

Desenho e produção de mutantes da toxina α -KT_{x12.1}
do escorpião *Tityus serrulatus* para estudos estruturais

Projeto de Ciclo Avançado de Leonardo Giantini Trabuco

*Orientadores: Sérgio Oyama Junior, Nilson Ivo Tonin Zanchin,
Thelma de Aguiar Pertinhez e Alberto Spisni*

Centro de Biologia Molecular Estrutural (CeBiME), Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS),
Campinas, SP.

Leonardo Giantini Trabuco

Sérgio Oyama Junior

Nilson Ivo Tonin Zanchin

Thelma de Aguiar Pertinhez

Alberto Spisni

1 Resumo

Canais de K^+ desempenham importantes papéis, tanto em células excitáveis como em células não excitáveis. Em células excitáveis, o papel dos canais de K^+ está relacionado com a estabilização do potencial de membrana que estes promovem. Já foram descritos muitos mecanismos fisiológicos que utilizam canais de K^+ também em células não excitáveis, tais como o transporte de potássio e a regulação do volume celular e mitocondrial.

Venenos de escorpião contêm várias toxinas capazes de inibir canais iônicos. Em particular, possuem vários peptídeos neurotóxicos capazes de inibir canais de K^+ , que foram, e ainda são, muito utilizados como ferramentas para estudos funcionais e estruturais destes canais.

Estas toxinas apresentam um motivo estrutural conservado composto de uma α -hélice conectada a duas ou três fitas- β antiparalelas, sendo adicionalmente estabilizado por pontes dissulfeto (“ α/β scorpion fold”).

Neste projeto, pretende-se desenhar mutantes da toxina α -KT_{x12.1}, presente no veneno do escorpião *Tityus serrulatus* e atuante em canais de K^+ , por estudos de modelagem molecular. As mutações terão a finalidade de abolir a atividade da toxina e comprovar a importância de determinados resíduos. Alternativamente, pode-se desenhar mutantes que possuam maior especificidade a determinado tipo de canal.

A construção da toxina será efetuada por técnicas de biologia molecular, método pelo qual serão obtidas grandes quantidades do peptídeo por expressão heteróloga em *E. coli* e este será purificado. A caracterização estrutural da toxina recombinante será feita, basicamente, através de espectrometria de massa e espectroscopia de dicroísmo circular. Um estudo ao nível molecular por ressonância magnética nuclear poderá ser efetuado para o mutante obtido.

Os estudos funcionais de interação com canais de K^+ (“patch clamp”) serão feitos por colaboradores do grupo.

2 Introdução

Os canais de K^+ deixam o potencial de membrana próximo ao potencial de equilíbrio do potássio e longe do limiar de disparo, estabilizando-o. Em células excitáveis, os papéis de todos os tipos de canais de potássio estão relacionados com esta estabilização. Os canais de K^+ determinam o potencial de repouso, mantêm curtos os potenciais de ação rápidos, terminam períodos de intensa atividade, controlam o intervalo de tempo entre disparos repetitivos e geralmente diminuem a eficiência de estímulos em uma célula quando estão abertos. Já foram descritos muitos mecanismos fisiológicos que utilizam canais de K^+ também em células não excitáveis, como o transporte

de potássio e a regulação do volume celular e mitocondrial [1].

Venenos de escorpião contêm várias moléculas bloqueadoras de canais de K^+ , conhecidas como toxinas de canais de K^+ . Estas moléculas são peptídeos pequenos (menos de 45 resíduos de aminoácidos), básicos e com a presença de três ou quatro pontes dissulfeto [2]. O uso de toxinas de canais de K^+ , descobertas em vários animais como o escorpião, – facilitou: (1) a purificação dos canais a partir dos tecidos; (2) a determinação da composição de subunidades dos canais; (3) a elucidação da estrutura tridimensional de canais de K^+ ; e (4) o estudo da fisiologia dos canais de K^+ [3].

As toxinas de escorpião e, em particular, as toxinas atuantes em canais de K^+ apresentam um motivo estrutural conservado, formado por uma α -hélice conectada a duas ou três fitas- β antiparalelas (Figura 1). Duas pontes dissulfeto unem a α -hélice a uma das fitas- β [4, 5, 6]. Esta organização estrutural é comumente designada “ α/β scorpion fold” [8], sendo também descrita como CS $\alpha\beta$ (“cysteine-stabilized $\alpha\beta$ motif”) [6].

