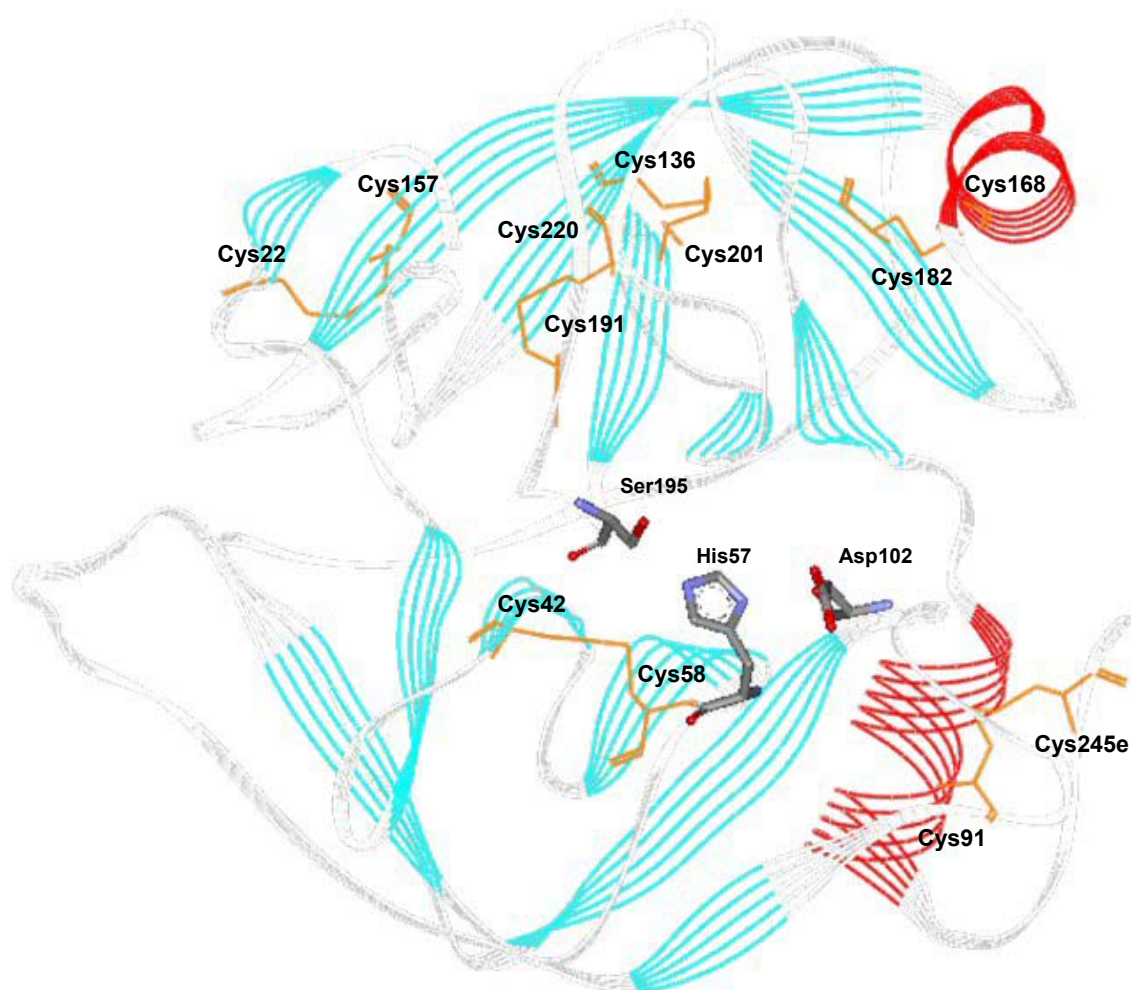


FIGURA 42 – Posicionamento das pontes dissulfeto presentes no modelo molecular da BthaTL. A estrutura tridimensional aparece no formato de fita, colorida com base em sua estrutura secundária (α -hélices em vermelho e folhas β em azul). Pequenos bastões representam os resíduos da tríade catalítica. As 6 pontes dissulfeto são mostradas em alaranjado. Imagem gerada pelo programa WebLab Viewer Pro 3.5.

A disposição das cargas na superfície da BthaTL exposta a um ambiente neutro, numa simulação do pH fisiológico, está apresentada na Figura 43. Resíduos ácidos e básicos distribuem-se pela superfície da molécula, assim como os resíduos neutros, formando exossítios que viabilizam interações com o meio externo e a conseqüente solubilização da proteína, além de sua ação sobre os substratos.

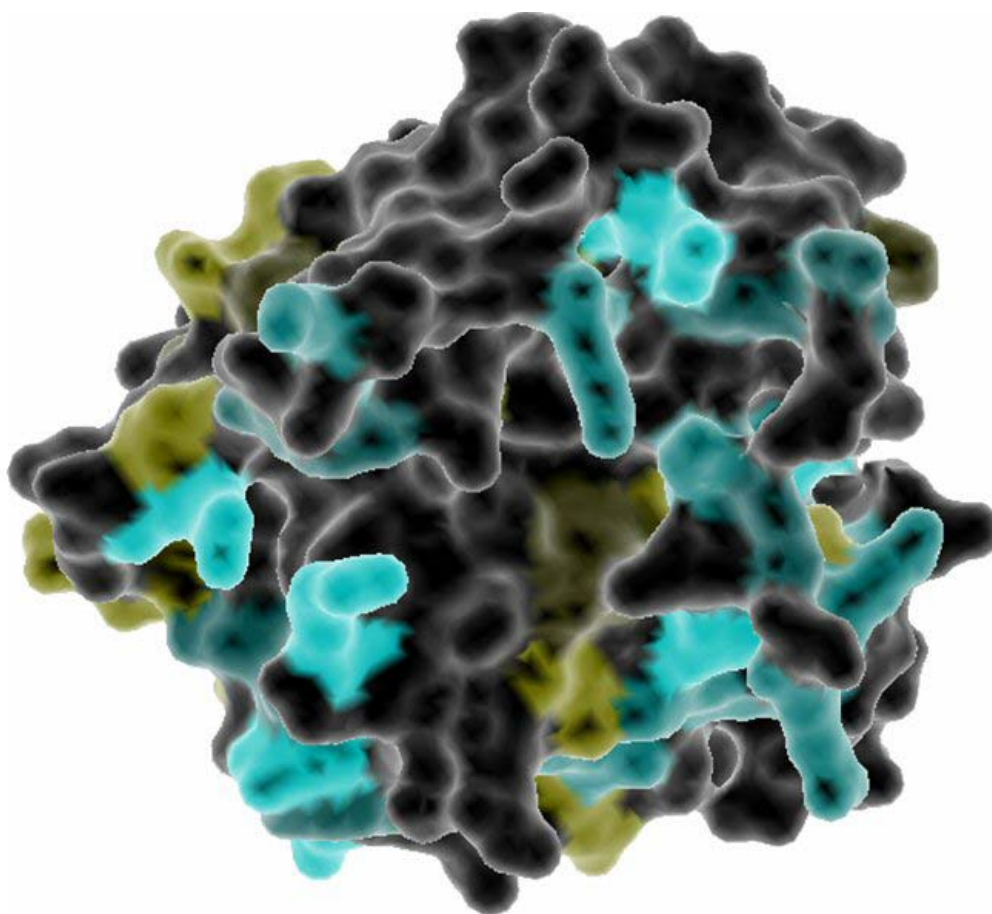


FIGURA 43 – Modelo de superfície com cargas da BthaTL. A superfície foi elaborada com base em sua acessibilidade ao solvente usando uma sonda esférica de 1.4 Å, sendo colorida a partir dos valores de pKa. Resíduos básicos são mostrados em azul, ácidos em amarelo e neutros em cinza. Imagem construída pelo programa WebLab Viewer Pro 3.5.

Na Figura 44 é possível observar que alguns resíduos importantes na atividade da TSV-PA sobre o plasminogênio foram substituídos de forma não conservativa na BthaTL. Na TSV-PA, o Asp97 forma uma ponte salina com a Arg174 (linha vermelha), projetando o Trp173 (S4) no interior do sítio ativo. Juntamente com a Phe193 (S2'), ele restringe o acesso de substratos maiores. Comparativamente, as posições 173 e 193 da BthaTL são ocupadas por resíduos de glicina.

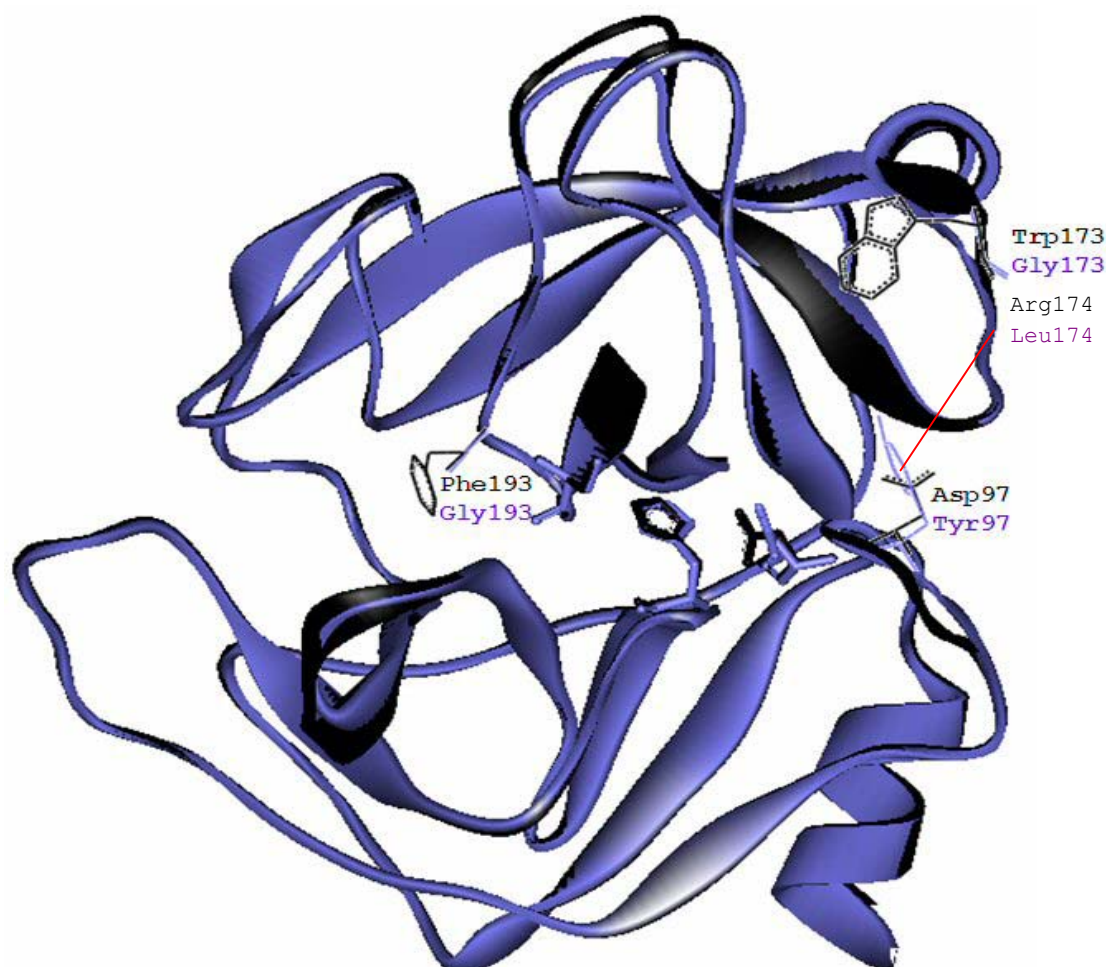


FIGURA 44 – Alinhamento dos modelos moleculares da TSV-PA (preto) e da BthaTL (azul). As estruturas tridimensionais estão apresentadas em forma de fita. Resíduos importantes na atividade da TSV-PA e seus equivalentes na BthaTL aparecem como pequenos bastões devidamente identificados. Imagem obtida com o programa WebLab Viewer Pro 3.5.

Um modelo molecular adicional da BthaTL (Figura 45) foi construído para a verificação do posicionamento de resíduos notoriamente essenciais no reconhecimento do substrato e na atividade catalítica das serinopeptidases de peçonhas ofídicas. Na alça 1 são destacados os resíduos Asp189, Thr190 e Gly193, e na alça 2, Ser214, Trp215, Gly216 e Gly217.

