

Análise computacional de domínios tóxicos de fosfolipases A₂ secretadas de veneno

FERNANDA SORDI¹

FERNANDA OLIVEIRA²

FABIANO PASIN³

JORGE ALMEIDA GUIMARÃES⁴

HERMES LUÍS NEUBAUER DE AMORIM⁵

RESUMO

Fosfolipases A₂ (FLA₂) compõem uma família de enzimas que, apesar de compartilharem grande semelhança quanto à seqüência de aminoácidos e estrutura 3D, apresentam distintos efeitos biológicos. Com o objetivo de tentar contribuir para a elucidação dos fatores determinantes da especificidade destas proteínas, programas de modelagem molecular e alinhamento de seqüências foram utilizados na análise computacional de dois grupos de FLA₂: miotóxicas e neurotóxicas. A partir dos dados obtidos é possível concluir que a ação miotóxica ou neurotóxica de FLA₂ é determinada por mudanças topológicas e do potencial eletrostático na superfície destas proteínas, as quais estão correlacionadas com a seqüência primária de aminoácidos de cada motivo funcional.

Palavras-chave: fosfolipase A₂, FLA₂, miotoxicidade, neurotoxicidade, bioinformática, modelagem molecular.

¹Acadêmica do Curso de Farmácia/ULBRA - Bolsista PROICT/ULBRA

²Bacharel em Ciências Biológicas/UFRGS

³Mestre em Biologia Celular e Molecular/UFRGS

⁴Laboratório de Bioquímica Farmacológica - Centro de

Biotecnologia/UFRGS

⁵Professor – Orientador do Curso de Química e Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada/ULBRA - Laboratório de Bioinformática Estrutural/ULBRA (hlnamorim@yahoo.com.br)

ABSTRACT

Despite the high sequence and structural similarities, phospholipase A₂ (PLA₂) protein superfamily exhibits a large spectrum of biological functionalities. In this work, a computational analysis of the discriminative amino-acid sequences of myotoxic and neurotoxic PLA₂ was made, since many residues are conserved in both subfamilies. Molecular modeling and sequence alignment software were used. From the results is possible to conclude that the myotoxic or neurotoxic action of a given PLA₂ is determined by topological changes and the electrostatic potential in the surface of these proteins, which are correlated with amino-acid sequence of each functional motif.

Key words: Phospholipase A₂; PLA₂; myotoxic; neurotoxic; bioinformatics; molecular modeling.

INTRODUÇÃO

Fosfolipases A₂ (FLA₂, EC 3.1.1.4) são enzimas que catalisam a hidrólise da ligação éster sn₂ de fosfolipídios de membrana (VALENTIM & LAMBEAU, 2002), liberando ácidos graxos e lisofosfolipídeos, os quais, por seu turno, estão envolvidos em vários processos biológicos. A hidrólise de fosfolipídeos é particularmente importante quando o ácido graxo gerado é o ácido araquidônico, já que este último é convertido por enzimas metabólicas em vários compostos bioativos (eicosanóides), tais como as prostaglandinas e os leucotrienos.

O amplo espectro de efeitos biológicos relacionados com a ação das FLA₂ é bastante interessante, já que em geral estas proteínas compartilham grande semelhança quanto à seqüência primária de aminoácidos e estrutura tridimensional (3D) (VALENTIM & LAMBEAU, 2002; KINI, 2003). Por exemplo, FLA₂ de mamíferos possuem papel importante na proliferação celular, contração muscular e doenças crônicas inflamatórias. Por outro lado, fosfolipases encontradas no veneno de espécies peçonhentas apresentam uma ampla gama de ações tóxicas, tais como miotoxicidade,

neurotoxicidade, inflamatória, indutora de edema e hemorrágica.

FLA₂ INTRACELULARES

Quanto à localização, FLA₂ podem ser divididas em dois grandes grupos: as que atuam no meio intracelular e as que atuam no meio extracelular. Neste caso, a principal diferença entre os dois grupos está relacionada com a estrutura: diferentemente das FLA₂ extracelulares, as intracelulares são proteínas maiores, com massa molecular variando entre 26 kDa (~231 aminoácidos) e 114 kDa (~1012) (SIX & DENIS, 2000). FLA₂ intracelulares estão, por exemplo, associadas à remodelagem de membrana (BROWN et al., 2003). Outra importante função resulta da ação catalítica sobre fosfolipídeos de membrana, liberando ácido araquidônico. Esse produto da atividade de FLA₂ está envolvido rotas de síntese de moléculas como os tromboxanos, leucotrienos e prostanóides (prostaglandinas e prostaciclina), os quais são intermediários em processos celulares diversos, como a resposta inflamatória, proteção de mucosas e do endotélio,

neurotransmissão, controle de temperatura (MURAKAMI E KUDO, 2004) e mediação da dor (BOOTING, 2004).

