



Daniela Priscila Marchi Salvador

**“ESTUDOS ESTRUTURAIS COM LYS49 E ASP49
FOSFOLIPASES A₂ NATIVAS E COMPLEXADAS
COM BROMETO DE *p*-BROMOFENACILA”**

Tese de Doutorado

BOTUCATU
2008

DANIELA PRISCILA MARCHI SALVADOR

**“ESTUDOS ESTRUTURAIS COM LYS49 E ASP49
FOSFOLIPASES A₂ NATIVAS E COMPLEXADAS COM
BROMETO DE *p*-BROMOFENACILA”**

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
campus de Botucatu, para obtenção do
título de Doutor em Genética.

Orientador: PROF. ADJUNTO MARCOS ROBERTO DE MATTOS FONTES.

***BOTUCATU
2008***

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Marchi-Salvador, Daniela Priscila.

Estudos estruturais com Lys49 Fosfolipases A₂ nativas e complexadas
com Brometo de *p*-Bromofenacila / Daniela Priscila Marchi Salvador. –
Botucatu : [s.n.], 2008.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências
de Botucatu 2008.

Orientador: Marcos Roberto de Mattos Fontes

Assunto CAPES: 21007004

1. Biologia molecular 2. Serpente - Veneno

CDD 615.942

Palavras-chave: Asp49-PLA₂; Brometo de *p*-Bromofenacila; Cristalografia de
raios-X; Lys49-PLA₂; Veneno de serpentes

À minha Mãe, Eliana...

...aos meus irmãos: Luciano e Guilherme...

...ao meu namorado Marcelo...

AGRADECIMENTOS

★ *Ao meu orientador, o Professor Adjunto Marcos Roberto de Mattos Fontes, por toda a confiança, PACIÊNCIA, dedicação, experiências e ensinamentos transmitidos durante o desenvolvimento deste projeto de pesquisa.*

★ *Aos verdadeiros amigos, Cilene do Carmo Federici Padilha e Luiz Cláudio Corrêa, e também ao meu irmão Guilherme Henrique Marchi Salvador, pela colaboração, cooperação, troca de conhecimentos e acima de tudo pelos desabafos, conselhos, companheirismo...*

★ *Ao Professor Doutor Andreimar Martins Soares que forneceu as amostras de proteínas destacas neste trabalho, propiciando o desenvolvimento deste trabalho.*

★ *À Fundação de Auxílio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), que financiou o presente projeto de pesquisa (proc. 04/13292-0).*

★ *Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), que disponibilizaram suporte técnico essencial para a realização deste trabalho.*

★ *Ao meu amado amigo e namorado Marcelo, por simplesmente TUDO...apoio emocional, paciência, calma e incentivo...*

*“A ciência é a procura da verdade;
não é um jogo no qual uma pessoa tenta derrubar seus oponentes,
prejudicar outras pessoas...”*

Linus Pauling

Resumo

Neste trabalho estão descritos experimentos de cristalização, coleta de dados de difração de raios-X, elucidação e análise estrutural de cinco PLA₂s: duas Asp49-PLA₂s básicas (crotoxina B, isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e BthTX-II, do veneno de *Bothrops jararacussu*) e três Lys49-PLA₂s básicas (PrTX-I, veneno de *B. pirajai* e BthTX-I, veneno de *B. jararacussu* modificadas quimicamente pelo brometo de *p*-bromofenacila (BPB) e MjTX-I, veneno de *B. moojeni*). O modelo tetramérico da crotoxina B é formado pela associação de duas isoformas (CB1 e CB2). Diversos experimentos (eletroforese, espalhamento dinâmico de luz e análises cristalográficas) indicaram que a conformação oligomérica da crotoxina B é biologicamente significativa e pode estar correlacionada com o desencadeamento da atividade neurotóxica exercida por esta toxina. Os modelos cristalográficos dos complexos PrTX-I-BPB e BthTX-I-BPB apresentaram todas as His48 modificadas pelo BPB. Análise estrutural da PrTX-I-BPB indicou que a alquilação da His48 pelo BPB não alterou, significativamente, a estrutura oligomérica desta proteína. No entanto a distorção ocorrida no *loop* de C-terminal pode estar relacionada com o deslocamento do *loop* de ligação de Ca²⁺ causado pela presença do BPB. A análise estrutural e comparativa do dímero da BthTX-II indicou o deslocamento do *loop* de ligação de Ca²⁺, sugerindo que esta modificação estrutural pode estar associada à baixa atividade catalítica exercida por esta enzima. Ainda, nos possibilitou propor que a atividade catalítica exercida pela BthTX-II pode ocorrer através de um mecanismo catalítico alternativo. A estrutura tridimensional da MjTX-I é constituída por quatro moléculas unidade assimétrica, formação oligomérica inédita para as Lys49-PLA₂s.

Palavras chave: cristalização de proteínas; cristalografia de raios-X; Asp49-PLA₂s; Lys49-PLA₂s; brometo de *p*-bromofenacila; *Bothrops jararacussu*; *Bothrops pirajai*; *Crotalus durissus terrificus*; veneno de serpentes.

Abstract

This work reports the crystallization, X-ray data collection, structure determination and analysis of five PLA₂s: two basic Asp49-PLA₂s (Crotoxin B, isolated from *Crotalus durissus terrificus* snake venom and BthTX-II, from *Bothrops jararacussu* snake venom) and three basic Lys49-PLA₂s (PrTX-I modified by *p*-bromophenacyl bromide (BPB), from *B. pirajai* snake venom; BthTX-I-BPB, from *B. jararacussu* snake venom and MjTX-I, from *B. moojeni* snake venom). The tetrameric model of the crotoxin B formed by CB1 and CB2 isoforms. The biological assembly as also demonstrated by the SDS-PAGE, dynamic light scattering, free energy variations and buried surface calculations and the results suggest that the CB assembly is stable in solution and may be important to the increase of neurotoxicity performed by CB. The crystallographic structures of PrTX-I-BPB and BthTX-I-BPB clearly indicating a BPB bound to the His48 for each monomer. Structural analysis of the PrTX-I-BPB indicated that the alkylation of His48 by BPB did not significantly alter the oligomeric structure of this protein. However, the C-terminal displacement may be related to the Ca²⁺-binding loop modification caused by the presence of the BPB molecule. The structural and comparative analysis of the BthTX-II dimeric shows a displacement of the Ca²⁺-binding loop; this structural modification may be associated with the low catalytic function and an alternative catalytic mechanism is proposed. The three-dimensional structure of the MjTX-I indicates the presence of four molecules in the asymmetric unit; this is a novel tetrameric assembly for the Lys49-phospholipase A₂.

Keywords: Protein crystallization; X-ray crystallography; Lys49-PLA₂; Asp49-PLA₂; *p*-bromophenacyl bromide; *Bothrops jararacussu* venom; *Bothrops pirajai* venom; *Crotalus durissus terrificus* venom; snake venom.

Lista de Ilustrações

Figura 01:	Sítios de atuação das fosfolipases. As PLA ₂ s atuam nas ligações <i>sn</i> -2 dos fosfolípidios numerados estereoespecificamente. (Lehninger <i>et al.</i> , 1993).....	21
Figura 02:	Enovelamento de uma PLA ₂ (isoforma CB1 da crotoxina B do veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i> (PDB id: 2QOG) – programa “PyMol” (DeLano, 2002).....	24
Figura 03:	<i>a.</i> Loop de ligação de Ca ⁺² de uma Asp49-PLA ₂ de <i>Naja naja naja</i> . <i>b.</i> Região análoga à região de ligação de Ca ⁺² da BaspTX-II (Lys49-PLA ₂) do veneno de <i>Bothrops asper</i> (Arni & Ward, 1996 e Ward <i>et al.</i> , 1998).....	27
Figura 04:	Espécime adulto de <i>Crotalus durissus terrificus</i> (http://consejo.bz/belize/images/animals/snakes/crotalus-d-rattlesnake.jpg).....	35
Figura 05:	Espécime adulto de <i>Bothrops pirajai</i> (Foto: Giuseppe Puerto, gentilmente cedida por Marcio Martins).....	37
Figura 06:	Espécime adulto de <i>Bothrops jararacussu</i> (http://www.univap.br/cen/serpentario/fotos/crotalidae_bothrops/04.jpg - Foto: Sabina Domingues Leonardo).....	38
Figura 07:	Fêmea jovem de <i>Bothrops moojeni</i> (http://eco.ib.usp.br/labvert/Jararaca/imagens/moojeni_foto1.htm) - Foto: Cristiano Nogueira.....	40
Figura 08:	Cristais da crotoxina B do veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i> formados após 20 dias a 18° C.....	52
Figura 09:	Alinhamento das duas isoformas CB1 e CB2 da crotoxina B. As seqüências de aminoácidos foram numeradas de acordo com Renetseder <i>et al.</i> (1985) – programa GeneDoc (Nicholas <i>et al.</i> , 1997).....	54