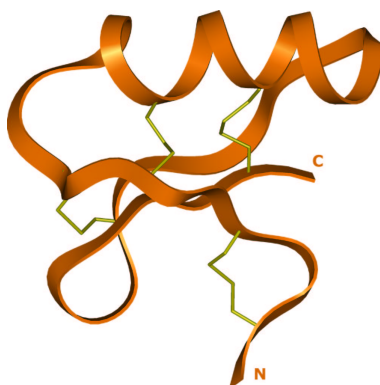


Figura 1. Estrutura tridimensional da α -KTx_{12.1}.

Novello *et al.* [9] isolaram e seqüenciaram uma neurotoxina de cadeia pequena (41 aminoácidos) com quatro pontes dissulfeto do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* que atua em canais de K^+ ativados por Ca^{2+} , a qual foi denominada TsTx-IV. No ano seguinte, a estrutura da butantoxina, de 40 aminoácidos, foi resolvida por ressonância magnética nuclear (RMN) [7]. A única diferença entre as duas toxinas é a presença de uma Asn41 na extremidade C-terminal da TsTx-IV. Contudo, a seqüência inicialmente publicada da TsTx-IV estava errada e as duas toxinas são, de fato, a mesma [2, 10]. De acordo com a nomenclatura unificadora recentemente proposta por Tytgat *et al.* [3], esta toxina deve ser chamada α -KTx_{12.1}.

3 Objetivos

Utilizando inicialmente a metodologia de modelagem molecular, serão desenhados mutantes da

toxina α -KT_{X12.1}, presente no veneno do escorpião *Tityus serrulatus* e atuante em canais de K⁺. As mutações terão como alvo a abolição da atividade bloqueadora ou a alteração da especificidade da toxina. Um dos mutantes será selecionado para posterior caracterização funcional e estrutural.

A construção da toxina será efetuada por técnicas de biologia molecular, método pelo qual serão obtidas grandes quantidades do peptídeo por expressão heteróloga em *E. coli* e este será purificado. A caracterização estrutural da toxina recombinante será feita, basicamente, através de espectrometria de massa e espectroscopia de dicroísmo circular. Um estudo ao nível molecular por ressonância magnética nuclear poderá ser efetuado para o mutante obtido.

4 Justificativa

A caracterização de toxinas de escorpião tem alavancado muito o estudo da estrutura e função dos canais de K⁺ [3]. De particular interesse é o desenvolvimento de peptídeos com maior afinidade e seletividade, muito úteis como ferramenta para o estudo destes canais. O melhor entendimento da interação toxina-canal é um passo fundamental para o desenvolvimento de inibidores mais potentes e seletivos, além de consistir de um ponto de partida para o desenvolvimento de moléculas com potenciais aplicações biomédicas ou até mesmo terapêuticas.

5 Plano de trabalho e cronograma de atividades

O desenvolvimento do presente projeto dar-se-á em três semestres, começando no primeiro semestre de 2004. Os estudos de modelagem molecular serão feitos sob a orientação do Dr. Sérgio Oyama Junior, que devem durar cerca de três meses. A construção das toxinas recombinantes, sua expressão heteróloga em *E. coli* e sua purificação será feita sob orientação do Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin, o que deve levar por volta de um ano. Os estudos conformacionais por CD e RMN serão feitos sob a orientação da Dra. Thelma de Aguiar Pertinhez, que serão realizados nos últimos três meses. O Prof. Dr. Alberto Spisni acompanhará todo o desenvolvimento do projeto.

6 Materiais e métodos

6.1 Modelagem molecular

Será feito um levantamento inicial das várias toxinas atuantes sobre canais de K⁺ já descritas. A partir destes dados, serão efetuados o alinhamento de seqüências e a sobreposição das estruturas tridimensionais disponíveis. Em seguida, identificaremos os resíduos conservados em termos de

seqüência e localização topológica. Com base em dados experimentais de mutagênese sítio-dirigida disponíveis na literatura, identificaremos resíduos importantes para a ligação a canais de K^+ , bem como aqueles responsáveis pela seletividade.

O conjunto das informações obtidas através destes procedimentos será utilizado para guiar o desenho de mutantes da α -KT_{x12.1}. Estes estudos podem levar à proposição de alterações capazes de abolir a atividade bloqueadora da toxina, e conseqüentemente comprovar a importância de determinado resíduo. Alternativamente, poderão ser propostos mutantes com maior especificidade a determinado tipo de canal.