FLA₂ EXTRACELULARES

As FLA₂ extracelulares são proteínas menores, com massa molecular variando entre 13 kDa (~110 aminoácidos) e 18 kDa (~170 aminoácidos) (SIX e DENNIS, 2000), possuindo, portanto, massa molecular mais baixa em relação às extracelulares, além de um alto conteúdo de pontes dissulfeto, as quais fornecem maior estabilidade estrutural. As principais regiões estruturais compartilhadas entre elas são três grandes alfa-hélices centrais, duas fitas-beta, formando uma região conhecida como asa-beta (*beta-wing*), uma alça de ligação com cálcio e uma alça C-terminal.

A PRESENÇA DE "SÍTIOS FARMACOLÓGICOS" EM FOSFOLIPASES A2 SECRETADAS DE VENENO (FLA₂SV)

Como citado anteriormente, um fato intrigante em relação às diversas funções e atividades apresentadas pelas FLA₂ é a similaridade de seqüência e de estrutura existente entre elas. Considerando-se as FLA₂ secretadas de serpentes (FLA₂sv), observa-se de 40 a 99% de identidade na seqüência de aminoácidos entre distintas FLA₂. Quando se incluem as FLA₂ de mamíferos nessa análise, verificam-se também índices de identidade elevados entre várias das FLA₂ de mamíferos e ser-

pentas. Como conseqüência, uma considerável conservação da estrutura tridimensional é observada nestas proteínas (PASIN, 2006).

Uma possível explicação para o fenômeno de alta diversidade funcional, contrastando com a alta similaridade entre as FLA₂sv, foi proposta por Kini (2003). O autor sugere a ocorrência de diversos sítios farmacológicos na superfície das FLA₂sv que interagem com receptores-alvo, gerando respostas biológicas distintas. O receptor-alvo e o sítio farmacológico devem ser complementares um ao outro em termos de forma, potencial eletrostático, hidrofobicidade e forças de Van der Waals. No que concerne ao mecanismo de ação, é importante observar que estes sítios farmacológicos podem atuar independente ou cooperativamente. Uma FLA₂sv pode exibir o mesmo efeito tóxico ou farmacológico por mais de um mecanismo, ligando-se a diferentes proteínas-alvo receptoras. Além disto, o efeito biológico das FLA₂sv pode ser modulado em função da sua concentração em determinado tecido (MORA et al., 2005).

FLA₂ NEUROTÓXICAS E MIOTÓXICAS

As FLA₂ neurotóxicas têm atuação tanto pré-sináptica como pós-sináptica. As pré-sinápticas ligam-se às terminações nervosas axonais e podem causar um aumento ou bloqueio da liberação de neurotransmissores na fenda sináptica (CHANG, 1985). As FLA₂ neurotóxicas pós-sinápticas ligam-se aos receptores acetilcolinérgicos nas extremidades dendríticas, causando um impedimento da despolarização e da conseqüente transmissão de estímulo nervoso (KINI, 1997). As FLA₂ miotóxicas são caracterizadas por causar dano mionecrótico

em tecido muscular esquelético de animais superiores por injeção intramuscular. Estas proteínas estão presentes em alta concentração nas peçonhas de serpentes viperídeas e crotalídeas.

A especificidade de uma FLA_{2sv} é determinada pela sua capacidade de reconhecimento interfacial e pela presença de sub-sítios de especificidade na região do sítio catalítico. Desta forma, duas regiões são importantes no que concerne ao estudo da atividade dessas proteínas: o sítio catalítico e o sítio de reconhecimento interfacial (face *i*), sendo este último responsável por fazer contatos com moléculas fosfolipídicas na superfície da membrana ou receptor.