- Figura 10:** Tetrâmero da crotoxina B formado pela complexação das isoformas CB1/CB2 . Vermelho-monômero A (CB2), violeta-monômero B (CB1), verde-monômero C (CB1) e azul-monômero D (CB2). As duas esferas em amarelo são os íons de Ca^{2+} – programa PyMol (DeLano, 2002)..... 55
- Figura 11:** Diagrama de Ramachandran. 90,3% dos resíduos dispostos nas regiões mais favoráveis (vermelho), 9,2% encontrados nas regiões permitidas (amarelo escuro), 0,5% nas regiões generosamente permitidas (amarelo claro) e nenhum resíduo em regiões não permitidas (branco) – programa PROCHECK (Laskowski, 1993)..... 56
- Figura 12:** Fator de temperatura da crotoxina B. A diferença de cores indica desde locais com temperaturas mais elevadas (vermelho) até regiões mais estáveis (azul) – programa PyMol (DeLano, 2002)..... 57
- Figura 13:** Distribuição monomodal das amostras de crotoxina B a 1,0 mg/mL (esquerda) e 6,0 mg/mL (direita)..... 59
- Figura 14:** a. Eletroforese SDS-PAGE a 12% corada com *Comassie blue*. b. Análise eletroforética feita pelo VDS. Coluna 1. Marcador de massa molecular (kDa); 2. Crotoxina B reduzida (20 μg) + β -mercaptoetanol (20 mM); 3. CB reduzida (20 μg) + β -mercaptoetanol (5 mM). Colunas 4 e 5: CB não-reduzida..... 60
- Figura 15:** Superposição dos átomos de C^α dos dímeros que compõem o tetrâmero da crotoxina B; Em azul claro: dímero formado pelos monômeros A e C e em rosa: monômeros B e D – programa PyMol (DeLano, 2002)..... 61
- Figura 16:** Superposição dos átomos de C^α dos quatro monômeros da crotoxina B destacando as regiões com maiores desvios estruturais entre as isoformas CB1 e CB2 – programa PyMol (DeLano, 2002)..... 64
- Figura 17:** Região de ligação de Ca^{2+} da isoforma CB1. Os átomos de Ca^{2+} estão inseridos em suas respectivas densidades eletrônicas (mapa $3|F_{\text{obs}}|-2|F_{\text{calc}}|$), com corte de $3,0\sigma$ (distâncias em Å) – programa PyMol (DeLano, 2002)..... 66

- Figura 18:** Pontes salinas formadas entre os resíduos Ser1 (isoforma CB2 – monômeros A e D) e Glu92 (isoforma CB1 – monômeros B e C) (distâncias em Å) – programa PyMol (DeLano, 2002)..... 67
- Figura 19:** Regiões expostas a superfície externa da crotoxina B. Os N-terminais estão indicados em azul, os *loops* de ligação de Ca²⁺ em rosa escuro, as *β-wings* em verde e os C-terminais em alaranjado. *a.* Tetâmero; *b.* Dímero 1 (monômeros A (CB2) e C (CB1)); *c.* Dímero 2 (monômeros B (CB1) e D (CB2)) – programa PyMol (DeLano, 2002)..... 69
- Figura 20:** Cristais dos complexos PrTX-I-BPB e BthTX-I-BPB. *a.* PrTX-I-BPB formados após 60 a 18° C; *b.* BthTX-I-BPB formados após 15 dias a 18° C; *c.* BthTX-I-BPB formados após 30 dias a 10° C..... 71
- Figura 21:** *a.* PrTX-I modificada quimicamente pelo BPB – monômero A (azul claro), monômero B (vermelho escuro), His48-BPB (vermelho e azul) e moléculas de isopropanol (verde); *b.* BthTX-I-BPB dimérica – monômero A (azul), monômero B (ciano), His48-BPB (azul claro), átomo de bromo (cinza) e moléculas de isopropanol (verde); *c.* BthTX-I-BPB monomérica – programa PyMol (DeLano, 2002)..... 75
- Figura 22:** Diagrama de Ramachandran. 91,8% dos resíduos dispostos nas regiões mais favoráveis (vermelho), 8,2% encontrados nas regiões permitidas (amarelo escuro) e nenhum resíduo em regiões generosamente permitidas (amarelo claro) ou não permitidas (branco) – programa PROCHECK (Laskowski, 1993)..... 78
- Figura 23:** Fator de temperatura da PrTX-I-BPB. A diferença de cores indica desde regiões com fator de temperatura mais elevados (vermelho) até locais estáveis (azul) – programa PyMol (DeLano, 2002)..... 78

- Figura 24:** Interações entre os monômeros A (violeta) e B (vermelho) que estabilizam o dímero da PrTX-I-BPB. Contatos polares são indicados em linhas tracejadas, contatos hidrofóbicos são mostrados por arcos com traços. Átomos de carbonos, nitrogênio e oxigênios são pretos, azuis e vermelhos, respectivamente – programa DIMPLOT (Wallace *et al.*, 1995)..... 80
- Figura 25:** Região da His48-BPB da proteína BthTX-I monomérica sob o mapa de densidade eletrônica $3 |F_{obs}| - 2 |F_{calc}|$ foram feitas com diferentes cortes (valores de σ) para demonstrar a ocupação parcial do BPB e do átomo de bromo. *a.* MDE com corte de $1,1\sigma$; *b.* MDE com corte de $3,5\sigma$; *c.* MDE com corte de $4,5\sigma$ – programa “O” (Jones *et al.*, 1990)..... 81
- Figura 26:** Mapa de densidade eletrônica com coeficiente $3 |F_{obs}| - 2 |F_{calc}|$ da PrTX-I-BPB; *a.* zoom da região de ligação do BPB no monômero A com corte de $1,6\sigma$; *b.* monômero B (BPB – His48) com corte de $1,2\sigma$; *c.* MDE com corte de $5,5\sigma$ mostrando densidade eletrônica somente dos átomos de bromo das moléculas de BPB – programa “O” (Jones *et al.*, 1990)..... 81
- Figura 27:** Superposição entre os átomos de C^α da PrTX-I e PrTX-I-BPB. As principais alterações estruturais estão destacadas – programa PyMol (DeLano, 2002)..... 86
- Figura 28:** Superposição entre os resíduos de C-terminal da PrTX-I e PrTX-I-BPB – programa “O” (Jones *et al.*, 1990)..... 87
- Figura 29:** Cristais da BthTX-II formados após 60 dias em temperatura constante de 18°C 91
- Figura 30:** Dímero da BthTX-II indicando as regiões com fatores de temperaturas desde regiões menos instáveis (em vermelho e alaranjado) a regiões mais estáveis (azul escuro) – programa PyMol (DeLano, 2002)..... 95

- Figura 31:** Superposição entre os átomos de C^α dos dímeros da BthTX-II, PrTX-III de *Bothrops pirajai* (Asp49-PLA₂s com baixa atividade catalítica) e da BthTX-I de *B. jararacussu* (Lys49-PLA₂s) indicando a semelhança conformacional entre as estruturas – programa PyMol (DeLano, 2002)..... 96
- Figura 32:** Superposição de átomos de C^α da BthTX-II e seis PLA₂s. *a.* superposição entre os monômeros A; *b.* zoom do *loop* de ligação de Ca²⁺, a esfera vermelha representa o íon Ca²⁺ (BthA-I, Asp49-PLA₂ ácida) – programa PyMol (DeLano, 2002)..... 97
- Figura 33:** Superposição entre a BthTX-I e BthA-I indicando a ponte de hidrogênio entre a Tyr28 e Asp49 e as diferentes posições entre a cadeia lateral dos resíduos Tyr28 e cadeias principais/laterais dos resíduos 30-32 (principalmente os Leu31-BthA-I e Trp31-BthTX-II) – programa PyMol (DeLano, 2002)..... 97
- Figura 34:** Monocristais de MjTX-I nativa formados após 347 dias a 18° C..... 99
- Figura 35:** Tetrâmero da MjTX-I. Vermelho-monômero A; magenta-monômero B; verde-monômero C; azul-monômero D – programa PyMol (DeLano, 2002)..... 102
- Figura 36:** Diagrama de Ramachandran. 75,5% dos resíduos dispostos nas regiões mais favoráveis (vermelho), 18,2% encontrados nas regiões permitidas (amarelo escuro), 3,6% nas regiões generosamente permitidas (amarelo claro) e 2,2% em regiões não permitidas (branco) – programa PROCHECK (Laskowski, 1993)..... 104

Lista de Tabelas

Tabela 01: Estatísticas do processamento dos dados de difração de raios-X da crotoxina B do veneno de <i>Crotalus durrisus terrificus</i> (Marchi-Salvador <i>et al.</i> , 2007).....	53
Tabela 02: Estatísticas de refinamento do modelo cristalográfico do complexo CB1/CB2 da crotoxina B (Marchi-Salvador <i>et al.</i> , 2008a).....	58
Tabela 03: Distâncias e tipos de interações envolvidas na estabilização dos dímeros que formam o tetrâmero da crotoxina B.....	62
Tabela 04: Estatísticas do processamento de dados de difração de raios-X da PrTX-I-BPB (Santos <i>et al.</i> , 2007).....	72
Tabela 05: Estatísticas das coletas de dados de difração de raios-X da BthTX-I-BPB (Marchi-Salvador <i>et al.</i> , 2006).....	73
Tabela 06: Estatísticas de refinamento estrutural do complexo PrTX-I-BPB (Marchi-Salvador <i>et al.</i> , 2008b).....	77
Tabela 07: Estatísticas de refinamento das estruturas complexo BthTX-I-BPB.....	79
Tabela 08: Estatísticas do processamento dos dados de difração de raios-X da BthTX-II (Corrêa <i>et al.</i> , 2006).....	92
Tabela 09: Estatísticas do refinamento estrutural da BthTX-II (Corrêa <i>et al.</i> , 2008).....	94
Tabela 10: Estatísticas do processamento de dados de difração de raios-X da MjTX-I (Marchi-Salvador <i>et al.</i> , 2005).....	100
Tabela 11: Tipos e distâncias de interações envolvidos na estabilização do tetrâmero da MjTX-I.....	103