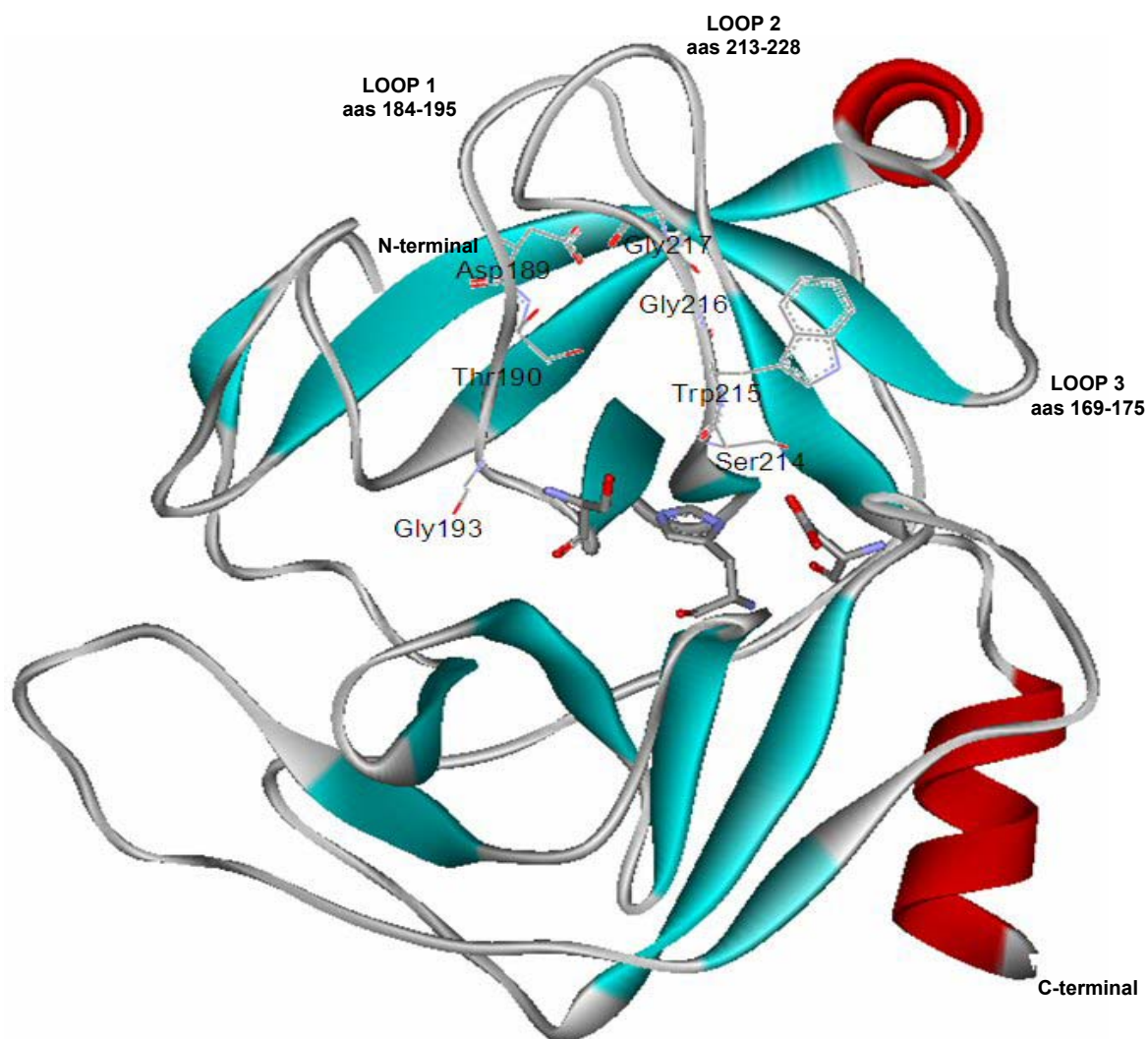


FIGURA 45 – Resíduos de aminoácidos relevantes na especificidade da BthaTL por um substrato e em sua atividade. A tríade catalítica está representada na forma de pequenos bastões. Os demais resíduos aparecem como projeções lineares. As regiões N-terminal e C-terminal estão devidamente indicadas. A imagem foi construída com o programa WebLab Viewer Pro 3.5.

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO MODELO GERADO

WHAT IF

Vizinhanças atômicas de molde e modelo foram submetidas à avaliação do programa WHAT IF, que calcula o comprimento de ligações e ângulos de torção presentes na cadeia principal e no grupo lateral de cada resíduo de aminoácido da proteína, comparando-os com a média geral e com o desvio-padrão e determinando o “Z-score” individual de cada aminoácido.

Quando são calculados desvios excepcionais da média inferiores a -2.5, a posição do resíduo correspondente deve ser atentamente verificada.

Os ambientes químicos dos resíduos individuais que formam o molde mostraram-se dentro dos padrões normalmente obtidos em estruturas protéicas. A média calculada para todos os resíduos analisados foi de -1.19 (Tabela 09).

Com exceção do quinto resíduo da molécula do modelo (Asp005), cujo valor calculado pelo programa foi de -3.210, não foram encontrados desvios anômalos na avaliação individual dos resíduos da BthaTL, cuja média referente a todos os resíduos foi calculada em -2.21 (Tabela 10), sendo considerada boa de acordo com os valores de referência.

TABELA 09 – Resultado da avaliação do molde **TSV-PA** pelo programa WHAT IF.

Nº	Aa	Valor	Nº	Aa	Valor	Nº	Aa	Valor	Nº	Aa	Valor	Nº	Aa	Valor
001	Val	0.840	048	Gln	1.581	095	Ser	0.230	142	Ile	-1.060	189	Ile	-0.518
002	Phe	-1.348	049	Leu	1.376	096	Val	0.040	143	Asn	-0.473	190	Phe	0.940
003	Gli	-0.584	050	Leu	1.507	097	Ser	-0.473	144	Ile	0.591	191	Gln	0.469
004	Gli	-0.506	051	Phe	-0.390	098	Asn	0.276	145	Leu	1.143	192	Gli	0.446
005	Asp	-2.952	052	Gli	-1.280	099	Ser	-1.623	146	Asp	0.242	193	Ile	-0.237
006	Glu	0.116	053	Val	-0.995	100	Glu	0.459	147	His	-1.695	194	Val	-0.390
007	Cis	0.477	054	His	-0.734	101	His	0.312	148	Ala	-0.386	195	Ser	-0.423
008	Asn	0.187	055	Ser	-1.096	102	Ile	-0.151	149	Val	-0.192	196	Trp	-0.266
009	Ile	-0.798	056	Lis	-0.056	103	Ala	-0.996	150	Cis	0.721	197	Gli	-0.877
010	Asn	-1.233	057	Lis	0.675	104	Pro	0.391	151	Arg	0.696	198	Gli	-2.181
011	Glu	-1.536	058	Ile	-1.000	105	Leu	-0.933	152	Thr	0.187	199	His	-0.999
012	His	-1.045	059	Leu	-1.043	106	Ser	0.189	153	Ala	-1.379	200	Pro	-0.979
013	Arg	-0.736	060	Asn	-0.568	107	Leu	0.472	154	Tir	-1.491	201	Cis	-0.097
014	Ser	-1.263	061	Glu	-0.833	108	Pro	-0.354	155	Ser	-1.273	202	Gli	-1.313
015	Leu	-1.465	062	Asp	-1.402	109	Ser	0.617	156	Trp	-1.814	203	Gln	-1.105
016	Val	-0.380	063	Glu	-0.311	110	Ser	-0.577	157	Arg	-1.410	204	Pro	0.735
017	Val	-0.656	064	Gln	-0.128	111	Pro	-0.459	158	Gln	-1.013	205	Gli	-0.480
018	Leu	0.087	065	Thr	0.300	112	Pro	-0.136	159	Val	-1.798	206	Glu	-1.276
019	Phe	-0.389	066	Arg	-0.657	113	Ser	1.528	160	Ala	-1.212	207	Pro	-0.361
020	Asn	-1.456	067	Asp	0.726	114	Val	4.040	161	Asn	0.255	208	Gli	-0.997
021	Ser	-0.898	068	Pro	0.677	115	Gli	0.197	162	Thr	-1.122	209	Val	-0.326
022	Asn	-1.466	069	Lis	-0.045	116	Ser	-0.196	163	Thr	0.395	210	Tir	1.376
023	Gli	0.181	070	Glu	0.508	117	Val	2.178	164	Leu	0.030	211	Thr	-0.223
024	Phe	-1.283	071	Lis	-0.596	118	Cis	1.435	165	Cis	0.615	212	Lis	0.710
025	Leu	1.148	072	Phe	0.342	119	Arg	-0.596	166	Ala	0.567	213	Val	-0.499
026	Cis	0.701	073	Phe	-0.624	120	Ile	-0.315	167	Gli	-0.041	214	Phe	-0.558
027	Gli	-0.392	074	Cis	0.418	121	Met	-0.871	168	Ile	-1.374	215	Asp	-1.228
028	Gli	1.199	075	Pro	-1.098	122	Gli	-0.035	169	Leu	0.385	216	Tir	-0.349
029	Thr	1.335	076	Asn	-1.004	123	Trp	0.674	170	Gln	-0.141	217	Leu	0.680
030	Leu	0.884	077	Arg	-0.379	124	Gli	0.515	171	Gli	-1.153	218	Asp	0.629
031	Ile	0.015	078	Lis	0.482	125	Lis	0.332	172	Gli	0.463	219	Trp	0.702
032	Asn	-2.026	079	Lis	-1.133	126	Thr	-0.729	173	Arg	0.742	220	Ile	0.662
033	Gln	-0.079	080	Asp	-1.259	127	Ile	-1.050	174	Asp	-1.027	221	Lis	1.681
034	Asp	-0.451	081	Asp	0.365	128	Pro	-0.234	175	Thr	0.111	222	Ser	0.944
035	Trp	3.564	082	Glu	-0.810	129	Thr	-0.293	176	Cis	-1.491	223	Ile	-0.596
036	Val	1.958	083	Val	-1.272	130	Lis	-0.855	177	His	-0.994	224	Ile	-0.032
037	Val	0.640	084	Asp	-0.559	131	Glu	0.440	178	Phe	0.002	225	Ala	-0.531
038	Thr	-0.184	085	Lis	-1.188	132	Ile	-0.039	179	Asp	-1.703	226	Gli	-0.745
039	Ala	1.672	086	Asp	0.464	133	Tir	-0.762	180	Ser	0.077	227	Asn	0.430
040	Ala	-1.780	087	Ile	0.568	134	Pro	-1.356	181	Gli	2.494	228	Lis	-0.890
041	His	0.678	088	Met	0.881	135	Asp	0.086	182	Gli	0.155	229	Asp	-1.160
042	Cis	-0.260	089	Leu	1.440	136	Val	-1.314	183	Pro	0.941	230	Ala	-1.903
043	Asp	0.236	090	Ile	1.021	137	Pro	1.069	184	Leu	-0.368	231	Thr	0.691
044	Ser	-0.561	091	Lis	-0.526	138	His	-0.823	185	Ile	0.823	232	Cis	0.126
045	Asn	-0.802	092	Leu	-0.014	139	Cis	-0.331	186	Cis	0.772	233	Pro	0.234
046	Asn	-1.096	093	Asp	0.293	140	Ala	0.251	187	Asn	-1.455	234	Pro	1.117
047	Phe	0.192	094	Ser	-1.166	141	Asn	-1.232	188	Gli	0.204			

Nº – número seqüencial do resíduo na proteína.

Aa – resíduo.

O valor ("Z-score") calculado para toda a molécula foi -1.19.

TABELA 10 – Resultado da avaliação do modelo **BthaTL** pelo programa WHAT IF.