Os resíduos catalíticos das fosfolipases A₂ secretadas estão localizados em uma das extremidades do sítio ativo. O sítio catalítico é circunda-

do pela face *i*, a qual age como um domínio ou sítio de ligação interfacial (Figura 1). Todas as estruturas ativas de FLA_{2s} contêm a mesma díade catalítica: His48-Asp49. As propriedades que diferenciam as diversas FLA_{2s} são, geralmente, os resíduos que formam a face *i* e outros resíduos da superfície protéica que fazem parte de domínios de reconhecimento para outras funções (tais como miotoxicidade e neurotoxicidade).

O presente trabalho teve por objetivo realizar o alinhamento de seqüências consenso de FLA_{2sv} neurotóxicas e miotóxicas, com o conseqüente assinalamento dos resíduos que caracterizam FLA_{2sv} neuro e miotóxicas com respeito à estrutura e por fim proceder à análise topológica em termos de acessibilidade, potencial eletrostático e mobilidade das regiões envolvidas na ação neurotóxica ou miotóxica de FLA_{2sv}.

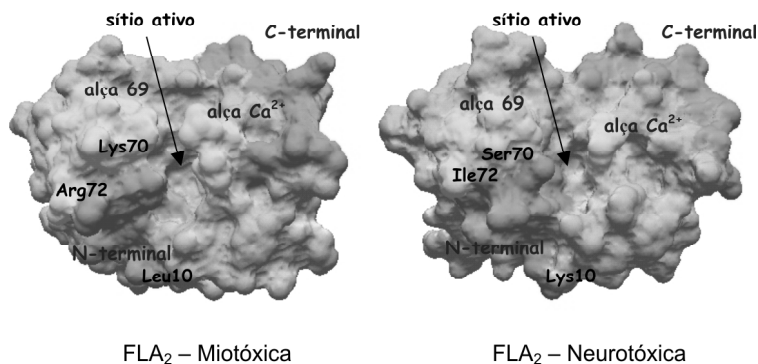


Figura 1 - Representação esquemática da superfície molecular destacando as regiões que formam a face *i* das fosfolipases de *Agkistrodon halys pallas*, PDB 1CLP (miotóxica) e de *Bothrops asper*, PDB 1A2A (neurotóxica).

MATERIAL E MÉTODOS

Na metodologia do presente trabalho foram empregadas ferramentas computacionais disponíveis na rede mundial de computadores, tais

como o BLAST2, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov.csulib.ctstateu.edu/BLAST/> e o Deep View, disponível em <http://www.expasy.org/spdbv/>.

Com o BLAST2 foi realizado o alinhamento das seqüências consenso dos motivos miotóxicos (Figura 2) e neurotóxicos (Figura 3) obtidas em trabalho anterior por Pasin et al. (2006). Nas figuras 2 e 3, as letras maiúsculas indicam que um dado aminoácido está presente em mais de 50% das seqüências primárias, já as em letras minúsculas indicam os aminoácidos cuja frequência é menor que 50% nas seqüências primárias. No trabalho de Pasin et al. (2006) verificou-se que entre os motivos miotóxicos e neurotóxicos, apenas as seqüências consenso da região catalítica, â-wing e hélice 3 obtiveram precisão estatística significativa, sendo por isso utilizadas no alinhamento. Os resultados do alinhamento foram usados para uma análise de-

talhada dos resíduos de aminoácidos presentes em cada posição, descrevendo quais resíduos se conservavam nas seqüências bem como aqueles que diferiam entre elas. Com estes dados disponíveis, buscou-se encontrar com o auxílio do Deep View a localização dos domínios discriminativos na estrutura terciária, bem como na superfície acessível ao solvente da proteína; correlacionando estes domínios discriminativos com regiões estruturalmente conservadas entre as FLA₂sv miotóxicas e neurotóxicas.

Por fim, realizou-se a análise topológica dos domínios toxicológicos quanto à acessibilidade, potencial eletrostático e flexibilidade das cadeias laterais dos aminoácidos.