Lista de Abreviaturas

PLA ₂	Fosfolipase A ₂ (E. C. 3. 1. 1. 4.).
CB	Crotoxina B, Asp49-PLA ₂ básica purificada do veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i> .
CB1 e CB2	Isoformas da proteína crotoxina B.
PrTX-I	Piratoxina I, Lys49-PLA ₂ básica purificada do veneno de <i>Bothrops pirajai</i> .
BthTX-I	Botropstoxina I, Lys49-PLA ₂ básica purificada do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> .
BthTX-II	Botropstoxina II, Asp49-PLA ₂ básica purificada do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> .
MjTX-I	Miotoxina I, Lys49-PLA ₂ básica purificada do veneno de <i>Bothrops moojeni</i> .
PEG	Polietileno glicol
HEPES	Ácido (N-[2-Hidroxietil]piperazina-N-[2-Etanossulfônico])
TRIS	Tris-hidroximetil amino metano
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na presença de SDS
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz
BPB	Brometo de <i>p</i> -bromofenacila
NBSF	Fluoreto de 2-nitrobenzenosulfonila
NPSC	Cloreto de <i>o</i> -nitrofenilsulfenila
CNBr	Brometo de cianogênio
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
F _{obs}	Fator de estrutura observado
F _{calc}	Fator de estrutura calculado
R _{merge} ou R _{sym}	Índice de discordância entre as intensidades de reflexões simetricamente equivalentes
<i>r.m.s.</i>	Root-mean-square

Sumário

Resumo.....	<i>i</i>
Abstract.....	<i>ii</i>
Lista de Ilustrações.....	<i>iii</i>
Lista de Tabelas.....	<i>viii</i>
Lista de Abreviaturas.....	<i>ix</i>
1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. Fosfolipases A ₂ : classificação e importância científica.....	19
1.2. Fosfolipases A ₂ de veneno de serpentes: estrutura e função.....	23
1.3. Asp49-PLA ₂ s e Lys49-PLA ₂ s.....	26
1.4. Inibição e inibidores de PLA ₂ s.....	30
1.5. Uma rápida abordagem das proteínas estudadas.....	34
1.5.1. Crotoxina B.....	34
1.5.2. PrTX-I.....	36
1.5.3. BthTX-I e BthTX-II.....	38
1.5.4. MjTX-I.....	40
2. OBJETIVOS.....	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
3.1. Obtenção das amostras – purificação e modificação química da His48.....	45
3.2. Cristalização de proteínas.....	46
3.3. Espalhamento dinâmico de luz (DLS).....	47
3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	47
3.5. Coleta de dados de difração de Raios-X.....	48
3.6. Processamento dos dados de difração.....	48
3.7. Determinação da estrutura protéica.....	49
3.8. Modelagem manual e refinamento da estrutura protéica.....	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1. CROTOXINA B (Apêndices I e II).....	52
4.1.1. Cristalização (Marchi-Salvador <i>et al.</i> , 2007).....	52
4.1.2. Coleta e processamento de dados de difração de raios-X (Marchi-Salvador <i>et al.</i> , 2007).....	52

4.1.3. Elucidação, modelagem manual, refinamento e validação estrutural (Marchi-Salvador <i>et al.</i> , 2008a).....	53
4.1.4. Espalhamento dinâmico de luz e eletroforese em gel de poliacrilamida (Marchi-Salvador <i>et al.</i> , 2008a).....	57
4.1.5. Análise estrutural da crotoxina B (Marchi-Salvador <i>et al.</i> , 2008a).....	60
4.2. Lys49-PLA ₂ s modificadas quimicamente pelo brometo de <i>p</i> -bromefenacila (BPB) – PrTX-I-BPB (Apêndices III e IV) e BthTX-I-BPB (Apêndice V).....	70
4.2.1. Cristalização (dos Santos <i>et al.</i> , 2007e Marchi-Salvador <i>et al.</i> , 2006).....	70
4.2.2. Coleta e processamento de dados de difração de raios-X (Marchi-Salvador <i>et al.</i> , 2006 e dos Santos <i>et al.</i> , 2007).....	71
4.2.3 Elucidação, modelagem manual, refinamento e validação estrutural (Marchi-Salvador <i>et al.</i> , 2008b).....	73
4.2.4. Conformação dimérica alternativa para as Lys49-PLA ₂ s.....	82
4.2.5. Análise estrutural da PrTX-I modificada quimicamente pelo BPB (Marchi-Salvador <i>et al.</i> , 2008b).....	84
4.3. BthTX-II (Apêndices VI e VII).....	91
4.3.1. Cristalização (Corrêa <i>et al.</i> , 2006).....	91
4.3.2. Coleta e processamento de dados de difração de raios-X (Corrêa <i>et al.</i> , 2006)....	91
4.3.3. Elucidação, modelagem manual, refinamento e validação estrutural (Corrêa <i>et al.</i> , 2008).....	93
4.3.4. Análise estrutural da BthTX-II (Corrêa <i>et al.</i> , 2008).....	95
4.4. MjTX-I (Apêndice VIII).....	99
4.4.1. Cristalização (Marchi-Salvador <i>et al.</i> , 2005).....	99
4.4.2. Coleta e processamento de dados de difração de raios-X (Marchi-Salvador <i>et al.</i> , 2005).....	99
4.4.3. Elucidação e dados preliminares de modelagem manual e refinamento estrutural.....	101
5. CONCLUSÕES.....	106
6. REFERÊNCIAS.....	110
APÊNDICE I: Preliminary X-ray crystallographic studies of a tetrameric phospholipase A ₂ formed by two isoforms of crotoxin B from <i>Crotalus durissus terrificus</i> venom.....	125

APÊNDICE II: Insights into the role of oligomeric state on the biological activities of crotoxin: crystal structure of a tetrameric phospholipase A ₂ formed by two isoforms of Crotoxin B from <i>Crotalus durissus terrificus</i> venom.....	129
APÊNDICE III: Preliminary X-ray crystallographic studies of a Lys49-phospholipase A ₂ homologue from <i>Bothrops pirajai</i> venom complexed with p-bromophenacyl bromide and alpha-tocopherol inhibitors.....	139
APÊNDICE IV: Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a myotoxic Lys49-PLA ₂ from <i>Bothrops jararacussu</i> venom complexed with p-bromophenacyl bromide.....	144
APÊNDICE V: Preliminary X-ray crystallographic studies of BthTX-II, a myotoxic Asp49-phospholipase A ₂ with low catalytic activity from <i>Bothrops jararacussu</i> venom.....	149
APÊNDICE VI: Crystal structure of a myotoxic Asp49-phospholipase A ₂ with low catalytic activity: Insights into Ca ²⁺ -independent catalytic mechanism.....	153
APÊNDICE VII: Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of myotoxin I, a Lys49-phospholipase A ₂ from <i>Bothrops moojeni</i>	163
APÊNDICE VIII: Resumo teórico das técnicas utilizadas.....	167

As serpentes na religião hinduísta são consideradas, juntamente com os dois grandes Deuses Védicos Vishu e Civa, como transportadoras do mundo ao qual asseguram a estabilidade.

A mitologia grega conta que Hermes, tendo encontrado na Arcádia duas serpentes a lutar, separou-as com a bengala em torno da qual elas se enrolaram apaziguadas...

*Serpente
Símbolo da paz
para Gregos e
Hindus...*

Entre judeus e cristãos, a serpente é a personificação do próprio diabo. Símbolo da malícia e da traição entre os ocidentais. Entre os romanos venerava-se o impecável destino sob a forma de uma serpente...

Para os antigos Egípcios a cobra era o símbolo do Alto Egito. A deusa "uraeus" era associada às representações do faraó, a quem tinha por missão proteger...

Na tradição oriental, a serpente é símbolo de prudência e sabedoria, além de estar associada à sensualidade. Símbolo das energias adormecidas na terra e dos seres humanos - energia kundalini: primordial de toda a vida.

1. INTRODUÇÃO



Ao longo do curso da história da civilização, as serpentes (do latim *serpens*, *serpentis*) despertaram uma única e particular fascinação para os humanos, estando impregnadas no imaginário popular através de mitos, crenças e símbolos. Na simbologia, toda serpente é um animal ctônico¹ e misterioso, pode ser rival ou instruir os homens nos mistérios divinos...

Acredita-se que as serpentes possam ter surgido há mais de 135 milhões de anos atrás, talvez no final do período Jurássico (Rage, 1994). O fóssil de serpente mais antigo data de cerca de 100 milhões de anos, do Cretáceo Médio (Era Mesozóica) (Cardoso *et al.*, 2003).