Nº	Aa	Valor	Nº	Aa	Valor	Nº	Aa	Valor	Nº	Aa	Valor	Nº	Aa	Valor
001	Val	1.117	048	Ile	0.471	095	Val	-0.496	142	Asn	-0.704	189	Phe	0.509
002	Ile	-1.669	049	Tir	3.268	096	Asn	-0.598	143	Leu	-0.292	190	Gln	0.206
003	Gli	-0.173	050	Leu	-1.364	097	Asp	-0.362	144	Val	-1.022	191	Gli	0.119
004	Gli	-0.216	051	Gli	-1.220	098	Ser	-1.566	145	Asn	-1.081	192	Ile	0.029
005	Asp	-3.210	052	Leu	-1.458	099	Pro	0.650	146	Asp	-1.602	193	Val	-0.067
006	Glu	-0.017	053	His	-0.517	100	His	-0.570	147	Thr	-0.612	194	Ser	-0.094
007	Cis	0.375	054	Thr	-0.861	101	Ile	-0.138	148	Met	-0.137	195	Trp	-0.727
008	Asp	-0.267	055	Arg	1.350	102	Ala	-1.164	149	Cis	0.499	196	Gli	-0.711
009	Ile	-0.886	056	Ser	-0.771	103	Pro	0.806	150	His	0.460	197	Gli	-1.965
010	Asn	-0.720	057	Val	-1.045	104	Leu	-0.098	151	Gli	0.695	198	Lis	-0.732
011	Glu	-2.221	058	Pro	-0.062	105	Ser	1.752	152	Ala	-1.684	199	Val	-1.441
012	His	-0.959	059	Asn	-0.387	106	Leu	0.636	153	Tir	-1.193	200	Cis	0.710
013	Arg	-1.018	060	Asp	-0.713	107	Pro	-0.117	154	Asn	-0.238	201	Ala	-1.538
014	Phe	1.002	061	Asp	-1.432	108	Ser	1.058	155	Gli	-1.572	202	Arg	-0.281
015	Leu	-1.579	062	Glu	-0.151	109	Asn	-0.908	156	Leu	-1.396	203	Leu	-0.944
016	Ala	-0.198	063	Glu	0.132	110	Pro	-0.527	157	Pro	-1.466	204	Pro	-0.840
017	Phe	-0.098	064	Ile	-1.548	111	Pro	-0.299	158	Val	1.983	205	Arg	-0.177
018	Leu	-0.074	065	Arg	-0.495	112	Ser	2.070	159	Thr	-1.163	206	Pro	-1.036
019	Tir	-0.895	066	Tir	1.747	113	Val	0.046	160	Ser	-0.204	207	Ala	-1.339
020	Pro	-1.762	067	Pro	-0.047	114	Gli	0.575	161	Arg	-1.965	208	Leu	-0.827
021	Gli	-0.632	068	Met	0.616	115	Ser	-0.343	162	Lis	-2.051	209	Tir	-0.158
022	Arg	-1.600	069	Glu	1.503	116	Val	2.155	163	Phe	-0.775	210	Thr	-0.724
023	Phe	-1.235	070	Lis	-0.671	117	Cis	1.207	164	Cis	0.737	211	Lis	-0.082
024	Phe	0.252	071	Phe	0.188	118	His	1.162	165	Ala	0.046	212	Val	0.219
025	Cis	0.655	072	Lis	-1.525	119	Val	-0.617	166	Gli	0.712	213	Phe	-0.420
026	Ser	-0.930	073	Cis	0.328	120	Met	-1.066	167	Val	-1.753	214	Glu	-1.241
027	Gli	0.382	074	Pro	-0.979	121	Gli	0.009	168	Leu	-0.539	215	Tir	-0.615
028	Thr	1.183	075	Asn	-1.282	122	Trp	0.368	169	Gln	-1.065	216	Leu	0.717
029	Leu	0.773	076	Arg	-1.942	123	Gli	0.715	170	Gli	-1.655	217	Pro	0.914
030	Ile	0.815	077	Lis	0.435	124	Thr	-0.362	171	Gli	-0.048	218	Trp	0.599
031	Asn	-1.957	078	Arg	-1.997	125	Thr	-0.413	172	Ile	0.697	219	Ile	0.486
032	Gln	0.840	079	Ser	-0.898	126	Ser	-0.721	173	Asp	-0.871	220	Gln	2.350
033	Glu	-0.686	080	Tir	-0.731	127	Pro	-0.126	174	Thr	-0.135	221	Ser	0.676
034	Trp	2.697	081	Ile	-0.907	128	Ser	-0.598	175	Cis	-1.215	222	Ile	-0.672
035	Val	1.540	082	Lis	-1.620	129	Lis	-0.724	176	Val	1.352	223	Ile	0.663
036	Leu	0.363	083	Asp	0.093	130	Ala	-2.061	177	Gli	-0.782	224	Ala	-0.175
037	Thr	-0.250	084	Lis	-1.753	131	Thr	-0.903	178	Asp	-1.754	225	Gli	-0.565
038	Val	-0.175	085	Asp	0.192	132	Tir	-1.354	179	Ser	0.203	226	Asn	0.447
039	Ala	-2.118	086	Ile	0.707	133	Pro	-1.741	180	Gli	2.508	227	Thr	0.000
040	His	-0.376	087	Met	-0.571	134	Asp	-0.013	181	Gli	0.207	228	Thr	-1.266
041	Cis	-0.467	088	Leu	2.208	135	Val	-2.200	182	Pro	1.415	229	Ala	-1.970
042	Asp	0.214	089	Ile	0.831	136	Pro	0.986	183	Leu	-0.497	230	Thr	0.677
043	Thr	-1.217	090	Arg	-0.584	137	His	-0.792	184	Ile	0.208	231	Cis	0.030
044	Ile	-2.200	091	Leu	-0.985	138	Cis	0.198	185	Cis	0.547	232	Pro	-0.627
045	Ser	-1.526	092	Asn	-1.024	139	Ala	-0.288	186	Asn	-1.451	233	Leu	-0.865
046	Met	-0.536	093	Arg	-0.206	140	Asn	-1.514	187	Gli	-0.211			
047	Arg	1.077	094	Pro	1.187	141	Ile	-1.056	188	Gln	-0.035			

Nº – número sequencial do resíduo na proteína.

Aa – resíduo.

O valor (“Z-score”) calculado para toda a molécula foi -2.21.

PROCHECK

As estruturas moleculares de molde e modelo foram avaliadas por meio de comparações com características freqüentemente encontradas em proteínas depositadas nos bancos de dados.

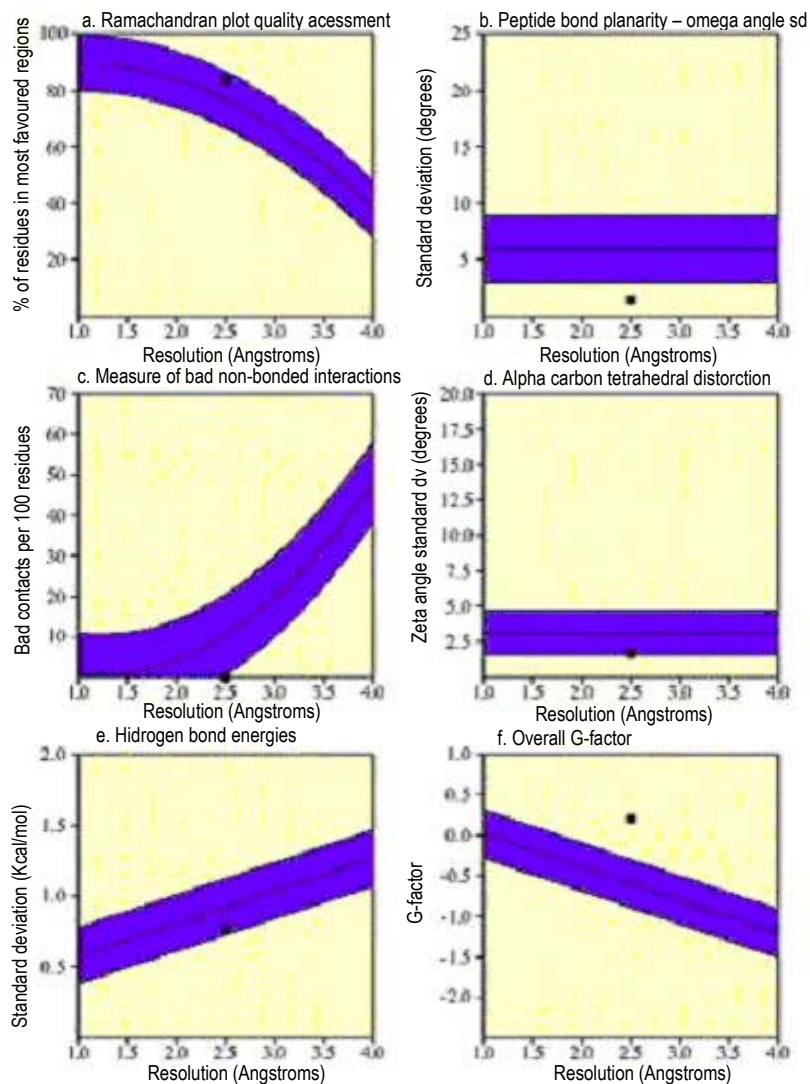
A plotagem dos ângulos de torção phi (NH — C α) e psi (C α — CO) calculados para cada resíduo de aminoácido constitui o mapa conformacional da proteína, também chamado de diagrama de Ramachandran. Este foi o primeiro mecanismo teórico criado para a verificação de estruturas protéicas (Ramachandran *et al.*, 1963), constituindo atualmente um recurso bastante confiável na validação de modelos moleculares.

Uma vez que a repetição contínua de valores de phi e psi ao longo da cadeia polipeptídica resulta em estruturas regulares, como α -hélices e folhas β , é possível determinar teoricamente se o enovelamento assumido pela molécula está de acordo com os ângulos de torção permitidos para os átomos que integram a cadeia principal de uma proteína.

Glicinas, por não apresentarem um átomo de carbono β , podem se posicionar em qualquer quadrante do diagrama, sem restrições. Quanto às prolinas, consideradas iminoácidos devido à ligação de seu grupo amino com a cadeia lateral (formando o anel pirrolidona), apresenta valores de phi restritos entre 50° e -90°.

Segundo os parâmetros relativos à cadeia principal adotados como referência pelo programa, ambos os modelos foram considerados dentro da normalidade (Figuras 46 e 47), assumindo uma resolução média de 2.5 Å. Não houve indicação de posicionamento incorreto de resíduos no molde ou no modelo.

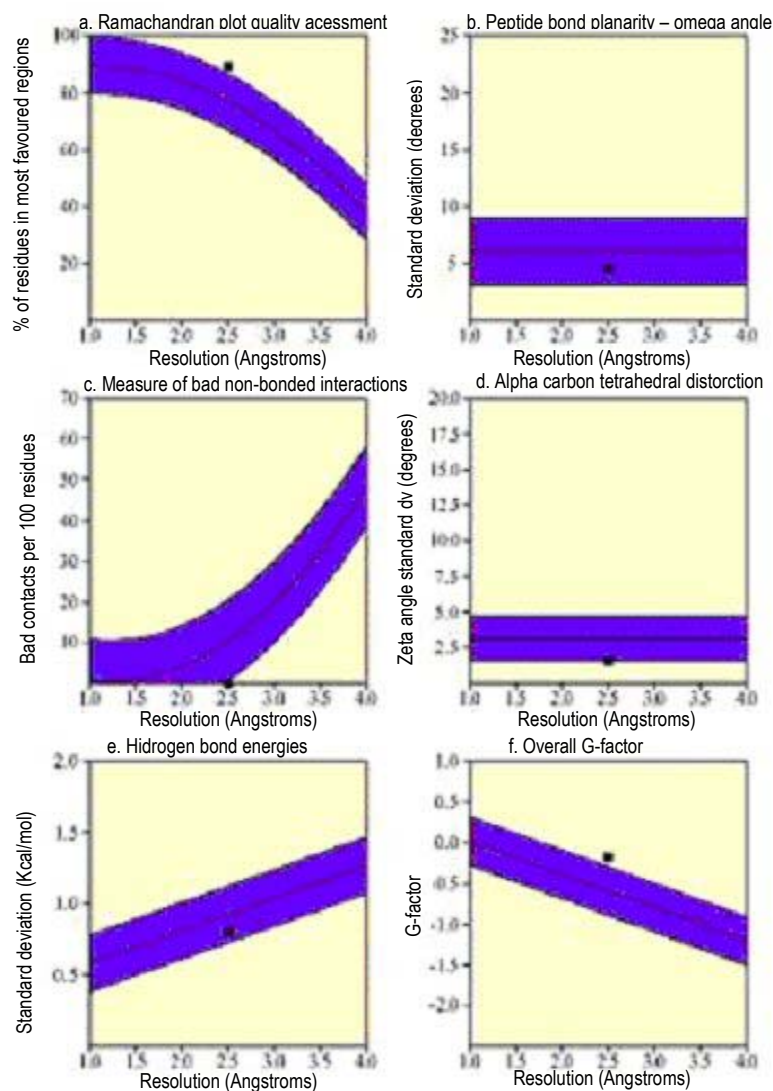
Main-chain parameters TSV-PA



Plot statistics						
Stereochemical parameter	N° of data pts	Parameter value	Comparison values		N° of band widths from mean	
			Typical value	Band Width		
a. % of residues in A,B,L	196	80.7	76.6	10.0	0.7	Inside
b. Omega angle st dev	232	1.5	6.0	3.0	-1.5	BETTER
c. Bad contacts/100 residues	0	0.0	10.5	10.0	-1.1	BETTER
d. Zeta angle st dev	212	1.7	3.1	1.6	-0.9	Inside
e. H-bond energy st dev	129	0.8	0.9	0.2	-0.8	Inside
f. Overall G-factor	234	0.2	-0.6	0.3	2.7	BETTER

FIGURA 46 – Resultados da avaliação do programa PROCHECK para a cadeia principal do molde (TSV-PA).