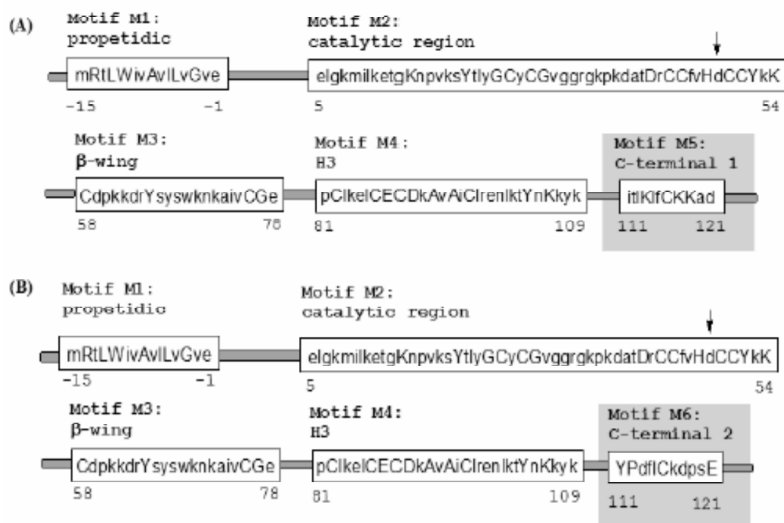


Figura 2 - Motivos (seqüências consenso) usados para a classificação automática de FLA₂sv com atividade miotóxica. As flechas indicam o resíduo presente na posição 49. Em cinza aparecem motivos que não apresentaram maior significado estatístico (baixa precisão no teste de validação) (PASIN, 2006).



Figura 3 - Motivos (seqüências consenso) usados para a classificação automática de FLA_{2sv} com atividade neurotóxica. As flechas indicam o resíduo presente na posição 49. Em cinza aparecem motivos que não apresentaram maior significado estatístico (baixa precisão no teste de validação) (PASIN, 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O alinhamento das seqüências consenso dos motivos miotóxicos (Figura 3) e neurotóxicos (Figura 4) descritos em trabalho anterior por Pasin et al. (2006) é mostrado na figura 5. Nesta, os aminoácidos designados com letras maiúsculas estão presentes em mais de 50% das

seqüências primárias, enquanto que os aminoácidos representados com letras minúsculas são aqueles cuja freqüência é menor que 50% nas seqüências primárias. Assim verificou-se que entre os motivos miotóxicos e neurotóxicos, apenas as seqüências consenso da região catalítica, â-wing e hélice 3 obtiveram precisão estatística significativa; sendo por isso utilizadas no alinhamento.

Motivo 2 – região catalítica

Score = 74.3 bits (181), Expect = 1e-12
Identities = 32/41 (78%), Positives = 33/41 (80%), Gaps = 0/41 (0%)

```
Query 5 MILKETGKNPVKSYTLYGICYCGVGGRGKPKDATDRCCFVHD 45
MI ETGK PV SY YGICYG GG+G PKDATDRCCFVHD
Sbjct 1 MIKCEYGKRPVLSYADYGCYCGWGGKGTPKDATDRCCFVHD 41
```

Motivo 3 – beta-wing

Score = 33.9 bits (76), Expect = 1.7
Identities = 14/20 (70%), Positives = 15/20 (75%), Gaps = 0/20 (0%)

```
Query 1 CDPKKDRYSYSWKNKAIVCG 20
C+PK D YSYS K AIVCG
Sbjct 10 CNPKSDLYSYSCKEGAIVCG 29
```

Motivo 4 – hélice 3

Score = 36.6 bits (83), Expect = 0.31
Identities = 13/23 (56%), Positives = 17/23 (73%), Gaps = 0/23 (0%)

```
Query 2 CLKELCECDKAVAICLRENLT 24
C +++CECD+A AIC NL TY
Sbjct 1 CERKVCECDRAAAICFARNLNT 23
```

Figura 4 - Alinhamento das seqüências consenso de FLA₂sv miotóxicas e neurotóxicas.

A partir do alinhamento das seqüências consenso dos motivos miotóxicos e neurotóxicos foi possível determinar quais resíduos estão envolvidos na determinação de cada atividade, miotóxica ou neurotóxicas (Tabela 1).

Tabela 1. Domínios toxicológicos encontrados.