Como uma etapa complementar, poderão ser realizados estudos teóricos preliminares da interação toxina-canal, através de “docking” do mutante selecionado a um modelo do canal de K^+ .

6.2 Construção da toxina recombinante

A estratégia de obtenção da toxina recombinante será realizada a partir dos estudos de modelagem molecular, utilizando as estratégias de mutagênese sítio-dirigida e/ou deleções do clone α -KT_{x12.1}. O fragmento recombinante escolhido será inserido em vetores de clonagem (por exemplo, pGEM-T) e, em seguida, transformado por eletroporação em cepas apropriadas de *E. coli* (por exemplo, DH5a ou XL1-Blue), permitindo o isolamento dos clones. A verificação da identidade dos insertos será feita por seqüenciamento automático de DNA, visando à seleção de fragmentos que apresentarem a seqüência correta.

Após propagação e purificação, os clones selecionados serão submetidos a reações de digestão com enzimas de restrição apropriadas. Os insertos serão isolados por purificação em gel de agarose e clonados de forma direcionada no vetor de expressão PET-405, fazendo uso de peptídeos de fusão que possam direcionar o acúmulo das proteínas recombinantes no espaço periplásmico.

Um projeto da pós-doutoranda Eliana Guedes Stehling, que envolve, dentre outras coisas, a expressão de várias toxinas de escorpião em *E. coli*, está em andamento no laboratório. Possivelmente, a toxina selvagem já vai estar sendo expressa com sucesso na época em que o presente projeto for iniciado e já saberemos qual é a melhor estratégia para a construção dos vetores de expressão.

6.3 Expressão e purificação da toxina recombinante

As construções recombinantes serão inseridas por métodos de eletroporação na linhagem de expressão BL 21 (DE3), a qual é capaz de sintetizar T7 RNA polimerase.

As linhagens contendo as construções apropriadas serão submetidas a testes de expressão. Extratos celulares obtidos destas cepas serão analisados por eletroforese em géis de poliacrilamida desnaturantes (Tricina SDS-PAGE) [11], visando a obtenção dos melhores parâmetros para a produção

dos polipeptídeos, preferencialmente na fração solúvel e corretamente enovelados. As toxinas expressas com sucesso e em larga escala serão capturadas por métodos de cromatografia apropriados até a obtenção de produtos suficientemente puros para os ensaios funcionais *in vitro* (“patch clamp”, que será feito por colaboradores do grupo) e conformacionais por espectroscopia (CD e RMN).

6.4 Espectrometria de massa e espectroscopia de dicroísmo circular

A identidade da seqüência e a correta configuração das pontes dissulfeto da toxina recombinante serão confirmadas utilizando-se espectrometria de massa. Clivando a toxina em resíduos específicos, incubando, por exemplo, com endoproteínase Asp-N, tripsina e Asp-N mais tripsina, pode-se inferir, através da massa dos fragmentos gerados, a configuração das pontes dissulfeto [2].

A espectroscopia de dicroísmo circular (CD) permite a obtenção de informações sobre a estrutura secundária e terciária de proteínas e peptídeos [13]. Esta técnica será utilizada com a principal finalidade de monitorar o correto enovelamento da toxina expressa [14]. Alguns parâmetros como variações de temperatura, pH, concentração de toxina e força iônica da solução serão testados com a finalidade de caracterizar as propriedades conformacionais e de estabilidade das toxinas mutantes. Os experimentos de CD também serão empregados na determinação das condições experimentais para o posterior estudo por RMN.

6.5 Ressonância magnética nuclear

Uma vez que a estrutura tridimensional da toxina α -KT_{x12.1} já foi determinada por RMN, o estudo do mutante se concentrará na obtenção de informações tanto da topologia da toxina como dos detalhes das regiões vizinhas ao resíduo mutado, por comparação dos espectros bidimensionais 1H-RMN.

Usando as condições experimentais determinadas por CD, serão coletados experimentos 2D 1H-RMN usando os espectrômetros Varian Inova 500AS e 600AS, operantes em 11,7 e 14,1 Tesla, disponíveis no CeBiME.