O Brasil possui uma riquíssima fauna de serpentes composta por 265 espécies divididas em 73 gêneros, reunidos em 9 famílias, das quais somente duas congregam espécies peçonhentas: Elapidae e Viperidae, ou seja, aquelas que produzem toxinas em glândulas especializadas e têm aparelhos apropriados para inoculá-las (Cardoso *et al.*, 2003; Melgarejo, 2003).

A família Viperidae, com aproximadamente 250 espécies distribuídas pelo mundo, representa o grupo de serpente mais importante para a saúde pública, sendo responsável pela maioria e os mais graves acidentes ofídicos registrados, não só no Brasil, como em outros países. A fauna brasileira inclui cinco gêneros que englobam 36 espécies e subespécies (Cardoso *et al.*, 2003).

O gênero *Bothrops* engloba 24 espécies e, do ponto de vista médico, são responsáveis por mais de 90% dos acidentes ofídicos anuais que o Brasil registra (Cardoso *et al.*, 2003). Já, o gênero *Crotalus* é representado por uma única espécie dividida em cinco subespécies, as quais são responsáveis por 7,7% dos acidentes ofídicos ocorridos no Brasil (Cardoso *et al.*, 2003; Melgarejo, 2003). Deve-se a José de Anchieta, no ano de 1590, o primeiro registro original de acidentes ofídicos ocorridos no Brasil (Cardoso *et al.*, 2003). No

¹ o termo ctônico (do grego *khthonios*, “relativo à terra”, “terreno”) designa ou refere-se aos deuses ou espíritos do mundo subterrâneo, por oposição às divindades olímpicas.

entanto, a produção de soro antiofídico iniciou-se somente em 1901, com Vital Brazil (Melgarejo, 2003).

Venenos de serpentes são ricos em diversos compostos com atividades tóxicas, bioquímicas e farmacológicas. São constituídos por uma complexa mistura de peptídeos, substâncias inorgânicas, enzimas e proteínas. O estudo aprofundado destes compostos tóxicos, principalmente das frações protéicas (complexadas ou não), pode ser uma área bastante promissora na busca e desenvolvimento de novos fármacos, bem como contribuir no entendimento de processos bioquímicos, fisiológicos e patológicos que ocorrem nos seres vivos, uma vez que os efeitos locais e/ou sistêmicos provocados pelo envenenamento não conseguem ser evitados somente com o uso da soroterapia.

A natureza e as propriedades biológicas dos componentes dos venenos de serpentes são peculiares para cada espécie animal. A concentração destes componentes nos venenos pode variar intra-especificamente quanto ao seu conteúdo protéico ou devido a diversos fatores como variações climáticas, geográficas, sexuais, etárias, alimentares, tempo decorrido entre as extrações, heranças genéticas entre outros (Lomonte & Carmona, 1992; Valiente *et al.*, 1992; Monteiro *et al.*, 1998 e Soares *et al.*, 2004).

1.1. Fosfolipases A₂: classificação e importância científica

Dentre as diversas proteínas que compõem os venenos de serpentes, estão as fosfolipases A₂ (PLA₂ - E.C.3.1.1.4), enzimas largamente distribuídas na natureza e extensivamente estudadas (Dennis, 1983; Waite, 1987; Dennis, 1994).

PLA₂s são proteínas multifuncionais capazes de participar de diversos processos fisiológicos como o remodelamento de membranas, a digestão de fosfolipídios e os

mecanismos de transdução de sinais. Além disso, são enzimas mediadoras de vários processos inflamatórios, podendo ser aplicadas em diversas áreas da medicina como, por exemplo, na detecção de pré-eclampsia severa, ações gerais de anestésicos, tratamento de artrites reumatóides, atuando como agentes bacteriológicos em glândulas lacrimais e outros tecidos, bloqueando a entrada do vírus dentro da célula hospedeira (uma nova classe de inibidores do HIV) e destacando-se como um potencial agente antimalária (Uhl *et al.*, 1997; Moreira *et al.*, 2002 e Soares *et al.*, 2004).

As PLA₂s podem ser encontradas tanto no interior (PLA₂s intracelulares – cPLA₂) como no exterior das células (PLA₂s extracelulares – sPLA₂) (Arni & Ward, 1996 e Six & Dennis, 2000; Selistre-de-Araujo & Souza, 2007). PLA₂s intracelulares são encontradas no citosol, apresentam alta massa molecular (85 kDa), geralmente estão associadas às membranas e são cálcio-dependentes. São enzimas envolvidas no metabolismo de fosfolipídios, na sinalização celular e no remodelamento de fosfolipídios (Mukherjee *et al.*, 1994; Arni & Ward, 1996 e Six & Dennis, 2000). As PLA₂s extracelulares são enzimas abundantes em muitos fluidos biológicos, particularmente em secreções pancreáticas, exudados inflamatórios e em venenos de répteis (serpentes e lagartos), insetos e artrópodes (Rosenberg, 1990; Arni & Ward, 1996 e Ownby, 1999). São enzimas pequenas (119 a 143 aminoácidos), estáveis, de baixa massa molecular (12 a 15 kDa) e cálcio-dependentes.

A atividade catalítica das PLA₂s foi primeiramente observada no veneno de *Naja naja* e em seguida em secreções pancreáticas de mamíferos (Soares *et al.*, 2004) atuando sobre substratos lipídicos catalisando a hidrólise da ligação éster *sn*-2 (*sequentially numbered*), em quatro diferentes posições dos fosfolipídios de membranas biológicas e artificiais (Figura 01). Como produto desta atividade têm-se a liberação de quantidades equimolares de ácidos graxos (ácido oléico - reserva energética, e ácido aracdônico - precursor de eicosanóides que atuam como mediadores de inflamações) (Waite, 1987 e Arni

& Ward, 1996) e lisofosfolípídeos (importantes na sinalização celular e perturbação de membranas) (Moolenaar *et al.*, 1997; Kudo & Murakami, 2002; Selistre-de-Araujo & Souza, 2007). Devido a grande importância das PLA₂s na liberação de substâncias que desencadeiam o processo inflamatório, estas enzimas são alvos de importantes estudos farmacológicos, terapêuticos e de biologia molecular estrutural, podendo ser usadas como modelos para produção de agentes antiinflamatórios.

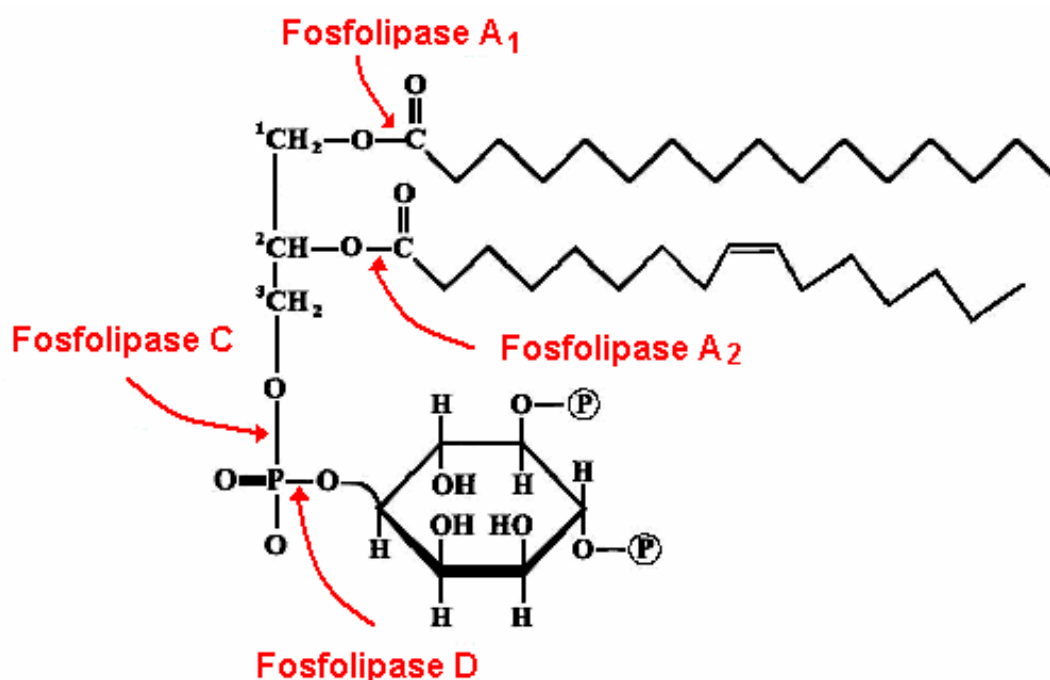


Figura 01: Sítios de atuação das fosfolipases. As PLA₂s atuam nas ligações *sn*-2 dos fosfolípídios numerados estereoespecificamente. (Lehninger *et al.*, 1993).