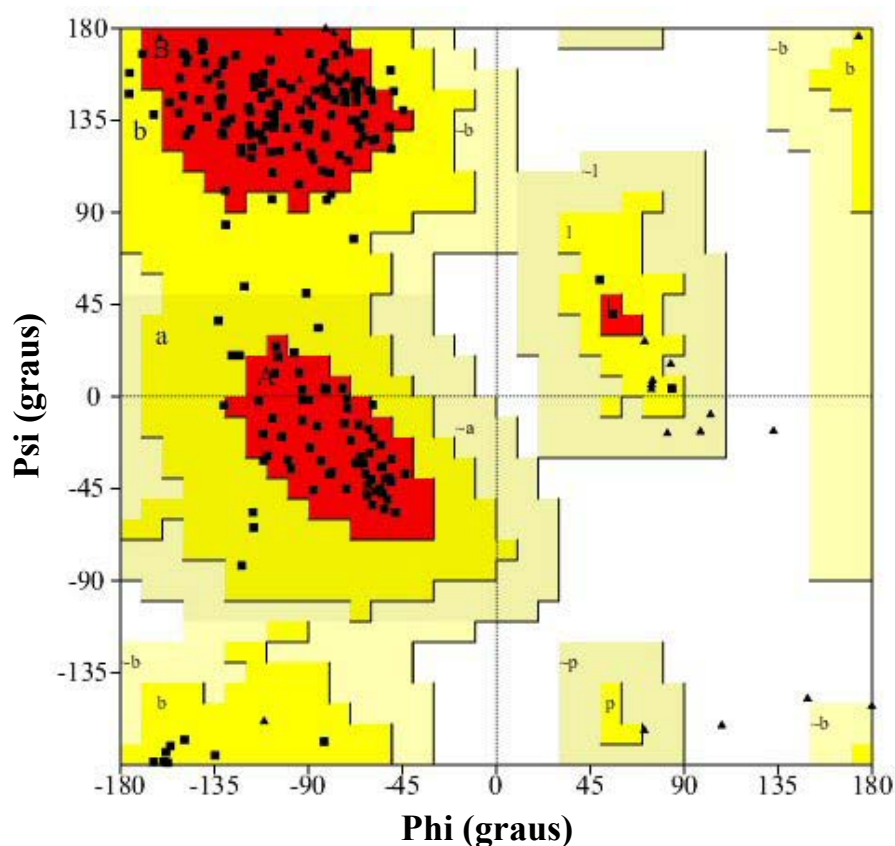
Main-chain parameters BthaTL



Stereochemical parameter	N° of data pts	Plot statistics				N° of band widths from mean	
		Parameter value	Comparison values		Typical value	Band Width	
a. % of residues in A,B,L	191	89.0	76.6	10.0		1.2	BETTER
b. Omega angle st dev	231	4.5	6.0	3.0		-0.5	Inside
c. Bad contacts/100 residues	0	0.0	10.5	10.0		-1.1	BETTER
d. Zeta angle st dev	212	1.6	3.1	1.6		-1.0	Inside
e. H-bond energy st dev	121	0.8	0.9	0.2		-0.6	Inside
f. Overall G-factor	233	-0.2	-0.6	0.3		1.4	BETTER

FIGURA 47 – Resultados da avaliação do programa PROCHECK para a cadeia principal do modelo (BthaTL).

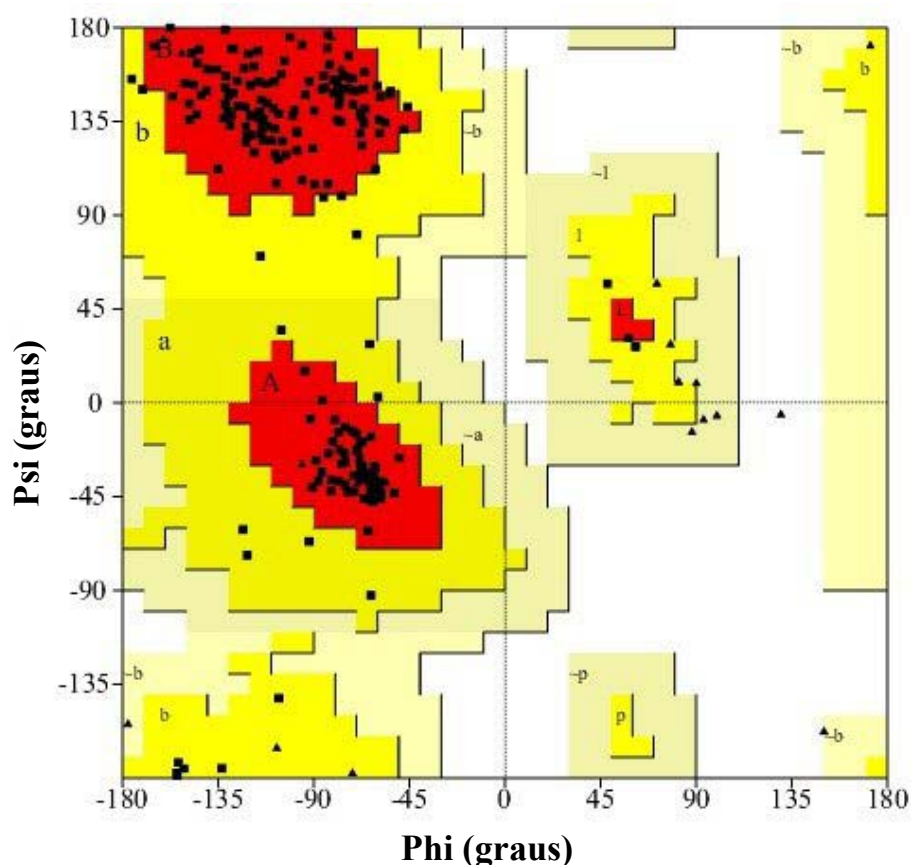
O diagrama de Ramachandran referente ao molde apresentou 83,7% dos resíduos nas regiões mais favoráveis, 16,3% em regiões permitidas e nenhum resíduo em regiões generosamente permitidas ou em regiões não permitidas (Figura 48).



Estatísticas de plotagem		
Resíduos nas regiões mais favoráveis [A,B,L]	164	83.7%
Resíduos nas regiões permitidas [a,b,l,p]	32	16.3%
Resíduos nas regiões generosamente permitidas [-a,-b,-l,-p]	0	0.0%
Resíduos nas regiões não permitidas	0	0.0%
Resíduos exceto glicinas (triângulos) e prolinas	196	100.0%
Número total de resíduos	234	

FIGURA 48 – Diagrama de Ramachandran resultante da avaliação do programa PROCHECK para o molde (TSV-PA).

Para o modelo, foram plotados 89% dos resíduos em regiões mais favoráveis, 11% em regiões permitidas e nenhum resíduo em regiões generosamente permitidas ou em regiões não permitidas (Figura 49).



Estatísticas de plotagem		
Resíduos nas regiões mais favoráveis [A,B,L]	170	89.0%
Resíduos nas regiões permitidas [a,b,l,p]	21	11.0%
Resíduos nas regiões generosamente permitidas [-a,-b,-l,-p]	0	0.0%
Resíduos nas regiões não permitidas	0	0.0%
Resíduos exceto glicinas (triângulos) e prolinas	191	100.0%
Número total de resíduos	233	

FIGURA 49 – Diagrama de Ramachandran resultante da avaliação do programa PROCHECK para o modelo (BthaTL).

RECONSTRUÇÃO FILOGENÉTICA

A análise filogenética usando os métodos de parcimônia e de distância entre as seqüências (Figura 50) teve como ponto de partida o alinhamento das 12 serinopeptidases de peçonhas ofídicas com calicreína, tripsina e trombina no programa ClustalW. A tripsina foi definida como grupo externo (“outgroup”) por ser a seqüência mais divergente.

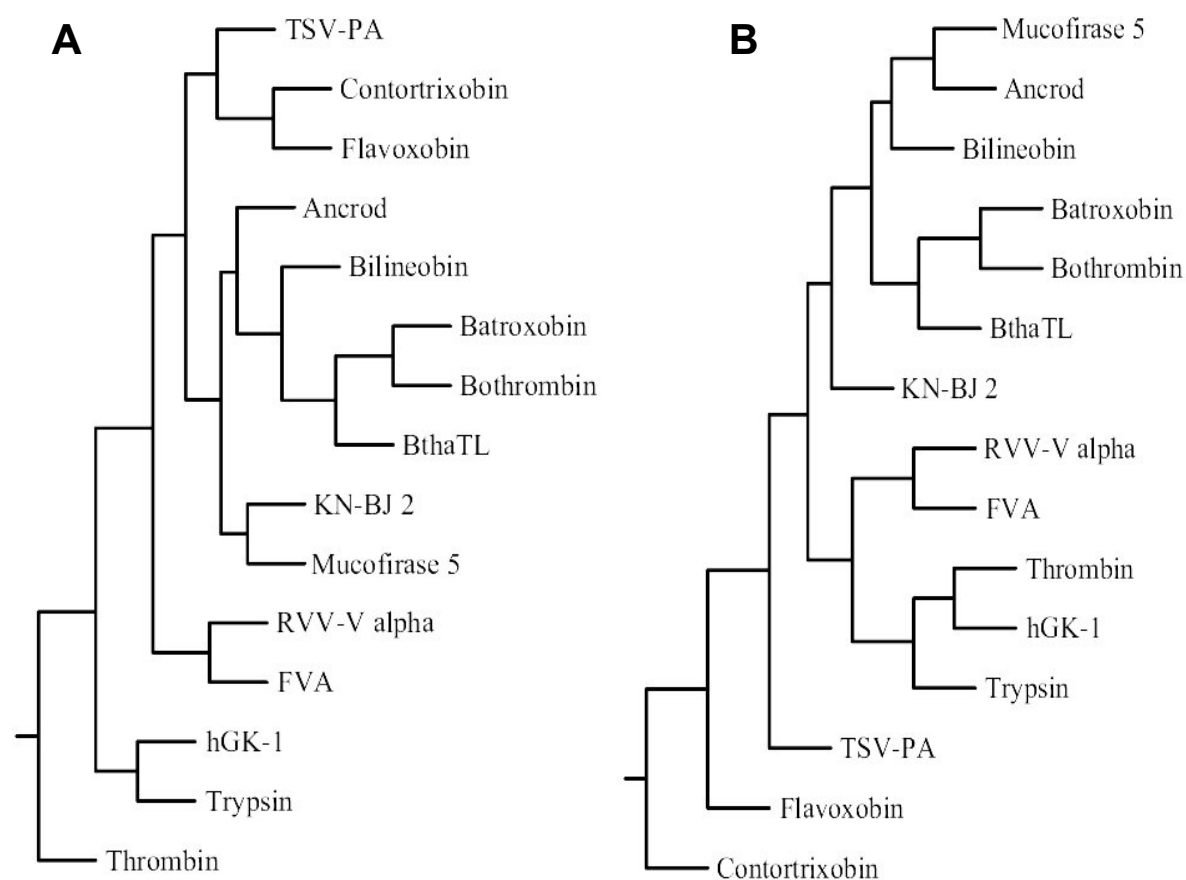


FIGURA 50 – Árvores construídas a partir da reconstrução filogenética das seqüências de 12 serinopeptidases de peçonhas ofídicas, calicreína (hGK-1), tripsina e trombina usando o programa Phylip. (A) Árvore filogenética mais parcimoniosa. (B) Árvore filogenética baseada na distância entre as seqüências.

O alinhamento múltiplo das 15 serinopeptidases foi então lançado no programa Gblocks, que eliminou regiões pobremente alinhadas, definindo um total de 180 resíduos (65% da extensão original) a serem evolutivamente relacionados.

A investigação do sinal filogenético e da porcentagem de caracteres indicativos de parcimônia com o programa Paup determinou que os dados eram passíveis de análise filogenética. Foram encontrados 101 (56,11%) caracteres indicativos de parcimônia para as serinopeptidases.

O estudo evolutivo mostrou que os dois métodos utilizados para a construção das árvores geraram resultados distintos, ainda que coincidentes em alguns pontos. Cabe ao bom senso do pesquisador interpretar os resultados fornecidos pelas análises, levando em consideração as tendências e os dados evolutivos disponíveis na literatura.

DISCUSSÃO

Este trabalho submeteu a proteína recombinante BthaTL a dois tipos distintos de análise: a biológica e a teórica. Para um melhor entendimento, a discussão será dividida em dois tópicos correspondentes às análises efetuadas.

ANÁLISE BIOLÓGICA

Consistiu na clonagem, subclonagem, expressão, purificação parcial, renaturação e ensaios preliminares de atividade objetivando a caracterização da BthaTL recombinante, uma serinopeptidase com potencial ação no sistema hemostático de mamíferos.

O rendimento da extração do RNA total da glândula de peçonha da serpente *Bothrops alternatus* foi considerado excelente, uma vez que outros tecidos homogeneizados da mesma forma em nosso laboratório forneceram uma quantidade bastante inferior deste ácido nucléico. Certamente contribuíram para o bom rendimento o fato da glândula ser composta por tecidos muito sensíveis, facilmente homogeneizáveis, e também a iniciativa de retirar a peçonha da serpente 3 dias antes da extração da glândula. Na ausência dos componentes protéicos da peçonha, os genes das células glandulares foram incentivados a se expressarem, produzindo grande quantidade de RNAs.

Segundo Swartz (2001), *Escherichia coli* é a principal bactéria escolhida para a clonagem de genes e para a expressão de proteínas recombinantes. Sistemas bacterianos de expressão heteróloga costumam ser de fácil manipulação, apresentando baixo custo operacional e bom rendimento, especialmente num laboratório com infra-estrutura já adaptada a todas as etapas do processo. Por estes motivos optou-se pela subclonagem do cDNA amplificado a partir dos primers específicos para serinopeptidases de peçonhas ofídicas no vetor de expressão pET-28a, originando o vetor pBthaTL, com o qual foram transformadas bactérias da linhagem BL21(DE3) de *E. coli*.

O grande porém é que a utilização desse sistema bacteriano visando a expressão de serinopeptidases de peçonhas ofídicas pode levar a dois problemas com sérias restrições associadas.

O primeiro problema, totalmente desanimador, é a ausência de produtos de expressão, provavelmente devido à formação de estruturas secundárias no RNA mensageiro.