Para determinação da estrutura final da cadeia polipeptídica serão realizados vários experimentos que fornecerão informações complementares [15]. Os do tipo escalar, como TOCSY (“Total Correlation SpectroscopY”) e COSY (“COrelated SpectroscopY”), permitirão a atribuição das frequências de ressonância (deslocamento químico) dos núcleos de hidrogênio, suas constantes de acoplamento e, conseqüentemente, os valores do ângulo diedro ϕ . Os experimentos do tipo dipolar, como NOESY (“Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY”) permitirão a atribuição seqüencial das ressonâncias. Os dados obtidos nesses experimentos permitirão também a determinação das

distâncias interatômicas que serão usadas no cálculo final da estrutura tridimensional da toxina recombinante.

Informações adicionais sobre a organização tridimensional da toxina, como fator de proteção dos NHs peptídicos, poderão ser obtidos com experimentos de troca de hidrogênio por deutério.

Sendo que a flexibilidade das toxinas é um fator importante para otimizar a interação com o canal, a toxina poderá ser enriquecida com ^{15}N , através de sua expressão em meio mínimo M9 [12] contendo cloreto de amônio marcado com ^{15}N , para experimentos de dinâmica.

Referências

- [1] Hille B (2001) *Ion Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- [2] Pimenta AMC, Mansuelle P, Diniz CR, Martin-Eauclaire MF (2003) Covalent structure and some pharmacological features of native and cleaved α -KTx₁₂₋₁, a four disulfide-bridged toxin from *Tityus serrulatus* venom. *J. Peptide Sci.* **9**, 132-140.
- [3] Tytgat J, Chandy KG, Garcia ML, Gutman GA, Martin-Eauclaire MF, van der Walt JJ, Possani LD (1999) A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies. *Trends Pharmacol. Sci.* **20**, 444-447.
- [4] Bontems F, Roumestand C, Gilquin B, Menez A, Toma F (1991) Refined structure of charybdotoxin: common motifs in scorpion toxins and insect defensins. *Science.* **254**, 1521-1523.
- [5] Lee W, Moore CH, Watt DD, Krishna NR (1994) Solution structure of the variant-3 neurotoxin from *Centruroides sculpturatus* Ewing. *Eur. J. Biochem.* **219**, 89-95.
- [6] Cornet B, Bonmatin JM, Hetru C, Hoffmann JA, Ptak M, Vovelle F (1995) Refined three-dimensional solution structure of insect defensin A. *Structure.* **3**, 435-448.
- [7] Holaday SK Jr, Martin BM, Fletcher PL Jr, Krishna NR (2000) NMR solution structure of butantoxin. *Arch. Biochem. Biophys.* **379**, 18-27.
- [8] Song J, Gilquin B, Jamin N, Drakopoulou E, Guenneugues M, Dauplais M, Vita C, Ménez A (1997) NMR solution structure of a two-disulfide derivative of charybdotoxin: structural evidence for conservation of scorpion toxin α/β motif and its hydrophobic side chain packing. *Biochemistry.* **36**, 3760-3766.
- [9] Novello JC, Arantes EC, Varanda WA, Oliveira B, Giglio JR, Marangoni S (1999) TsTx-IV, a short chain four-disulfide-bridged neurotoxin from *Tityus serrulatus* venom which acts on Ca^{2+} -activated K^+ channels. *Toxicon.* **37**, 651-660.

- [10] Pimenta AMC, Stocklin R, Favreau P, Bougis PE, Martin-Eauclaire MF (2001) Moving pieces in a proteomic puzzle: mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of *Tityus surrulatus* (Scorpiones, Buthidae). *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **15**, 1562-1572.
- [11] Ausubel FM, Brente R, Kingston RE, Moore DD, Smith JG, Struhl K (1998) *Cur. Prot. Mol. Biol.* Green Publishing Associates, Brooklyn, NY.
- [12] Sambrook, J., Russell, D.W. (2001) *Molecular cloning*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- [13] Kelly, S. M., Price, N. C. (2000) The use of Circular Dichroism in the investigation of protein structure and function. *Curr. Protein and Peptide Sci.* **1**, 349-384.
- [14] di Luccio E, Matavel A, Opi S, Regaya I, Sandoz G, M'Barek S, Carlier E, Estève E, Carrega L, Fajloun Z, Rochat H, Loret E, de Waard M, Sabatier JM (2002) Evolution of maurotoxin conformation and blocking efficacy towards Shaker B channels during the course of folding and oxidation in vitro. *Biochem. J.* **361**, 409-416.
- [15] Wüthrich K (1986) *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, John Wiley & Sons, New York.