Inicialmente, as PLA₂s foram classificadas em dois grupos de acordo com as posições de suas pontes dissulfeto (Heinrikson *et al.*, 1977; Dufton & Hider, 1983). Em 2000, Six & Dennis propuseram uma nova classificação, em 11 grupos, com base na sequência de aminoácidos e na localização das pontes dissulfeto. Atualmente, a superfamília das PLA₂s extracelulares é composta por 15 grupos (Schaloske *et al.*, 2006) que, a despeito de suas distribuições e ocorrências variadas, caracterizam-se por apresentarem similaridade

seqüencial e estrutural, diferenciando-se somente pela localização e quantidade de pontes dissulfeto e pelo comprimento de seus *loops*. Segundo a classificação de Six & Dennis (2000) e de acordo com Rosenberg (1990), as PLA₂s dos grupos I e II são os componentes principais dos venenos de serpentes. O grupo II é subdividido em sete subgrupos (IIA-IIIF), sendo que o subgrupo IIA engloba as PLA₂s encontradas nos venenos de serpentes da família Viperidae e em tecidos não pancreáticos de mamíferos (Six & Dennis, 2000). Devido ao constante avanço de técnicas de seqüenciamento e caracterização estrutural, novas PLA₂s foram e continuam sendo descobertas, necessitando-se de constante revisão bibliográfica para atualização de seus grupos e subgrupos.

Apesar da pequena variação seqüencial e estrutural, as PLA₂s destacam-se pelo seu grande espectro de atividades biológicas que podem ou não estar correlacionadas com sua atividade catalítica primária. Os efeitos tóxicos e farmacológicos adicionais descritos para as PLA₂s encontradas em venenos de serpentes incluem neurotoxicidade pré e/ou pós-sináptica, miotoxicidade, cardiotoxicidade, atividades anticoagulante, bactericida, convulsivo, de indução de edema, atividades hipotensiva, hemolítica, entre outras (Kini & Evans, 1989; Rosenberg, 1990; Evans & Kini, 1997; Kini, 1997; Gutiérrez & Lomonte, 1997; Ownby, 1999; Braud *et al.*, 2000; Valentin & Lambeau, 2000; Andrião-Escarso *et al.*, 2000; Andrião-Escarso *et al.*, 2002; Kudo & Murakami, 2002; Selistre-de-Araujo & Souza, 2007).

Muitos estudos com determinantes estruturais de atividades farmacológicas baseadas em comparação de seqüências (Kini & Iwanaga, 1986; Kini & Evans, 1987) e distribuição de resíduos carregados ou características hidrofóbicas (Tsai *et al.*, 1987) têm sido realizados, porém estes estudos ainda são especulativos e nem sempre podem ser aplicados.

Devido aos inúmeros efeitos farmacológicos associados as PLA₂s do grupo IIA, bem como à abundância em venenos de serpentes e à facilidade de purificá-las, estas proteínas têm sido extensamente estudadas (Ward *et al.*, 1998).

1.2. Fosfolipases A₂ de veneno de serpentes: estrutura e função

Com a rápida expansão das técnicas de biologia molecular, tornou-se disponível um grande número de seqüências de PLA₂s nos bancos de dados obtidos, em grande parte, pela clonagem, expressão, isolamento e posterior seqüenciamento genético, embora o seqüenciamento direto da proteína ainda dê sua contribuição (Heinrickson, 1991).

PLA₂s de venenos de serpentes apresentam em sua estrutura primária de 120 a 123 aminoácidos que seguem o modelo de numeração da PLA₂ de pâncreas bovino (Renetseder *et al.*, 1985). Embora tanto o grupo I quanto o grupo II das PLA₂s apresentem sete pontes dissulfeto, o grupo I apresenta uma ponte entre os resíduos de Cys11 e Cys77, ausente no grupo II que, no entanto, apresenta uma ponte alternativa entre Cys51 e Cys133. Deve-se ressaltar que há exceção de três seqüências (*Bitis gabonica* (Botes & Viljoen, 1976), *B. nasicornis* (Joubert *et al.*, 1983) e *Cerastes cerastes* (Siddiqi *et al.*, 1991)) relatadas da família Viperidae que possuem apenas seis pontes dissulfeto (Arni & Ward, 1996).

Utilizando o sistema de numeração proposto por Renetseder *et al.* (1985), a estrutura terciária básica das PLA₂s é composta por uma região de N-terminal (resíduos 1-12) representada por uma hélice- α I (“h1”) – região envolvida na ligação e orientação de substratos à proteína (canal hidrofóbico das PLA₂s); em seguida tem-se a hélice curta (*short helix*) formada pelos resíduos 18-23. Entre os resíduos 25-34 está localizado o *loop* de ligação do íon Ca⁺² seguido pela hélice- α II (“h2”) constituída pelos resíduos 40-55, a qual se liga a uma curta folha β antiparalela (*β -wing*) (resíduos 75 ao 77 e 82 ao 84). Após a região de *β -wing*, os resíduos 90-107 formam hélice- α III (“h3”) que se liga a uma região bastante flexível, denominada *loop* de C-terminal (resíduos 108-133) (Figura 02). Estes três últimos seguimentos, “h2”, *β -wing* e “h3” alocaam resíduos que constituem o sítio catalítico (His48,

Asp49, Tyr52 e Asp99) das PLA₂s (Arni & Ward, 1996; Ward *et al.*, 1998; de Azevedo, 1999).

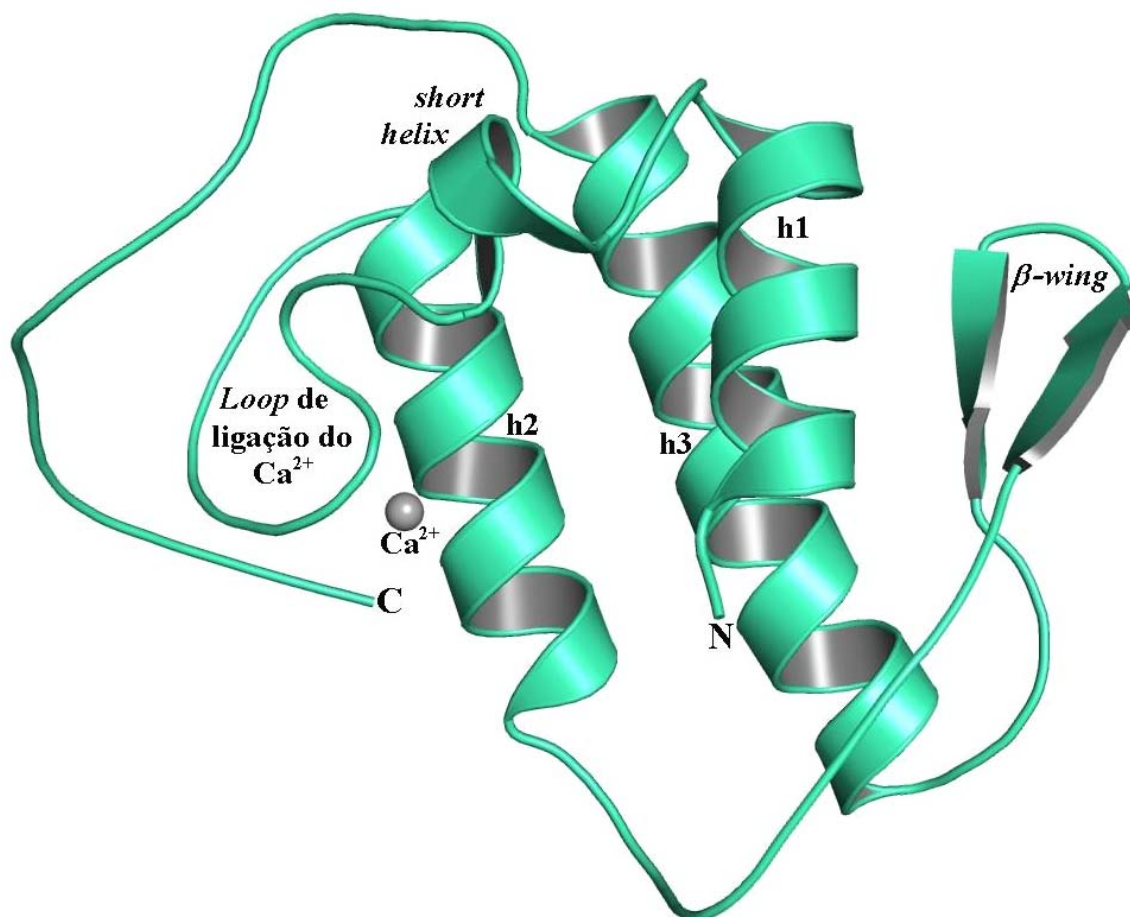


Figura 02: Enovelamento de uma PLA₂ (isoforma CB1 da crotoxina B do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (PDB id: 2QOG) – programa “PyMol” (DeLano, 2002).

Desta formação tridimensional, três regiões – “h1”, sítio ativo e de ligação de cálcio, retêm um significativo grau de homologia entre as PLA₂s do grupo II, contribuindo para a formação de elementos estruturais altamente conservados de estruturas secundária e terciária (Arni & Ward, 1996). No entanto, regiões que apresentam baixo grau de homologia correspondem a elementos pouco conservados (por exemplo, o *loop* do C-terminal, região, provavelmente, responsável pelos vários efeitos farmacológicos exibidos pelos diferentes venenos).