O segundo problema, que pode ser revertido, é a formação de corpos de inclusão, agregados protéicos insolúveis derivados da elevada concentração da proteína heteróloga no citoplasma bacteriano, o que favorece interações eletrostáticas e hidrofóbicas intramoleculares e leva à perda da atividade biológica.

A ocorrência dos agregados protéicos torna necessárias etapas subseqüentes para a recuperação da proteína de interesse em sua forma solúvel e ativa, o que reduz significativamente o rendimento da expressão. Por outro lado, de acordo com a versão mais atualizada do manual do sistema pET (2003), pode-se obter uma elevada quantidade da proteína de interesse com relativo grau de pureza via centrifugação. Além disso, a proteína em corpos de inclusão não sofre degradação proteolítica e, quando tóxica, sua inatividade impede prejuízos ao crescimento bacteriano.

A BthTL, como as demais serinopeptidases de peçonhas ofídicas já descritas, apresenta 12 resíduos de cisteína que formam 6 pontes dissulfeto estáveis em condições biológicas normais, e o enovelamento incorreto destas proteínas no citoplasma bacteriano pode levá-las à degradação ou à acumulação na forma de corpos de inclusão. Maeda *et al.* (1991), Fan *et al.* (1999), Pan *et al.* (1999) e Selistre-de-Araújo *et al.* (2000) verificaram que ensaios de re-enovelamento (“refolding”) de proteínas com muitas pontes dissulfeto geralmente apresentam baixa eficiência, por causa da formação inapropriada de pontes, o que gera produtos finais com pouca ou nenhuma atividade específica.

Adicionalmente, sistemas bacterianos de expressão não apresentam mecanismos que promovem modificações protéicas pós ou co-traducionais. Este problema é minimizado pelo fato da BthTL não requerer tantas modificações importantes durante e após ser sintetizada (Figura 39).

A amplificação do cDNA de interesse, posteriormente reamplificado objetivando um melhor rendimento, originou uma banda com os 800 pb esperados para cDNAs codificantes de serinopeptidases de peçonhas ofídicas somados aos nucleotídeos contidos nos primers (Figuras 29 e 30).

No processo de ligação do cDNA de interesse aos plasmídeos pGEM®-T Easy e pET-28a, foram testadas proporções distintas de inserto e vetor, uma vez que falta ou excesso de um dos dois componentes inibe a reação (Sambrook *et al.*, 1989). A proporção ideal obtida em ambos os casos foi de 3:1 (inserto:vetor), como pode ser observado nas Figuras 31 e 32.

O seqüenciamento do cDNA clonado no vetor pGEM®-T Easy e subclonado no vetor pET-28a (Figura 33) comprovou que a ligação ocorreu na fase de leitura correta e que não foram geradas mutações durante o processo de amplificação. A única modificação induzida foi o acréscimo planejado de um peptídeo de fusão contendo a cauda de histidina na região 5' do cDNA, o que viabilizaria a purificação da proteína recombinante expressa em bactérias por meio de uma resina de afinidade.

O novo plasmídeo formado (pBthaTL), após ser inserido em células da linhagem BL21(DE3) de *E. coli*, mostrou-se eficiente na produção da proteína heteróloga (Figura 34), a qual era expressa principalmente na forma de corpos de inclusão depositados no citoplasma bacteriano. O tratamento do primeiro precipitado com uréia a 6M solubilizou grande parte desses corpos de inclusão, constituindo a fração S2, sendo que os remanescentes se acumularam no precipitado final.

A aplicação de S2 na resina de cobalto proporcionou a purificação parcial da proteína recombinante, uma vez que foram obtidos simultaneamente à passagem do tampão de eluição da coluna alguns contaminantes de menor peso molecular (Figura 35). Provavelmente, estas pequenas moléculas possuem alguns resíduos próximos de histidina em sua estrutura. Ao interagirem com o cobalto da resina, tais resíduos podem ter determinado a retenção prolongada das proteínas, só liberadas a partir da competição direta com imidazol a 1M.

O rendimento máximo da proteína desnaturada por litro de cultura bacteriana foi estimado em 1,0 mg. Um valor considerado razoável quando comparado com outros trabalhos (Selistre-de-Araújo *et al.*, 2000; Ramos, 2001).

O tratamento da proteína de interesse com uréia teve ação desnaturante. Visando devolver para a BthaTL recombinante sua conformação nativa, foi realizada uma diálise em três etapas. Inicialmente a quantidade de uréia foi reduzida pela metade (3M), em seguida utilizou-se uma solução de uréia a 1M, e finalmente a solução contendo a proteína foi dialisada contra água.

Esperava-se que a retirada do agente desnaturante se mostrasse suficiente para que os doze resíduos de cisteína da serinopeptidase em questão se pareassem de modo correto, formando seis pontes dissulfeto. Entretanto, a BthaTL não mostrou ação enzimática sobre o fibrinogênio bovino, contrariando as expectativas em relação a um potencial agente desfibrinogenante, e nem sobre a caseína (Figura 37).

A ausência de precipitado na solução dialisada é uma forte evidência de que as moléculas protéicas não estavam mal enoveladas, mas especula-se que o protocolo de re-enovelamento por meio da retirada gradual do agente desnaturante sob temperatura controlada não tenha sido suficiente para devolver à molécula a conformação nativa na qual ela apresenta menor energia, o que corresponderia ao seu enovelamento mais estável e funcional.

Em experimentos futuros, o aumento do intervalo de tempo para cada diálise de 1 hora para 4 horas poderia melhorar a eficiência do processo de re-enovelamento. Além disso, uma dosagem de uréia ao final da diálise pode determinar se o agente desnaturante foi plenamente eliminado da solução protéica.

Uma alternativa para investigar mais profundamente a ausência de atividade demonstrada pela proteína recombinante é submetê-la, em solução, a uma análise por dicroísmo circular (CD). Essa técnica detecta mudanças conformacionais em macromoléculas como proteínas, e consiste na diferença de absorção da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita pelos resíduos de aminoácidos, que são moléculas quirais. Ela poderá fornecer informações úteis em relação ao estado de enovelamento da BthaTL aplicada nos ensaios *in vitro*.

Outra hipótese que pode explicar a inatividade da proteína recombinante é que a presença do peptídeo de fusão, formado por 35 resíduos de aminoácidos, tenha interferido no rearranjo tridimensional da molécula, anulando sua atividade. Embora não existam resíduos de cisteína neste peptídeo de fusão, outros resíduos poderiam ter se combinado espacialmente com aqueles que integram a proteína de interesse, criando impedimentos estéricos para a interação proteína-substrato.

Diante da ausência de atividade, foram realizadas outras tentativas para caracterizar biologicamente a proteína em estudo como uma serinopeptidase. No primeiro experimento, a BthaTL foi transferida para uma membrana de PVDF objetivando o seqüenciamento de sua região N-terminal, mas não foi gerado sinal no seqüenciador, provavelmente devido à reduzida quantidade de proteína presente na membrana.

Num segundo experimento, a BthaTL foi reconhecida pelo anticorpo policlonal produzido a partir da Batroxobina, uma serinopeptidase nativa homóloga isolada da peçonha de *Bothrops moojeni* (Figura 36, setas vermelhas).

Lipps (2000) afirmou que numerosos pesquisadores vêm descrevendo o reconhecimento cruzado de toxinas de peçonhas de serpentes por anticorpos desde 1902. Optou-se pela imunodeteção da proteína com anticorpos policlonais pelas vantagens técnicas a eles associadas, como o baixo custo de produção (comparativamente ao elevado custo da tecnologia dos anticorpos monoclonais), a vasta quantidade de anticorpos policlonais (aproximadamente 10 mg/ml) gerados pelo soro de um único animal imunizado e pelo fato de anticorpos policlonais com alta afinidade poderem ser isolados de 2 a 3 meses após a imunização inicial, o que permite estudos rápidos. Entretanto, numa perspectiva científica, anticorpos policlonais mostram algumas desvantagens, sendo a principal delas o fato de consistirem numa mistura de anticorpos, alguns específicos contra o antígeno utilizado na imunização, e os remanescentes derivados de outros antígenos aos quais o animal foi exposto durante a sua vida.

Assim, a detecção de outras bandas além daquela de interesse nas frações T0, T3, S1, S2 e Pellet e EB1x (Figura 36) era esperada, uma vez que camundongos e outros roedores possuem anticorpos naturais contra proteínas de *Escherichia coli*,

bactérias que naturalmente habitam seu trato gastrointestinal. Este problema pode ser evitado em reações posteriores com a diluição do anticorpo e/ou seu tratamento com extrato bacteriano. Já no caso da intensa reação observada para Batrox e PB (Figura 36), é provável que a concentração de proteínas aplicadas em cada amostra fosse bastante elevada, gerando a impressão de um “arraste”.

Futuramente serão testados outros protocolos de re-enovelamento que efetivamente atuem a proteína em questão, capacitando-a a atuar pelo menos sobre alguns dos substratos testados. Somente assim será possível determinar com exatidão o papel biológico desta proteína recombinante, sobre o qual foram geradas algumas suposições a partir das análises teóricas realizadas neste mesmo trabalho.

ANÁLISE TEÓRICA

O propósito inicial das análises teóricas da BthaTL era a obtenção de informações estruturais e funcionais extras que pudessem corroborar ou acrescentar aos dados fornecidos pelos testes biológicos. Em virtude das muitas dificuldades encontradas na parte experimental, descritas no tópico anterior, as análises computacionais se tornaram protagonistas deste trabalho.

Atualmente, a Bioinformática é uma das áreas que maior interesse desperta no mundo das pesquisas biológicas, especialmente por permitir análises rápidas e apuradas de dados obtidos em laboratório. A grande vantagem para o pesquisador que utiliza os recursos virtuais reside na economia de tempo e na confiabilidade dos resultados fornecidos para uma determinada análise.

A utilização de ferramentas da Bioinformática tornou possível a construção de um modelo tridimensional para a proteína recombinante BthaTL, cuja sequência mostrou elevada identidade com diversas serinopeptidases de peçonhas ofídicas com ação semelhante à da trombina (Tabela 07).

Como molde, foi selecionada a molécula da TSV-PA, a primeira serinopeptidase de peçonhas ofídicas a ser cristalizada em laboratório (Parry *et al.*, 1998). Segundo a revisão recente de Castro *et al.* (2004), esta continua sendo a

única estrutura cristalográfica confiável já obtida para a família de enzimas em questão. Dentre as razões que podem explicar a falta de outros modelos, está a existência de uma grande quantidade de isoformas de serinopeptidases nas peçonhas de serpentes, o que dificulta enormemente a purificação completa de uma única enzima que possa ser utilizada em ensaios bem sucedidos de cristalização.

A TSV-PA é uma serinopeptidase da peçonha de *Trimeresurus stejnejeri* que ativa o plasminogênio por meio da quebra enzimática da ligação peptídica existente entre os resíduos Arg561 e Val562. Ela não coagula ou degrada o fibrinogênio, e nem ativa ou degrada o fator X da coagulação, a protrombina ou a proteína C (Zhang *et al.*, 1995). Sua atuação específica sobre o plasminogênio não tem precedentes na subfamília das serinopeptidases de peçonhas ofídicas, sendo responsável pelo efeito *in vitro* observado para a peçonha bruta (Zhang *et al.*, 1993).

O cristal da TSV-PA permitiu a confirmação de muitas hipóteses que tentavam descrever a estrutura das serinopeptidases de peçonhas ofídicas, como o pareamento ordenado dos 12 resíduos de cisteína, formando 6 pontes dissulfeto conservadas, e o enovelamento β/β hidrolase. Além disso, mutações sítio-dirigidas promovidas por Zhang *et al.* em 1997 permitiram a investigação de resíduos com papel essencial no reconhecimento e na clivagem dos substratos. Este conjunto de informações passou a ser utilizado na determinação de modelos moleculares para outras serinopeptidases do mesmo grupo (Silva Jr. & De Simone, 2004).

De acordo com a minuciosa avaliação realizada pelos programas PROCHECK e WHAT IF, a modelagem molecular da BthaTL (Figuras 40 a 45) resultou em um modelo final considerado totalmente compatível com o que é freqüentemente encontrado em proteínas (Tabelas 09 e 10, Figuras 46 a 49). A única exceção consistiu no resíduo Asp005 (Figura 40), cujo desvio excepcional da média (-3.210) pode ser facilmente interpretado como uma herança do molde, uma vez que a posição cinco da seqüência primária da TSV-PA também é ocupada por um aspartato, com desvio excepcional da média calculado de -2.952. Este resíduo está situado na superfície de ambas as cadeias polipeptídicas, mais exposto a potenciais interações com ligantes, íons e mesmo com o solvente, as quais podem alterar de forma significativa os valores dos parâmetros verificados pelo programa.

Assim como ocorre com a TSV-PA, a estrutura da BthaTL é formada por dois grupos de seis folhas β conectadas por três segmentos trans, mostrando o enovelamento típico das serinopeptidases semelhantes à quimiotripsina. A superfície contém alças (“loops”), além de duas pequenas α -hélices derivadas das interações entre os resíduos 165-173 e 235-244 (Figuras 38 e 41). A cavidade do sítio ativo e os resíduos catalíticos estão situados na junção dos dois domínios de folhas β , os quais podem ter sido originados por um processo de duplicação gênica (Bell *et al.*, 1984).