Região	Miotoxicidade	Neurotoxicidade
Catalítica	Glu4, Leu5, Gly6, Lys7, Asn16, Lys19, Ala24, Val31, Lys49, Tyr52, Lys53	Lys16, Ile19, Phe24, Gly31, Asp49
Beta-wing	Lys70, Arg72, Trp77, Lys80	Tyr52, Gly53, Ser70, Ile72, Leu77, Gly80
Hélice 3	Leu92, Glu94, Glu108	Glu92, Gln94, Arg108

Neste caso, com base no assinalamento dos domínios toxicológicos descritos com respeito à estrutura da proteína, verificou-se que, na região correspondente ao sítio catalítico das

FLA₂sv (Figura 5), o modelo utilizado para ilustrar a miotoxicidade apresenta uma maior quantidade de resíduos básicos e neutros conservados em comparação com as FLA₂sv neurotóxicas.

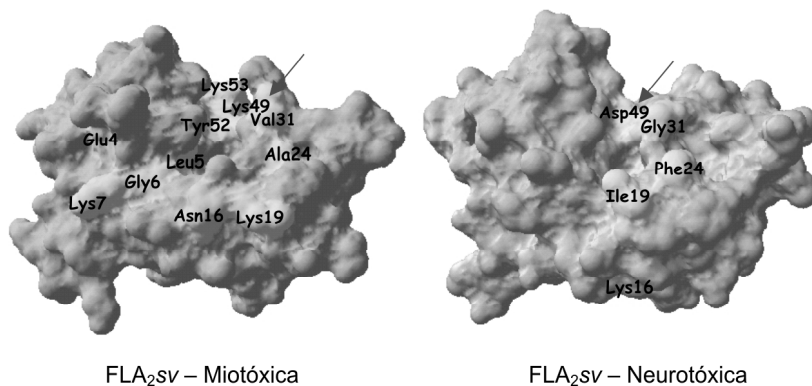


Figura 5 - Localização dos domínios toxicológicos responsáveis pela miotoxicidade e neurotoxicidade de FLA_{2sv} presentes na região catalítica.

A Figura 6 representa a face i e a região catalítica coloridas de acordo com o potencial eletrostático, onde se observa que o modelo usado de FLA_{2sv} miotóxica é positivamente carregado, em consequência da presença de resíduos básicos, enquanto que o modelo utilizado para FLA_{2sv} neurotóxica é negativamente carregado, em consequência da presença de resíduos ácidos.

modelo representativo é colorido de acordo o grau de flexibilidade, verifica-se que a estrutura empregada como modelo de FLA_{2sv} miotóxica possui a região catalítica e a face i sujeitas a uma menor flutuação conformacional das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos que a região correspondente das FLA_{2sv} neurotóxicas; o que pode estar envolvido com a plasticidade e eventuais comportamentos alostéricos nestas proteínas.

Em relação à Figura 7, onde a superfície de cada

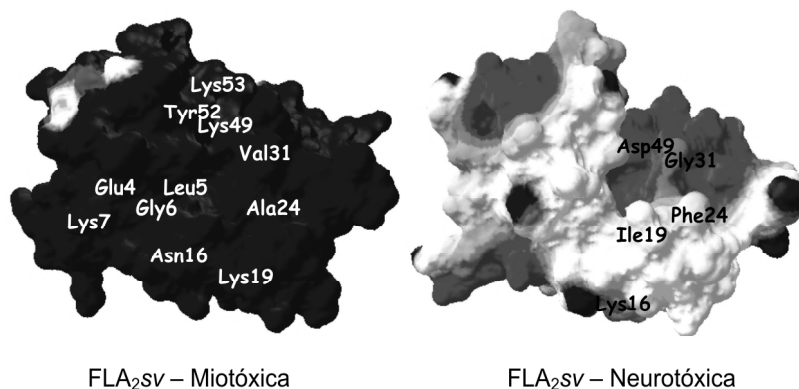


Figura 6 - Localização dos domínios toxicológicos responsáveis pela miotoxicidade e neurotoxicidade de FLA_{2sv} presentes na Face I e região catalítica coloridas de acordo com o potencial eletrostático.