Uma importante característica estrutural das classes I e II é a presença de duas grandes hélices- α antiparalelas (“h2” e “h3”) ligadas por pontes dissulfeto, nas quais as cadeias laterais de resíduos hidrofílicos, geralmente, estão expostas para o solvente enquanto que as de resíduos hidrofóbicos estão voltadas para o interior da proteína, com exceção dos resíduos que formam a região catalítica (His48, Asp49, Tyr52 e Asp99). Ainda, a região C-terminal das PLA₂s do grupo II apresentam um *loop* com 5 a 7 resíduos a mais que o encontrado no grupo I, indicando que esta região apresenta importantes atividades farmacológicas (Gutiérrez & Lomonte, 1995).

A estrutura oligomérica das PLA₂s é bastante variável, tanto em solução como em formas cristalinas, apresentando conformações quaternárias monoméricas (Holland *et al.*, 1990; Magro *et al.*, 2004), diméricas (Arni, *et al.*, 1995; de Azevedo *et al.*, 1997; Fontes *et al.*, 2000; Magro *et al.*, 2003; Magro *et al.*, 2004; Takeda *et al.*, 2004; Magro *et al.*, 2005; dos Santos *et al.*, 2005; Corrêa *et al.*, 2006; Marchi-Salvador *et al.*, 2006; dos Santos *et al.*, 2007; Takeda *et al.*, 2008; Corrêa *et al.*, 2008), triméricas (Fremont *et al.*, 1993) e tetraméricas (Marchi-Salvador *et al.*, 2005; Marchi-Salvador *et al.*, 2007; Marchi-Salvador *et al.*, 2008).

O íon Ca⁺² é um cofator essencial para a catálise das PLA₂s, sendo geralmente coordenado por dois átomos de oxigênio carboxilados do resíduo Asp49, três interações com átomos de oxigênio dos resíduos Tyr28, Gly30 e Gly32 situados no *loop* de ligação de cálcio e duas moléculas de água estruturalmente conservadas que completam a coordenação formando uma bipirâmide pentagonal. A substituição do cálcio por outro íon divalente, como cádmio, manganês, estrôncio ou bário, resulta numa significativa redução da atividade catalítica (Yu *et al.*, 1993; Soares *et al.*, 2002).

Tanto o mecanismo catalítico como os de ações tóxicas e farmacológicas das PLA₂s ainda não foram inteiramente compreendidos. Um dos caminhos propostos para a elucidação destes mecanismos é o estudo de PLA₂s complexadas com diversos ligantes e/ou a

análise de variedades mutantes. O papel dos primeiros é o de inibir de forma parcial ou completa as propriedades farmacológicas das proteínas ou simplesmente de revelar as interações que determinam a ligação destas substâncias aos seus sítios protéicos específicos. Já a mutação de resíduos específicos tem como objetivo estabelecer a importância de determinados aminoácidos e/ou segmentos protéicos para a atividade da proteína como um todo.

1.3. Asp49-PLA₂s e Lys49-PLA₂s

Com base nos estudos iniciais, somente a atividade de rompimento de fosfolípidios de membranas foi atribuída as PLA₂s. No entanto, com os constantes avanços, sobretudo nas áreas de bioquímica e biologia molecular estrutural, muitas enzimas foram identificadas proporcionando a caracterização de novas atividades por elas exercidas.

Como anteriormente mencionado, o resíduo de ácido aspártico na posição 49 das PLA₂s é essencial para a coordenação do íon Ca²⁺. Este resíduo é responsável, conjuntamente com outros aminoácidos, pela fixação do substrato ao sítio enzimático e conseqüentemente pela atividade catalítica exercida por estas enzimas. No entanto, a substituição natural da Asp49 por uma lisina impede a coordenação deste íon (Scott *et al.*, 1990) e, ainda, o N^e da cadeia lateral da Lys49 ocupa a posição do íon Ca⁺² inviabilizando a ocorrência da reação catalítica (Lee *et al.*, 2001) (Figura 03).

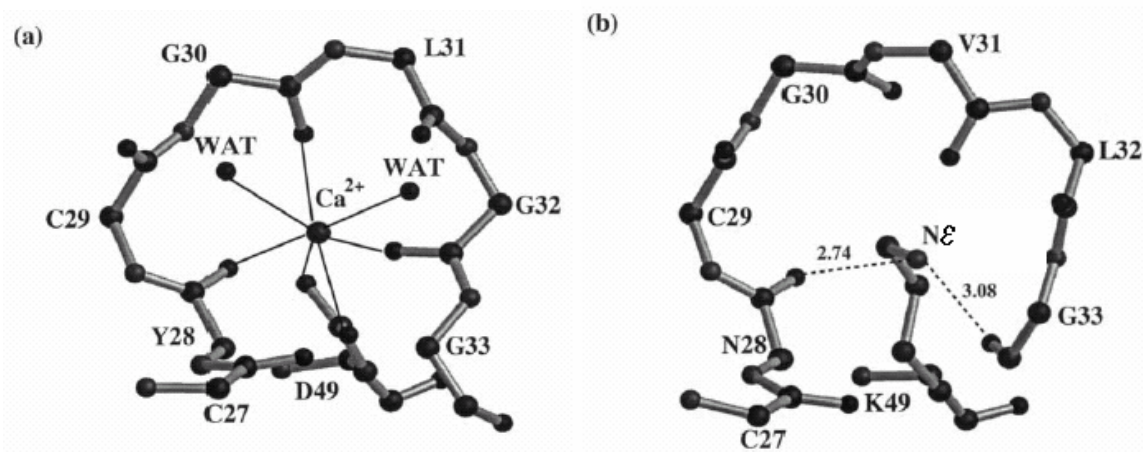


Figura 03: *a.* Loop de ligação de Ca^{2+} de uma Asp49-PLA₂ de *Naja naja naja*. *b.* Região análoga à região de ligação de Ca^{2+} da BaspTX-II (Lys49-PLA₂) do veneno de *Bothrops asper* (Arni & Ward, 1996 e Ward *et al.*, 1998).

As Lys49-PLA₂s são consideradas PLA₂s homólogas por não possuírem atividade catalítica detectável frente a substratos lipídicos. São proteínas básicas e hidrofóbicas com elevada atividade miotóxica tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Liu *et al.*, 1990; Francis *et al.*, 1991, Dennis, 1994; Gutierrez & Lomonte, 1997; Ward, 1998).

Experimentos de mutagênese sítio-dirigida realizados por Ward *et al.* (2002) em BthTX-I (Lys49-PLA₂ do veneno de *Bothrops jararacussu*) no qual o Asp49 foi substituído por uma Lys demonstrou que esta proteína continuou cataliticamente inativa sugerindo que a perda da atividade catalítica não está somente relacionada a esta substituição e sim a um conjunto de outros fatores estruturais como a interação da região de C-terminal com o loop de ligação do Ca^{2+} . Ainda, neste estudo, foi demonstrado que o N^ε da cadeia lateral da Lys49 forma pontes de hidrogênio com os oxigênios das cadeias principais dos resíduos Asn28 e Gly30 e o N^ε da cadeia lateral da Lys122 forma ponte de hidrogênio com o resíduo Cys29, direcionando o grupo amina (NH) da Gly30 para o solvente no canal hidrofóbico. Este arranjo de pontes de hidrogênio está conservado na maioria das estruturas das Lys49-PLA₂s. A posição e orientação dos resíduos His48, Tyr52, Asp99 e demais resíduos que participam da

atividade catalítica estão altamente conservadas tanto nas Asp49-PLA₂s como nas Lys49-PLA₂s.

Lomonte *et al.* (1994) e Gutiérrez & Lomonte (1995) destacaram que as regiões de C-terminais das Lys49-PLA₂s são ricas em resíduos hidrofóbicos e básicos propondo que estas regiões seriam responsáveis, principalmente, pela miotoxicidade, pois como o *loop* de C-terminal é uma região bastante flexível pode se insinuar através das membranas (celulares ou artificiais), promovendo a desestabilização destas. Corroborando a teoria de que o C-terminal é responsável pela miotoxicidade, Lee *et al.* (2001) sugeriram que a Lys122 polariza a ligação peptídica entre os resíduos Gly29 e Cys30, favorecendo a retenção do produto da catálise no sítio ativo da proteína. A não liberação deste produto explicaria, de acordo com os autores, a reduzida ou inexistente atividade catalítica das Lys49-PLA₂s. Por outro lado, este ácido graxo retido no sítio catalítico e no canal hidrofóbico, auxiliaria na expressão da atividade miotóxica das PLA₂s homólogas provocando mudanças conformacionais do C-terminal. Estas mudanças levariam a maior exposição dos resíduos hidrofóbicos ao solvente provocando o surgimento de interações eletrostáticas entre as lisinas do C-terminal e a membrana, o que auxiliaria a inserção do C-terminal nas membranas. (Ambrosio *et al.*, 2005).

Entretanto, a análise estrutural de oito Lys49-PLA₂s diméricas (BthTX-I – aberta e fechada – de *Bothrops jararacussu*, PrTX-II de *B. pirajai*, MjTX-II de *B. moojeni*, BnSP-6 e BnSP-7 de *B. pauloensis*, BaspTX-II de *B. asper* e NumMT de *B. mummifer*) feita por Magro *et al.* (2003) mostrou que a interação entre a Lys122 e a Cys29 está presente em ambos os monômeros das Lys49-PLA₂s diméricas somente nos complexos formados entre proteínas e moléculas de ácido graxo (PrTX-II (Lee *et al.*, 2001), MjTX-II (Watanabe *et al.*, 2005) e NumMT-I (de Azevedo *et al.*, 1999)). Para aquelas estruturas que não apresentam a ligação com nenhuma molécula de ácido graxo, esta interação – Lys122-Cys29, quando presente, ocorre em apenas um dos monômeros.