Os doze resíduos de cisteína, que apresentam o grupo tiol ($-\text{SH}$) em seu radical lateral, são altamente conservados nas SVTLEs e estão envolvidos na formação das 6 pontes dissulfeto que participam da determinação do enovelamento da BthaTL, nas posições 22-157, 42-58, 91-245e, 136-201, 168-182 e 191-220 (Figuras 38 e 42).

O alinhamento estrutural mostrou que a topologia da BthaTL é bastante similar à da TSV-PA (Figura 40). A sobreposição ótima das duas moléculas resultou numa raiz quadrada média calculada de 0.88 Å, o que está de acordo com as relações evolutivas estabelecidas para este grupo de enzimas.

Uma comparação das estruturas primárias de 30 SVTLEs com as serinopeptidases “clássicas” realizada por Castro *et al.* em 2004 revelou que a tríade catalítica corresponde à região mais conservada entre elas. As SVTLEs apresentam baixa identidade com a trombina (26 a 33%), apesar de serem funcionalmente análogas a ela. A identidade dessas enzimas é maior com a calicreína (34 a 40%) e à altamente inespecífica tripsina (31 a 44%).

O alinhamento múltiplo das seqüências de algumas serinopeptidases de peçonhas ofídicas, incluindo a BthaTL, e outras serinopeptidases clássicas (figura 38) mostrou que, excetuando-se o caso da α -trombina, o número de inserções e deleções encontradas foi pequena. A identidade da BthaTL com a calicreína glandular se mostrou bem maior que com a α -trombina (Tabela 07), corroborando com as hipóteses de que as enzimas trombina-símile são denominadas de acordo com sua ação, por exemplo clivando o fibrinogênio, e não com sua estrutura (Earps & Shoolingin-Jordan, 1998) e de que as glândulas de peçonha das serpentes se

formaram a partir de glândulas salivares ricas em serinopeptidases, principalmente em calicreínas, cabendo a estas proteínas o papel de ancestral molecular das SVTLEs (Bode & Chen, 1983).

Os sete últimos resíduos de aminoácidos são bastante conservados nas serinopeptidases de peçonhas ofídicas, ainda que não apareçam nas seqüências das serinopeptidases clássicas. Essa extensão C-terminal da BthaTL é covalentemente ligada ao corpo da enzima por uma ponte dissulfeto também conservada (Cys91-Cys245e). Os resíduos 245c-245g estão arranajados numa fita estendida anti-paralela aos resíduos 235-244 da α -hélice C-terminal (Figura 42). A Pro245g forma uma ponte salina com o grupo amino distal da Lys101. Outra ponte salina, considerada essencial na estabilização do sítio ativo da BthaTL, é formada entre o grupo α -amino do resíduo N-terminal Val16 e o grupo carboxila da cadeia lateral do Asp194.

A TSV-PA apresenta uma ponte salina extra, formada entre os resíduos Asp97 e Arg174, que foi apontada por Zhang *et al.* em 1997 como crucial para a atividade plasminogenolítica. O alinhamento das seqüências mostra que os dois resíduos foram substituídos nas outras serinopeptidases de peçonhas ofídicas comparadas, as quais não atuam sobre o plasminogênio. No caso da BthaTL, a posição 97 é ocupada por uma tirosina (Figura 44), que não forma uma ponte salina com o resíduo 174, representado por uma leucina.

Na estrutura desta proteína estão conservadas outras posições importantes para a eficiência da atividade proteolítica, como os resíduos da tríade catalítica (His57, Asp102 e Ser195) e os sítios de especificidade primário (S1=Asp189), secundário (S2=Gly216) e terciário (S3=Ala226) (figura 45). O Asp189 se localiza no fundo da bolsa catalítica, posicionado para estabelecer uma ponte salina com o resíduo básico P1 de substratos ou inibidores, assim como é verificado para a trombina e a tripsina. Gly216 e Ala226 também aparecem na trombina e na tripsina, permitindo o acesso de cadeias laterais volumosas à base do sítio catalítico.

Conforme mostrado na Figura 45, a BthaTL apresenta três alças de superfície (alças 1, 2 e 3) flanqueando o sítio ativo, responsáveis diretas pelo reconhecimento do substrato.

Uma das posições integrantes da alça 1 é ocupada pela Thr190, resíduo polar capaz de formar pontes de hidrogênio, também presente na tripsina. A trombina, por sua vez, apresenta uma alanina nesta mesma posição (Figura 45). Tais similaridades entre BthaTL e tripsina sugerem uma especificidade por substratos semelhante nas duas moléculas.

Na alça 2 destacam-se as posições 215 e 217, representadas respectivamente pelos resíduos triptofano e glicina, tanto na TSV-PA quanto na BthaTL. Geralmente a primeira posição é conservada, mas ambas possuem extrema importância na interação da trombina com o fibrinogênio. Substituições não conservativas do primeiro resíduo mencionado podem comprometer, portanto, a especificidade e a eficiência do mecanismo catalítico nesta família de serinopeptidases.

A sobreposição da BthaTL e da TSV-PA (Figura 44) destacou a substituição da posição 193, situada na alça 1, que na TSV-PA é ocupada por uma fenilalanina diretamente envolvida na atividade catalítica preferencial sobre o plasminogênio, restringindo a interação da molécula com inibidores como o BPTI (Parry *et al.*, 1998; Wisner *et al.*, 2000). Na BthaTL, essa posição é ocupada por uma glicina, que favorece o acesso de substratos maiores ao sítio ativo da molécula, provavelmente sem interferir diretamente em sua atividade catalítica. O mesmo pode ser inferido para a substituição do triptofano que ocupa a posição 173 da TSV-PA, na alça 3, por uma glicina na BthaTL (Figura 44).

Di Cera *et al.*, em 1997, mostraram que a superfície da trombina possui uma região básica essencial no reconhecimento do substrato e em sua posterior catálise, denominado sítio FRE (**F**ibrinogen **R**ecognition **E**xosite). Semelhantemente a outras SVTLEs, a superfície da BthaTL possui regiões ricas em resíduos positivos, além de sítios hidrofóbicos acessíveis a inibidores e substratos (Figura 43). Entretanto, testes realizados com a crotalase (Henschen-Edman *et al.*, 1999) e a LM-TL (Castro *et al.*, 2001) evidenciaram que os inibidores do sítio FRE não afetam a atividade catalítica destas enzimas, o que sugere que o papel dos resíduos básicos expostos na superfície das SVTLEs ainda precisa ser mais profundamente investigado.

Serinopeptidases que possuem uma tirosina ocupando a posição 225 sofrem regulação alostérica. A trombina é uma das enzimas que possuem esta vantagem evolutiva, tendo sua atividade aumentada na presença do íon sódio, o mais abundante nos fluidos extracelulares, onde a maioria das serinopeptidases atua *in vivo* (Guinto *et al.*, 1999). Assim como a tripsina e outras SVTLEs, a BthaTL possui uma prolina nesta posição, o que implica na perda da capacidade de distinguir cátions monovalentes.

Na BthaTL, os ligantes que poderiam coordenar a interação com íons cálcio (cadeias laterais dos resíduos 70 e 80 e grupos carboxila dos resíduos 72 e 75) não estão presentes ou adotam uma conformação desfavorável. Isto sugere que a enzima não seria afetada por elevadas concentrações de EDTA, um inibidor de metalopeptidases, corroborando com sua classificação no grupo das serinopeptidases de peçonhas ofídicas (Zhang *et al.*, 1997).

As perspectivas futuras desta análise computacional incluem simulações da relação enzima-inibidor (“docking”), visando investigar mais profundamente os resíduos e os tipos de interação realmente significativos na determinação das propriedades distintas do sítio ativo da BthaTL.

Conhecida a estrutura molecular da BthaTL, realizou-se um estudo teórico de suas propriedades físico-químicas e uma busca por motivos que pudessem interferir em sua atividade. Para tanto, foi desconsiderado o peptídeo de fusão acrescido pelo vetor de expressão pET-28a, o qual pode ser efetivamente removido da proteína recombinante a partir de uma clivagem proteolítica promovida pela trombina.

Castro *et al.* (2004) afirmaram que SVTLEs geralmente apresentam uma única cadeia polipeptídica formada por uma média de 235 resíduos de aminoácidos. Seu peso molecular está relacionado com o conteúdo de carboidratos, que pode variar de 0 a 30%, dependendo da proteína. Os sítios de glicosilação situam-se em posições não homólogas, e o papel da porção carboidrato destas enzimas ainda não está bem definido. Em alguns casos, ela pode estar associada à especificidade (Oyama & Takahashi, 2003) e em outros, com a estabilização da proteína (Henschen-Edman *et al.*, 1999).

A BthaTL possui 233 resíduos de aminoácidos (tabela 08), resultando numa massa molecular de aproximadamente 25.630 Da, sem levar em conta a porção carboidrato que provavelmente se liga à Asn145 na proteína nativa (Figura 39). Neste caso, a proteína poderia superar os 30 kDa, como ocorre com a Batroxobina, cuja massa molecular passa de 25.503 Da antes da glicosilação para 32.312 Da após o acréscimo da porção carboidrato (Earps & Shoolingin-Jordan, 1998).

A TSV-PA, com 26 resíduos negativamente carregados e 20 cargas positivas, é classificada como uma molécula relativamente ácida (Parry *et al.*, 1998). No caso da BthaTL, os 21 resíduos de aminoácidos positivamente carregados em pH fisiológico predominam sobre os 19 resíduos negativamente carregados, atribuindo à proteína um caráter básico (pI = 8.01).

A grande média de hidropaticidade calculada para a serinopeptidase da peçonha de *Bothrops alternatus* (Tabela 08) confirma o caráter polar da molécula, o que favorece sua solubilidade nos fluidos extracelulares.

Os resíduos de alanina, valina, leucina e isoleucina, dotados de cadeias laterais alifáticas, representam 26% do total de resíduos da BthaTL. O índice alifático calculado (83.22) sugere uma maior termoestabilidade para esta proteína globular.

A seqüência primária das serinopeptidases de peçonhas ofídicas fornece informações que permitem estimar a presença de motivos. As posições informativas não são necessariamente conservadas, variando de uma molécula para outra.

A busca de motivos na BthaTL (Figura 39) revelou potenciais sítios de fosforilação dependente de cAMP ou cGMP, por caseína quinase 2 (CK-2) e por proteína quinase C (PKC). Tais sítios são comuns em proteínas intracelulares, envolvidas em eventos de sinalização, mas é improvável que proteínas de peçonhas ofídicas, secretadas a partir das células glandulares, sofram esse tipo de regulação.

Também foram detectados potenciais sítios de N-miristoilação (Figura 39), um tipo de modificação co-traducional cuja função é aumentar a hidrofobicidade de proteínas citoplasmáticas, viabilizando sua ancoragem na porção interna da membrana celular (Rajala *et al.*, 2000). Esse tipo de modificação não deve ocorrer na BthaTL recombinante expressa em bactérias, uma vez que a N-miristoilação não foi verificada em organismos procariotos.

Além de caracterizar estruturalmente a BthaTL, as análises teóricas empreendidas neste trabalho subsidiaram propostas de relações evolutivas entre as diversas serinopeptidases comparadas (Tabela 07).

Considerando o número de espécies existentes e sua distribuição geográfica (Figura 07), as serpentes têm mostrado uma das mais bem-sucedidas irradiações adaptativas entre todos os vertebrados. Infelizmente, a notável similaridade anatômica por elas apresentada dificulta bastante a inferência filogenética entre as linhagens existentes. Muitas de suas adaptações morfológicas derivam da redução e da simplificação paralelas de estruturas ancestrais, e a homoplasia resultante complica a definição de caracteres evolutivamente informativos e de grupos externos. Diante dessas dificuldades, muitos pesquisadores têm recorrido às técnicas moleculares como recurso adicional para elucidar relações evolutivas (Keogh, 1998).

Segundo Perona & Craik (1997), a evolução está diretamente ligada à homologia, que significa identidade ou similaridade derivada de um ancestral comum. Deshimeru *et al.* (1996) compararam os genes de algumas serinopeptidases de peçonhas ofídicas, mostrando que as regiões codificantes são muito mais diversificadas que as não codificantes, e que substituições não conservativas de nucleotídeos ocorrem mais frequentemente do que as conservativas, sugerindo que as seqüências primárias das proteases de peçonhas ofídicas sofreram uma diversificação acelerada a partir de uma molécula ancestral com atividade específica.

É interessante notar, a partir da análise dos modelos da BthaTL (Figura 45) e da TSV-PA (Figura 44), que apenas um dos dois domínios que integram as serinopeptidases de peçonhas ofídicas concentra os resíduos de aminoácidos determinantes de sua especificidade e atividade. Segundo Lió & Goldman (1999), eventos de duplicação gênica comumente levam a substituições de resíduos de aminoácidos em posições estratégicas, sendo que a cópia do gene duplicado pode acumular um grande número de mutações, passando a determinar a especificidade da proteína por um substrato.