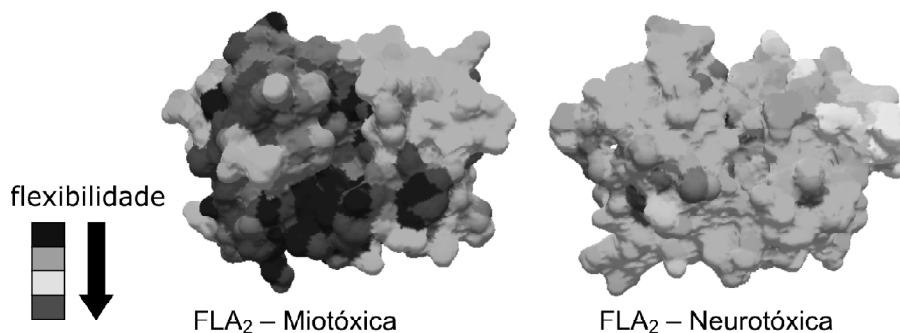


Figura 7 - Localização dos domínios toxicológicos responsáveis pela miotoxicidade e neurotoxicidade de $FLA_{2,sv}$ presentes na região catalítica de acordo com o fator de temperatura (flexibilidade).

CONCLUSÕES

A grande complexidade estrutural e funcional descrita anteriormente justifica o imenso fascínio que as fosfolipases A_2 vem exercendo sobre a comunidade científica. Além de contribuir para o entendimento diversos eventos biológicos, o detalhamento das relações estrutura-função das fosfolipases A_2 abre espaço para a possibilidade de planejamento de novas proteínas, com atividades desejadas, bem como para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para um grande número de estados patológicos (MURAKAMI E KUDO, 2004).

A partir do presente estudo foram identificados possíveis sítios toxicológicos relacionados com a especificidade de atividade miotóxica e neurotóxica em $FLA_{2,sv}$. Estes, estão localizados em regiões estruturalmente conservadas na família das $FLA_{2,sv}$. Além disso, há diferenças quanto ao potencial eletrostático e flexibilidade das cadeias laterais dos aminoácidos presentes nas regiões propostas como sítios toxicológicos. Assim, é possível que a especificidade da ação toxicológica de $FLA_{2,sv}$

esteja relacionada com uma combinação de fatores envolvendo a topologia local, potencial eletrostático e flexibilidade das cadeias laterais dos resíduos identificados.

Os dados obtidos serão empregados nas próximas etapas do trabalho, as quais envolvem simulações de dinâmica molecular visando: a) o estudo de complexos FLA_2 – substrato fosfolipídico (visando uma melhor caracterização dos sítios de especificidade); b) investigação dos resíduos envolvidos no controle alostérico de FLA_2 -K49; c) proposição de um modelo 3D do complexo FLA_2 -K49 – receptor associado a neurotoxicidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOOTING, R. Antipyretic therapy. **Frontiers In Bioscience**, v. 9, p.956-966, 2004.
- BROWN, W. J.; CHAMBERS, K. E.; DOODY, A. Phospholipase A_2 (PLA_2) enzymes in membrane trafficking: mediators

of membrane shape and function. **Traffic**, v. 4, n.4, p.214-221, 2003.

CHANG, C.C. Neurotoxins with phospholipase A₂ activity in snake venoms. **Proceedings of the National Science Council**, v. 9, p.126-142, 1985.

KINI, M.R. Excitement Ahead: Structure, Function and Mechanism of Snake Venom Phospholipase A₂ Enzymes. **Toxicon**, v.42, n. 8, p.827-840, 2003.

KINI, R. M. Phospholipase A₂ – A complex multifunctional protein puzzle. In: KINI, R. M (Ed.) **Venon phospholipase A₂ enzymes**. London: John Wiley & Sons, 1997. p.1-28.

MORA, R. et al. A Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops asper* snake venom induces proliferation, apoptosis and necrosis in a lymphoblastoid cell line. **Toxicon**, v. 45, n.5, p.651-660, 2005.

MURAKAMI, M.; KUDO, I. Secretory phospholipase A₂. **Biological and Pharmaceutical**

Bulletin, v. 27, n.8, p.1158-1164, 2004.

PASIN, Fabiano. **Análise computacional dos determinantes das atividades mio- e neurotóxicas de fosfolipases A₂ do veneno de serpentes**. 2006. 100f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

PASIN, Fabiano et al. Computational analysis of the determinants of the myotoxic and neurotoxic activities of snake venom phospholipases A₂. **Toxicon** (em submissão), 2006.

SIX, D.A.; DENNIS, E.A. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1488, p.1-19, 2000.

VALENTIN, E.; LAMBEAU, G. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A₂ and their receptors and binding proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1488, p.59-70, 2002.