Chioato *et al.* (2002) e Ward *et al.* (2002) através de vários experimentos de mutagênese sítio-dirigida também comprovaram o envolvimento da região de C-terminal como determinante da atividade miotóxica e do mecanismo de rompimento de membranas das Lys49-PLA₂s: 1. substituições dos resíduos Lys115 → Ala, Lys116 → Ala, Lys122 → Ala e Phe125 → Trp indicaram redução da atividade de dano à membrana; 2. substituições dos resíduos Tyr117 → Trp, Arg118 → Ala, Tyr119 → Trp e Lys122 → Ala eliminaram as cargas positivas de suas cadeias laterais, reduzindo significativamente a atividade miotóxica, porém a atividade de dano à membrana não foi alterada; 3. substituição somente da Lys122 → Ala reduziu tanto a atividade miotóxica (em 40%) como a atividade de dano à membrana e, ainda, este mutante (Lys122 → Ala) não apresentou nenhuma atividade hidrolítica indicando que a lisina, na posição 122 é um suporte evidente para a ativação da interrupção do ciclo catalítico. Contudo, estes experimentos de mutagênese sítio-dirigida sugerem que estes resíduos da região do C-terminal estão envolvidos no *motif* estrutural que determina as atividades de miotoxicidade e dano à membrana e, ainda, indicam que estas atividades são independentes.

Experimentos com peptídeos sintéticos correspondentes aos aminoácidos 115 – 129 (C-terminal) destacaram a importância desta região, bem como a presença de aminoácidos básicos e hidrofóbicos em posições específicas para a atividade miotóxica das Lys49-PLA₂s (Lomonte *et al.*, 1999; Chioato *et al.*, 2002; Lomonte *et al.*, 2003a; Lomonte *et al.*, 2003b; Chioato *et al.*, 2007).

Análises de PLA₂s de venenos de serpentes mostram que as mutações ocorrem mais frequentemente na região dos éxons do que na região dos íntrons, propondo que a multiplicidade de isoformas encontradas em um único veneno pode ser produto de duplicação gênica e da evolução acelerada dos éxons (Ogawa *et al.*, 1996; Kini & Chan, 1999; Soares *et al.*, 2004a). Acredita-se que a seleção natural contribuiu para a evolução molecular das PLA₂s

e que substituições naturais ocorridas principalmente na superfície da molécula destas proteínas pode ser produto de mudanças de especificidade frente a tecidos específicos (Soares *et al.*, 2004a). A atribuição de diferentes atividades farmacológicas às regiões específicas da proteína pode ser melhor explicada se for considerado que estas proteínas evoluíram de uma forma particular sob pressão seletiva do meio (Nakashima *et al.*, 1995; Kini & Chan, 1999; Ohno *et al.*, 2003). Os resíduos que mais sofreram pressão seletiva são aqueles que se acomodam na superfície protéica, já que entram diretamente em contato com seus alvos (Kini & Chan, 1999).

A visível contradição entre a uniformidade estrutural e as diferentes ações farmacológicas e bioquímicas é o desencadeador do grande interesse da comunidade científica em estudar as PLA₂s. As pequenas variações existentes entre as PLA₂s tornam mais fácil a identificação de prováveis relações estruturais e funcionais. Assim sendo, uma variedade de técnicas como cristalografia de proteínas, ressonância magnética nuclear (NMR) (Peters *et al.*, 1992), dinâmica molecular (Demaret & Brunie, 1990), espalhamento de raios-X à baixo ângulo (SAXS), modificações químicas de resíduos específicos, análise da interação entre proteína e inibidores naturais ou artificiais, mutações sítio-dirigidas, espectrofotometria e fluorimetria têm sido combinadas com estudos bioquímicos em busca das relações entre estrutura-função das Asp49-PLA₂s e Lys49-PLA₂s (Soares & Giglio, 2003).

1.4. Inibição e inibidores de PLA₂s

Estudos com modificações químicas em resíduos específicos e a análise dos conseqüentes efeitos na atividade enzimática e farmacológica permitem importantes avanços na compreensão das relações estrutura-função das PLA₂s.

Entre as substâncias mais empregadas nessas modificações estão o brometo de *p*-bromofenacila (BPB), o fluoreto de *p*-nitrobenzenosulfonila (NBSF) e o cloreto de *o*-nitrofenilsulfenila (NPSC). A modificação de resíduos de lisina através da acetilação e a clivagem do N-terminal pelo CNBr (brometo de cianogênio) também são utilizados.

O brometo de *p*-bromofenacila é um inibidor específico de PLA₂s extracelulares devido a sua especificidade em modificar resíduos de histidina. A alquilação do altamente conservado resíduo His48 pelo BPB induz à perda total ou parcial da atividade de hidrólise de fosfolipídios, bem como à diminuição de efeitos tóxicos e farmacológicos desencadeados por estas proteínas (Soares *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2004a; Marcussi *et al.*, 2007).

A primeira PLA₂ modificada quimicamente pelo BPB foi a PLA₂ pancreática bovina que, após ser modificada perdeu totalmente sua atividade enzimática (Volwerk *et al.*, 1974). Desde então, esta alquilação (His48 – BPB) tem sido extensivamente utilizada em estudos que relacionam atividades tóxicas e enzimáticas das PLA₂s de venenos de serpentes, tais como: *Naja sp* (Roberts *et al.*, 1977; Babu & Gowda, 1991), *Trimeresurus sp* (Miyake *et al.*, 1989), *Agkistrodon sp* (Zhao *et al.*, 1998), *Bothrops sp* (Diaz *et al.*, 1993; Díaz-Oreiro & Gutiérrez, 1997; Toyama *et al.*, 1998; Andrião-Escarso, 2000; Soares *et al.*, 2000a,b; Soares *et al.*, 2004b; Magro *et al.*, 2005; Marchi-Salvador *et al.*, 2006; dos Santos *et al.*, 2007) e *Crotalus sp* (Soares *et al.*, 2001a).

A alquilação da His48 pelo BPB em algumas Asp49-PLA₂s ácidas resultou na perda total da atividade catalítica e reduziu consideravelmente as atividades farmacológicas sugerindo que os efeitos biológicos dependem da integridade da região responsável pela manifestação da atividade catalítica causada por estas enzimas (Serrano *et al.*, 1999; Fuly *et al.*, 2000; Díaz-Oreiro & Gutiérrez, 1997).

No entanto, quando duas Asp49-PLA₂s básicas (PrTX-III de *B. pirajai* e BthTX-II de *B. jararacussu* – ambas apresentando baixa atividade catalítica quando comparadas com as

demais Asp49-PLA₂s ácidas) foram modificadas quimicamente pelo BPB, apresentaram inibição praticamente completa das atividades catalítica, anticoagulante, miotóxica e citotóxica. Estes resultados sugerem que His48 é essencial para a hidrólise de fosfolipídio e que esses efeitos farmacológicos podem ser dependentes, ainda que parcialmente, da atividade catalítica. Demais atividades como indução de edema e disrupção de lipossomos não apresentaram significativa redução o que sugere uma possível dissociação, parcial ou não, do sítio farmacológico e o catalítico (Andrião-Escarso *et al.*, 2000; Soares & Giglio, 2003).

Com relação às Lys49-PLA₂s, a alquilação da His48 reduziu 40-50% a atividade miotóxica, 85-90% a citotoxicidade, 15-20% a capacidade de induzir a formação de edemas e diminuiu significativamente a letalidade, sem alteração expressiva da habilidade de disrupção de lipossomos, o que sugeriu dissociação parcial das atividades biológicas e farmacológicas (Díaz *et al.*, 1993; Toyama *et al.*, 1998; Andrião-Escarso, 2000; Soares *et al.*, 2000a; Soares *et al.*, 2000a b; Soares & Giglio, 2003).

Outras modificações químicas de resíduos específicos foram estudadas. A sulfonação pelo NBSF das tirosinas nas posições 52 e 73 (Tyr52 e Tyr73 – resíduos que participam indiretamente na estabilização do sítio catalítico) de duas Asp49-PLA₂s miotóxicas (PrTX-III e BthTX-II) resultou na redução parcial da atividade catalítica destas enzimas (Andrião-Escarso *et al.*, 2000; Soares *et al.*, 2001b). Já nas PrTX-I e BthTX-I (Lys49-PLA₂s) a modificação de tirosinas pelo NBSF provavelmente ocorre somente nas Tyr52 (localizado no final da hélice- α 2) e Tyr119 (região de C-terminal) reduzindo, aproximadamente, 30% a miotoxicidade, menos de 20% a atividade de rompimento de lipossomos e não apresentou relevante alteração na atividade bactericida (Soares & Giglio, 2003).