Em 2001, Krem & Di Cera propuseram uma classificação das serinopeptidases com base em marcadores moleculares, categorizando os três clãs

(quimiotripsina-símile, subtilisina-símile e com enovelamento do tipo alfa/beta hidrolase) de acordo com linhagens filogenéticas, indicando suas idades relativas e a ordem de aparecimento dessas linhagens. A subclasse das SVTLEs, assim como as serinopeptidases clássicas (trombina, tripsina e calicreína) apresentam os marcadores evolutivos primordiais (Ser195:TCN/Ser214:TCN/Pro225), o que sugere que elas pertencem à linhagem primordial das serinopeptidases, embora sejam agrupadas em subfamílias distintas. Árvores filogenéticas moleculares têm sido usadas para representar o passado evolutivo, assim como a probabilidade da existência de um único ancestral para as SVTLEs e para as serinopeptidases clássicas (Wang *et al.*, 2001). A topologia obtida para as duas árvores aqui apresentadas é congruente com essa hipótese do precursor comum.

De acordo com Itoh *et al.* (1998), os genes das SVTLEs, formados por cinco éxons e quatro íntrons, são membros da família gênica da tripsina/calicreína. A “enzima madura” é codificada pelos éxons 2 e 5. Apoiando esta afirmação, a árvore filogenética mais parcimoniosa (Figura 50A) aponta um ancestral comum hipotético para tripsina, calicreína e as SVTLEs.

A árvore obtida pelo segundo método, baseado na distância entre as seqüências (Figura 50B), mostra que as SVTLEs que ativam o fator V da coagulação compartilham um ancestral comum hipotético com as serinopeptidases clássicas, as quais teriam se originado posteriormente a SVTLEs como TSV-PA, Flavoxobina e Contortrixobina. Este resultado pode ser evolutivamente questionado, uma vez que tripsina e calicreína, enzimas que desempenham papéis essenciais nos organismos vertebrados em geral, são consideradas ancestrais em relação às SVTLEs.

A árvore obtida pelo primeiro método, baseado na parcimônia (Figura 50A), mostra um ancestral comum hipotético para Bothrombina e Batroxobina, duas SVTLEs que clivam preferencialmente a cadeia A α do fibrinogênio, e para a BthaTL.

A árvore de distância também aponta uma origem comum para o precursor da Bothrombina e da Batroxobina e para a BthaTL (Figura 50B).

Com algumas exceções, a maioria das enzimas de peçonhas ofídicas com ação trombina-símile não atua sobre outros fatores da cascata de coagulação além do fibrinogênio ou ativa apenas o fator XIII (Pirkle, 1998). Algumas delas também

induzem a agregação plaquetária, na presença ou na ausência de fibrinogênio exógeno, interagindo com os receptores da trombina PAR-1 e PAR-4. Este é o caso da Bothrombina, a enzima que apresentou maior identidade com a BthaTL (Tabela 07). Assim como a Bothrombina, outras SVTLEs têm especificidade por mais de um substrato, graças ao seu enovelamento e a peculiaridades estruturais.

Curiosamente, em ambas as árvores podem ser verificadas moléculas derivadas de um mesmo ancestral hipotético direto atuando preferencialmente sobre cadeias distintas do fibrinogênio. Como exemplos, podem ser apontadas na árvore mais parcimoniosa (Figura 50A) a Contortrixobina (B β fibrinogenase) e a Flavoxobina (A α fibrinogenase), e na árvore baseada na distância entre as seqüências (Figura 50B), a Mucofirase 5 (B β fibrinogenase) e a Ancrod (A α fibrinogenase). É bem provável que a diferenciação na atividade fibrinogenolítica tenha ocorrido de forma independente nas diversas espécies comparadas.

Contortrixobina e Bothrombina, duas SVTLEs que ativam o fator XIII da coagulação, não compartilham um ancestral comum hipotético imediato em nenhuma das árvores, levando a crer que a origem desta atividade também foi independente nas moléculas citadas. Por outro lado, ambas as árvores mostram que FVA e RVV-V α , enzimas ativadoras do fator V da coagulação, apresentam elevada similaridade em suas seqüências primárias, derivando de um mesmo precursor hipotético.

A literatura aponta que a divergência evolutiva na especificidade das SVTLEs por um substrato não está relacionada com os resíduos altamente conservados da fenda catalítica, diretamente envolvidos na função enzimática (His57, Asp102 e Ser195), e sim com a substituição de resíduos considerados “material para a adaptação evolutiva”, situados às margens do sítio ativo, que podem interagir de forma única com porções específicas dos substratos (no caso da BthaTL, destacaram-se Gly173, Asp189, Thr190, Gly193, Ser214, Trp215, Gly216, Gly217, Pro225, Ala226). Os demais aminoácidos da molécula participam da determinação de sua estrutura tridimensional (Perona & Craik, 1997).

Desta forma, como a especificidade deste grupo de proteínas é determinada por um pequeno número de resíduos situados às margens da fenda catalítica, e não por todos os resíduos, torna-se evidente que o alto grau de identidade apresentado

por algumas das moléculas comparadas, embora seja responsável por um posicionamento evolutivo mais próximo, não é suficiente para garantir que elas clivem o mesmo substrato.

O uso da reconstrução filogenética de seqüências de proteínas de peçonhas na filogenia das serpentes ainda é questionado por pesquisadores que não crêem na possibilidade dessas toxinas, atuando em presas e predadores (e não no próprio organismo que as produz), constituírem táxons legitimamente informativos em estudos da evolução ofídica. Esta visão, entretanto, está sendo superada, uma vez que a análise filogenética das seqüências de proteínas de peçonhas, além de ser eficientemente aplicada na reconstrução da história evolutiva das famílias gênicas das toxinas (Fry *et al.*, 2003), vem sendo muito utilizada não de forma determinante, mas como informação adicional nos estudos filogenéticos das serpentes (Fry & Wuster, 2004).

Um dos resultados mais evidentes da análise aqui apresentada é que demonstra a eficiência dos métodos de reconstrução filogenética utilizados foi a disposição das serinopeptidases pertencentes à subfamília Viperinae (FVA e RVV-V α) em ramos independentes. O mesmo ocorreu com as três serinopeptidases não viperídicas (tripsina, calicreína e trombina). Este posicionamento evolutivo atribuído às moléculas, em concordância com a taxonomia tradicional das serpentes, é uma forte evidência de que os dados moleculares são recursos confiáveis na classificação dos organismos, complementando os dados morfológicos, anatômicos e fisiológicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAUSE, E. (1983) Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes. **Biochem. J.**, **209**, 331-336.
- BELL, G. I., QUINTO, C., QUIROGA, M., VALENZUELA, P., CRAIK, C. S. & RUTTER, W. J. (1984) Isolation and sequence of a rat chymotrypsin B Ec-3.4.21.1 gene. **J. Biol. Chem.**, **259**, 14265-14270.
- BODE, W. & CHEN, Z. (1983) The X-ray structures of porcine pancreatic kallikrein and of its complex with bovine pancreatic trypsin inhibitor. **Adv. Exp. Med. Biol.**, **156**, 289-308.
- BODE, W., TURK, D. & KARSHIKOV, A. (1992) The refined 1.9-Å X-ray crystal structure of D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone-inhibited human [α]-thrombin: structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure-function relationships. **Protein Sci.**, **1**, 426-471.
- BRADFORD, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye-binding. **Anal. Biochem.**, **72**, 248-254.
- BRANDEN, C. & TOOZE, J. (1991) **Introduction to protein structure**. New York, Garland Pub. Inc.
- Brasil. Ministério da Saúde. (2001) **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. Fundação Nacional de Saúde.
- CASTRESANA, J. (2000) Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. **Mol. Biol. Evol.**, **17**, 540-552.
- CASTRO, H. C., SILVA, D. M., CRAICK, C. & ZINGALI, R. B. (2001) Structural features of a snake venom thrombin-like enzyme: primary structure and evidence for a fibrinogen recognition exosite different from thrombin. **Thromb. Haemost.**, **81**, 81-86.

- CASTRO, H. C., ZINGALI, R. B., ALBUQUERQUE, M. G., PUJOL-LUZ, M. & RODRIGUES, C. R. (2004) Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. **Cell. Mol. Life Sci.**, **61**, 843-856.
- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal. Biochem.**, **162**, 156.
- CORPET, F. (1998) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Res.**, **16**, 10881-10890.
- DESHIMARU, M., OGAWA, T., NAKASHIMA, K. I., NOBUHISU, I., CHIJIWA, T., SHIMOHIGASHI, Y., FUKUMAKI, Y., NIWA, M., YAMASHINA, I., HATTORI, S. & OHNO, M. (1996) Accelerated evolution of crotalinae snake venom gland serine proteinases. **FEBS Lett.**, **397**, 83-88.
- DI CERA, E., DANG, Q. D. & AYALA, Y. (1997) Molecular mechanisms of thrombin function. **Cell. Mol. Life Sci.**, **53**, 701-730.
- EARPS, L. & SHOOLINGIN-JORDAN, P. M. (1998) Molecular modelling of Batroxobin on Kallikrein. **Biochem. Soc. Trans.**, **26**, 283.
- EDMAN, P. & BEGG, G. (1967) A protein sequenator. **Eur. J. Biochem.**, **1**, 80-91.
- FAN, C. Y., QIAN, Y. C., YANG, S. L., GONG, Y. (1999) Cloning, sequence analysis and expression in *E. coli* of the cDNA of the thrombin-like enzyme (Pallabin) from the venom of *Agkistrodon halys pallas*. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, **47**, 217-225.
- FELSENSTEIN, J. (1989) PHYLIP – Phylogeny Inference Package (version 3.2). **Cladistics**, **5**, 164-166.

- FERAMISCO, J. R., GLASS, D. B. & KREBS, E. G. (1980) Optimal spatial requirements for the location of basic residues in peptide substrates for the cyclic AMP-dependent protein kinase. **J. Biol. Chem.**, **255**, 4240-4245.
- FRY, B. G. & WÜSTER, W. (2004) Assembling an arsenal: origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences. **Mol. Biol. Evol.**, **21**, 870-883.
- FRY, B. G., WÜSTER, W., KINI, R. M., BRUSIC, V., KHAN, A., VENKATARAMAN, D. & ROONEY, A. (2003) Molecular evolution and phylogeny of elapid snake venom three finger toxins. **J. Mol. Evol.**, **57**, 110-129.
- GAVEL, Y. & VON HEIJNE, G. (1990) Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. **Protein Engineering**, **3**, 433-442.
- GLASS, D. B. & SMITH, S. B. (1983) Phosphorylation by cyclic GMP-dependent protein kinase of a synthetic peptide corresponding to the autophosphorylation site in the enzyme. **J. Biol. Chem.**, **258**, 14797-14803.
- GLASS, D. B., EL-MAGHRABI, M. R. & PILKIS, S. J. (1986) Synthetic peptides corresponding to the site phosphorylated in 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase as substrates of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. **J. Biol. Chem.**, **261**, 2987-2993.
- GRAND, R. J. A. (1989) Acylation of viral and eukaryotic proteins. **Biochem. J.**, **258**, 625-638.
- GUEx, N. & PEITSCH, M. C. (1996) Swiss PDB-Viewer: a fast and easy-to-use PDB viewer for Macintosh and PC. **Protein Data Bank Quarterly Newsletter**, **7**, 7.

- GUINTO, E. R., CACCIA, S., ROSE, T., FUTTERER, K., WAKSMAN, G. & Di CERA, E. (1999) Unexpected crucial role of residue 225 in serine proteases. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **93**, 10653-10656.
- GURUPRASAD, K., REDDY, B. V. & PANDIT, M. W. (1990) Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. **Protein Eng.**, **4** (2), 155-161.
- HENSCHEN-EDMAN, A. H., THEODOR, I., EDWARDS, B. F. & PIRKLE, H. (1999) Crotalase, a fibrinogen-clotting snake venom enzyme: primary structure and evidence for a fibrinogen recognition exosite different from thrombin. **Thromb. Haemost.**, **81**, 81-86.
- HUTTON, R. A. & WARRELL, D. A. (1993) Action of snake venom components on the haemostatic system. **Blood Reviews**, **7**, 176-189.
- IKAI, A. (1980) Thermostability and aliphatic index of globular proteins. **J. Biochem.**, **88**, 1895-1898.
- ITOH, N., TANAKA, N., MIHASHI, S. & YAMASHINA, I. (1987) Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for Batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. **J. Biol. Chem.**, **262** (7), 3132-3135.
- ITOH, N., TANAKA, N., FUNAKOSHI, I., KAWASAKI, T., MIHASHI, S. & YAMASHINA, I. (1998) Organization of the gene for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. Homology with the trypsin/kallikrein gene family. **J. Biol. Chem.**, **263**, 7628-7631.
- KEOGH, J. S. (1998) Molecular phylogeny of elapid snakes and a consideration of their biogeographic history. **Biol. J. Linn. Soc.**, **63**, 177-203.

- KISHIMOTO, A., NISHIYAMA, K., NAKANISHI, H., URATSUJI, Y., NOMURA, H., TAKEYAMA, Y. & NISHIZUKA, Y. (1985) Studies on the phosphorylation of myelin basic protein by protein kinase C and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. **J. Biol. Chem.**, **260**, 12492-12499.
- KREM, M.M & DI CERA, H. (2001) Molecular markers of serine protease evolution. **The EMBO Journal**, **20 (12)**, 3036-3045.
- KYTE, J. & DOOLITTLE, R. F. (1982) A simple method for displaying the hydrophatic character of a protein. **J. Mol. Biol.**, **157**, 105-132.
- LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, **227**, 680-685.
- LASKOWSKI, R. A. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **J. Appl. Cryst.** **26**, 283-291.
- LESK, A. M. & FORDHAM, W. D. (1996) Conservation and variability in the structures of serine proteinases of the chymotrypsin family. **J. Mol. Biol.**, **258**, 501-537.
- LIÒ, P. & GOLDMAN, N. (1998) Models of molecular evolution and phylogeny. **Genome Res.**, **8**, 1233-1244.
- LIPPS, B. V. & KHAN, A. A. (2000) Antigenic cross reactivity among the venoms and toxins from unrelated diverse sources. **Toxicon**, **38**, 973-980.
- MAEDA, M., SATOH, S., SUZUKI, S., NIWA, M., ITOH, N. & YAMASHINA, I. (1991) Expression of cDNA for Batroxobin, a Thrombin-Like Snake Venom Enzyme. **J. Biochem.**, **109**, 632-637.
- MARKLAND, F. S. (1998) Snake venom fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes: an updated inventory. **Thromb. Haemost.**, **79**, 668-674.

- MAROUN, R. C. (2001) Molecular basis for the partition of the essential functions of thrombin among snake venom serine proteinases. **Haemostasis**, **31**, 247-256.
- MARSHALL, R. D. (1972) Glycoproteins. **Annu. Rev. Biochem.** **41**, 673-702.
- MILETICH, J. P. & BROZE JR., G. J. (1990) Beta protein C is not glycosylated at asparagine 329. The rate of translation may influence the frequency of usage at asparagine-X-cysteine sites. **J. Biol. Chem.**, **265** (19), 11397-11404.
- OYAMA, E. & TAKAHASHI, H. (2003) Purification and characterization of a thrombin like enzyme, elegaxobin II, with Lysbradykinin releasing activity from the venom of *Trimeresurus elegans* (Sakishima-Habu). **Toxicon**, **41**, 559–568.
- PAN, H., DU, X. Y., YANG, G. Z., ZHOU, Y. C., WU, X. F. (1999) cDNA cloning and expression of Acutin, a thrombin-like enzyme from *Agkistrodon acutus*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **225**, 412-415.
- PARRY, M. A., JACOB, U., HUBER, R., WISNER, A., BON, C. & BODE, W. (1998) The crystal structure of the novel snake venom plasminogen activator TSV-PA: a prototype structure for snake venom serine proteinases. **Structure**, **6**, 1195-1206.
- PERONA, J. J. & CRAIK, C. S. (1997) Evolutionary divergence of substrate specificity within the chymotrypsin-like serine protease fold. **J. Biol. Chem.**, **272** (48), 29987-29990.
- pET System Manual. (2003) 10^a ed. Madison, WI, USA. **Novagen**, **68 p.**
- pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems Instruction Manual. (1999) Madison, WI, USA. **Promega**, **28 p.**

- PINNA, L. A. (1990) Casein kinase 2: an 'eminence grise' in cellular regulation? **Biochim. Biophys. Acta**, **1054**, 267-284.
- PIRKLE, H. (1998) Thrombin-like enzymes from snake venoms: An updated inventory. Scientific and Standardization Committee's Registry of Exogenous Hemostatic Factors. **Thromb. Haemost.**, **79**, 675-683.
- PLESS, D. D. & LENNARZ, W. J. (1977) Enzymatic conversion of proteins to glycoproteins. **PNAS**, **74** (1), 134-138.
- RAJALA, R. V. S., DATLA, R. S. S., MOYANA, T. N., KAKKAR, R., CARLSEN, S. A. & SHARMA, R. K. (2000) N-myristoyltransferase. **Mol. Cell. Biochem.**, **204**, 135-155.
- RAMACHANDRAN, G. N., RAMAKRISHNAN, C. & SASISEKHARAN, V. (1963) Stereochemistry of Polypeptide Chain Configurations. **J. Mol. Biol.**, **7**, 95-99.
- RAMOS, O. H. P. (2001) Produção de uma pró-metaloproteinase recombinante em bactéria, ativação in vitro e modelagem molecular. **Dissertação de mestrado (Universidade Federal de São Carlos)**, 118 p.
- SALI, A. & BLUNDELL, T. L. (1993) Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. **J. Mol. Biol.**, **234**, 779-815.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. (1989) **Molecular cloning. A laboratory manual**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S., DE SOUZA, E. L., BELTRAMINI, L. M., OWNBY, C. L. & SOUZA, D. H. (2000) Expression, refolding and activity of a recombinant nonhemorrhagic snake venom metalloprotease. **Protein Express. Purif.**, **19** (1), 41-47.

- SILVA JR., F. P. & DE-SIMONE, S. G. (2004) S1 subsite in snake venom thrombin-like enzymes: can S1 subsite lipophilicity be used to sort binding affinities of trypsin-like enzymes to small-molecule inhibitors? **Bioorg. Med. Chem.**, **12**, 2571-2587.
- SWARTZ, J. R. (2001) Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. **Curr. Opin. Biotechnol.**, **12**, 195-201.
- SWOFFORD, D. L., WADDELL, P. J., HUELSENBECK, J. P., FOSTER, P. G., LEWIS, P. O. & ROGERS, J. S. (2001) Bias in phylogenetic estimation and its relevance to the choice between parsimony and likelihood methods. **Syst. Biol.**, **50**, 525-539.
- TEBBE, U., GUENZLER, W. A., HOPKINS, G. R., GRZYMBOWSKY, T & BARTH, H. (1997) Thrombolytic therapy of acute myocardial infarction with saruplase, a single chain urokinase-type plasminogen activator (scu-PA) from recombinant bacteria. **Fibrin. Proteol.**, **11**, 45-54.
- THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G. & GIBSON, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.**, **22**, 4673-4680.
- TOWLER, D. A., GORDON, J. I., ADAMS, S. P. & GLASER, L. (1988) The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation. **Annu. Rev. Biochem.**, **57**, 69-99.
- TU, A. T. (1988) Snake venoms: General background and composition. In **Venoms: Chemistry and Molecular Biology**. John Wiley & Sons, New York, 1-19.
- VRIEND, G. (1990) WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. **J. Mol. Graph.** **8**, 52-56.

- WANG, Y. M., WANG, S. R. & TSAI, I. H. (2001) Serine protease isoforms of *Deinagkistrodon acutus* venom: cloning, sequencing and phylogenetic analysis. **Biochem. J.**, **354**, 161-168.
- WISNER, A., BRAUD, S. & BON, C. (2000) Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, **82**, 851-859.
- WOODGETT, J. R., GOULD, K. L. & HUNTER, T. (1986) Substrate specificity of protein kinase C. Use of synthetic peptides corresponding to physiological sites as probes for substrate recognition requirements. **Eur. J. Biochem.**, **161**, 177-184.
- ZHANG, Y., XIONG, Y. L. & BON, C. (1993) Effects of Chinese snake venoms on blood coagulation, coagulation factors and synthetic substrates. **Asiatic Herpetol. Res.**, **5**, 117-126.
- ZHANG, Y., WISNER, A., XIONG, Y. & BON, C. (1995) A novel plasminogen activator from snake venom. Purification, characterization, and molecular cloning. **J. Biol. Chem.**, **270** (17), 10246-10255.
- ZHANG, Y., WISNER, A., MAROUN, R. C., CHOURNET, V., XIONG, Y. & BON, C. (1997) *Trimeresurus stejnegeri* snake venom plasminogen activator. Site-directed mutagenesis and molecular modeling. **J. Biol. Chem.**, **272**, 20531-20537.

CONCLUSÕES GERAIS

► O seqüenciamento do cDNA revelou que o inserto, referente à “proteína madura” BthaTL (enzima com provável ação trombina-símile da peçonha de *Bothrops alternatus*), foi inserido na fase correta de leitura no vetor pET-28a, sem sofrer mutações derivadas da PCR.

► O sistema desenvolvido para a expressão da BthaTL se mostrou adequado, ao contrário dos procedimentos adotados para a sua purificação e re-novelamento. Maiores esforços deverão ser empreendidos na obtenção da proteína recombinante ativa, para que sua atividade possa ser efetivamente determinada.

► O alinhamento da seqüência da BthaTL com outras serinopeptidases de peçonhas ofídicas revelou elevada identidade (de 57 a 75%). O maior grau de identidade com uma serinopeptidase clássica (tripsina) foi de 38%.

► Foi construído um modelo molecular para a BthaTL com estrutura bastante similar à de outras enzimas da mesma subfamília. A qualidade atingida pelo modelo de acordo com os parâmetros de normalidade analisados foi satisfatória.

► Substituições não conservativas verificadas para a BthaTL em resíduos de aminoácidos-chave no reconhecimento do substrato pela TSV-PA indicam que as duas proteínas não compartilham a mesma atividade.

► Experimentos teóricos de reconstrução filogenética agruparam as enzimas não viperídicas e as viperínicas em ramos independentes àqueles onde foram posicionadas as enzimas crotalínicas, corroborando a classificação taxonômica das espécies de serpentes às quais pertencem as moléculas comparadas.

ANEXOS

ANEXO A – PARÂMETROS ESTEREOQUÍMICOS FREQUENTEMENTE ENCONTRADOS EM PROTEÍNAS

Stereochemical parameter	Mean value	Standard deviation
phi-psi in most favoured regions of Ramachandran plot	>90%	
chi1 dihedral angle:		
gauche minus	64.1 degrees	15.7 degrees
trans	183.6 degrees	16.8 degrees
gauche plus	-66.7 degrees	15.0 degrees
chi2 dihedral angle	177.4 degrees	18.5 degrees
Proline phi torsion angle	-65.4 degrees	11.2 degrees
Helix phi torsion angle	-65.3 degrees	11.9 degrees
Helix psi torsion angle	-39.4 degrees	11.3 degrees
chi3 (S-S bridge):		
right-handed	96.8 degrees	14.8 degrees
left-handed	-85.8 degrees	10.7 degrees
Disulphide bond separation	2.0A	0.1A
omega dihedral angle	180.0 degrees	5.8 degrees
Main-chain hydrogen bond energy (kcal/mol)*	-2.03	0.75
Calpha chirality: zeta "virtual" torsion angle (Calpha-N-C-Cbeta)	33.9 degrees	3.5 degrees

ANEXO B – DISTÂNCIAS DE LIGAÇÕES ATÔMICAS

Bond	X-PLOR labelling}		Value	sigma
C-N	C-NH1	(except Pro)	1.329	0.014
	C-N	(Pro)	1.341	0.016
C-O	C-O		1.231	0.020
Calpha-C	CH1E-C	(except Gly)	1.525	0.021
	CH2G*-C	(Gly)	1.516	0.018
Calpha-Cbeta	CH1E-CH3E	(Ala)	1.521	0.033
	CH1E-CH1E	(Ile,Thr,Val)	1.540	0.027
	CH1E-CH2E	(the rest)	1.530	0.020
N-Calpha	NH1-CH1E	(except Gly,Pro)	1.458	0.019
	NH1-CH2G*	(Gly)	1.451	0.016
	N-CH1E	(Pro)	1.466	0.015

ANEXO C – ÂNGULOS DE LIGAÇÕES FREQUENTEMENTE ENCONTRADAS EM PROTEÍNAS

Angle	X-PLOR labelling		Value	sigma
C-N-Calpha	C-NH1-CH1E	(except Gly,Pro)	121.7	1.8
	C-NH1-CH2G*	(Gly)	120.6	1.7
	C-N-CH1E	(Pro)	122.6	5.0
Calpha-C-N	CH1E-C-NH1	(except Gly,Pro)	116.2	2.0
	CH2G*-C-NH1	(Gly)	116.4	2.1
	CH1E-C-N	(Pro)	116.9	1.5
Calpha-C-O	CH1E-C-O	(except Gly)	120.8	1.7
	CH2G*-C-O	(Gly)	120.8	2.1
Cbeta-Calpha-C	CH3E-CH1E-C	(Ala)	110.5	1.5
	CH1E-CH1E-C	(Ile,Thr,Val)	109.1	2.2
	CH2E-CH1E-C	(the rest)	110.1	1.9
N-Calpha-C	NH1-CH1E-C	(except Gly,Pro)	111.2	2.8
	NH1-CH2G*-C	(Gly)	112.5	2.9
	N-CH1E-C	(Pro)	111.8	2.5
N-Calpha-Cbeta	NH1-CH1E-CH3E	(Ala)	110.4	1.5
	NH1-CH1E-CH1E	(Ile,Thr,Val)	111.5	1.7
	N-CH1E-CH2E	(Pro)	103.0	1.1
	NH1-CH1E-CH2E	(the rest)	110.5	1.7
O-C-N	O-C-NH1	(except Pro)	123.0	1.6
	O-C-N	(Pro)	122.0	1.4