A sulfonação de resíduos de triptofano pelo NPSC é outra modificação química de resíduo específico que reduz significativamente as atividades das PLA₂s. A modificação

covalente do Trp77 (região de β -wing) nas Lys49-PLA₂s pelo NPSC ocorre, aparentemente, em apenas 55% dos resíduos de Trp (Soares *et al.*, 2000a, Soares *et al.*, 2000b; Soares & Giglio, 2003). Tal modificação, quando feita em Lys49-PLA₂s (BthTX-I, PrTX-I, MjTX-I e BnSP-7) diminuiu a miotoxicidade em 12 – 38% e a citotoxicidade em torno de 40%, enquanto que para as atividades de indução de edema e de rompimento de lipossomos esta redução não ultrapassou os 10% (Soares & Giglio, 2003).

A clivagem do octapeptídeo (Met8) do N-terminal das PLA₂s de serpentes do gênero *Bothrops* é possível através do tratamento químico com o brometo de cianogênio (CNBr). Esta alteração da estrutura secundária reduz atividades miotóxica, citotóxica, formação de edema, bactericida e capacidade de romper lipossomos (Díaz *et al.*, 1994; Soares & Giglio, 2003).

Outro ponto interessante no estudo das relações estruturais e funcionais das PLA₂s diz respeito à ação de inibidores que atuam de forma a minimizar os efeitos destas enzimas durante o processo inflamatório. Estudos bioquímicos indicam a ocorrência de diversas substâncias capazes de inibir ou reduzir a toxicidade dos venenos de serpentes como, por exemplo, o ácido esteárico (Watanabe *et al.*, 2005), a suramina (Murakami *et al.*, 2005), a vitamina E (α -tocoferol) (Chandra *et al.*, 2002) e íons bivalentes, por exemplo o Mn²⁺ (Soares *et al.*, 2002). Substâncias como a proteína CICS, isolada do sangue da serpente *Crotalus durissus terrificus* atua como antiveneno, pois neutraliza efeitos tóxicos causados pelo complexo protéico crotoxina (Perales *et al.*, 1995; Faure *et al.*, 2000).

A elucidação estrutural de PLA₂s e PLA₂s homólogas, tanto em sua forma nativa como complexadas e/ou inibidas é de extrema valia para uma melhor compreensão da atuação destas proteínas. A estrutura tridimensional das PLA₂s estão, de certa forma, vinculadas ao interesse médico, social e econômico pois podem conter informações indispensáveis que auxiliam no desenvolvimento racional de medicamentos e derivados de toxinas menos

agressivos, os quais poderão ser utilizados na produção de soros antiofídicos com reduzidos efeitos colaterais. Ainda, o conhecimento da estrutura oligomérica de toxinas é relevante não somente na fase de descoberta e otimização de candidatos a drogas, mas também em estágios posteriores do ciclo de desenvolvimento de drogas. É importante ressaltar que as características de um inibidor ideal não estão, necessariamente, acopladas às características de um fármaco ideal (Kuntz, 1992 e Verlinde & Hol, 1994).

1.5. Uma rápida abordagem das proteínas estudadas

1.5.1. Crotoxina B

A proteína crotoxina B (CB) foi isolada do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* (Figura 04). A cascavel como é conhecida popularmente, habita os cerrados do Brasil central, regiões áridas e semi-áridas do nordeste, os campos e áreas abertas do sul, sudeste e norte. Ainda estende-se pelo oeste, até algumas áreas abertas de Mato Grosso, Rondônia, Amazonas e Pará (campos abertos de Humaitá, Serra do Cachimbo e Santarém) (Cardoso *et al.*, 2003).

A crotoxina, principal componente ativo do veneno de *C. d. terrificus*, foi a primeira toxina animal purificada e cristalizada (Slotta & Fraenkel-Conrat, 1938; Faure & Bon, 1988), no entanto não há nenhum relato ou mesmo depósito de sua estrutura cristalográfica no banco de dados de estruturas protéicas (*Protein data bank*, PDB, <http://www.rcsb.org>). A crotoxina é um complexo heterodimérico formado por duas subunidades: crotoxina B (Asp49-PLA₂ básica) (Hendon & Fraenkel-Conrat, 1971; Fraenkel-

Conrat *et al.*, 1980; Aird *et al.*, 1986) e crotoxina A (CA) ou crotapotina (componente ácido que não apresenta atividade tóxica ou enzimática) (Aird *et al.*, 1985; Aird *et al.*, 1990).



Figura 04: Espécime adulto de *Crotalus durissus terrificus*
(<http://consejo.bz/belize/images/animals/snakes/crotalus-d-rattlesnake.jpg>).

Estas duas subunidades agem de forma sinérgica. A crotoxina B bloqueia a transmissão neuromuscular inibindo a liberação de acetilcolina (neurotransmissor responsável pela transmissão do estímulo nervoso) causando paralisia motora e respiratória (Vital-Brazil & Excell, 1971). Já a crotapotina é farmacologicamente inativa, porém atua como uma chaperona para a CB o que aumenta a sua atividade enzimática, neurotóxica e, conseqüentemente, apresentando maior letalidade (Breithaupt, 1976; Habermann & Breithaupt, 1978). Ações e interações que alteram efeitos tóxicos e farmacológicos fazem do veneno de serpentes, bem como de seus constituintes, um atrativo para o desenvolvimento de agentes terapêuticos ou ferramentas no estudo de alvos moleculares presentes em estados fisiológicos ou patológicos.

Diversas isoformas, tanto da subunidade CA, como da CB foram isoladas e seqüenciadas (Faure & Bon, 1988; Faure *et al.*, 1994). A análise da composição de aminoácidos da CB indicou a presença de duas isoformas principais: CB1 e CB2 que diferem

entre si por oito aminoácidos. Estas substituições resultam em modificações de atividades enzimáticas e farmacológicas: uma das isoformas, provavelmente a CB2, apresenta baixa atividade enzimática e alto potencial letal, enquanto que a outra é menos tóxica contudo exerce elevada atividade enzimática. (Faure & Bon, 1988; Faure *et al.*, 1994).

As duas isoformas da CB são Asp49-PLA₂ básicas compostas por 122 aminoácidos (CB1: M_r = 14,185 kDa e CB2: M_r = 14,245 kDa) e suas seqüências de aminoácidos estão depositadas no banco de dados UniProtKB/Swiss-Prot, sob os códigos: P62022 – CB1 e P24027 – CB2 (Faure *et al.*, 1994).

1.5.2. PrTX-I

A proteína Piratoxina-I (PrTX-I) foi isolada do veneno de *Bothrops pirajai* (Figura 05). De nome popular jararaca, esta serpente pode ser encontrada na região de Ilhéus – Itabuna, BA; foi também encontrada em Monte Santo, entre os rios Itapicuru e São Francisco (Bahia). Pode, ainda, ocorrer no nordeste de Minas Gerais (Campbell & Lamar, 1989). Atualmente esta serpente encontra-se nas listas nacionais de espécies brasileiras ameaçadas de extinção do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) e da IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais).

A PrTX-I é uma Lys49-PLA₂ básica, miotóxica, composta por 121 aminoácidos (pI = 8,2, M_r = 13,652 kDa – calculada através da seqüência de aminoácidos) e sua seqüência de aminoácidos está depositada no banco de dados UniProtKB/Swiss-Prot, sob o código: P58399 (Mancuso *et al.*, 1995 e Toyama *et al.*, 1998).



Figura 05: Espécime adulto de *Bothrops pirajai*

(Foto: Giuseppe Puerto, gentilmente cedida por Marcio Martins).

A PrTX-I apresenta alta homologia (da ordem de 95%) com as demais Lys49-PLA₂s miotóxicas botrópicas e quando comparada com a BthTX-I de *B. jararacussu*, apresenta praticamente a mesma seqüência de aminoácidos, diferindo somente em dois resíduos localizados na região de C-terminal (PrTX-I → BthTX-I: Asn115 → Lys e Asp132 → Pro) (Soares *et al.*, 2001b).

A modificação química causada pela alquilação do resíduo His48 da PrTX-I pelo brometo de *p*-bromofenacila (BPB) reduziu, respectivamente, 46% e 15% as atividades miotóxica e de indução de edemas. Já, o bloqueio neuromuscular foi completamente abolido e a letalidade (DL₅₀) foi fortemente reduzida (Soares *et al.*, 2001b e Soares & Giglio, 2003).

No entanto, demais modificações químicas de resíduos específicos tais como a sulfonação do resíduo Trp77 pelo NPSC e dos resíduos Tyr52 e Tyr119 pelo NBSF reduziram 22% e 35% a miotoxicidade e 8% e 31% a indução de edemas, respectivamente (Soares *et al.*, 2001b e Soares & Giglio, 2003).

1.5.3. BthTX-I e BthTX-II

As fosfolipases A_2 miotóxicas denominadas bothropstoxinas I e II (BthTX-I e II) foram isoladas do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (Figura 06) por Homs-Brandeburgo *et al.*, em 1988. A jararacuçu, como é conhecida popularmente, é encontrada no Mato Grosso, extremo sul da Bahia, sul de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e noroeste do Rio Grande do Sul (Campbell & Lamar, 1989). Esta serpente pode atingir 1,80 m de comprimento. É a espécie que produz a maior quantidade de veneno, sendo talvez, a mais imponente do gênero (Melgarejo, 2003).



Figura 06: Espécime adulto de *Bothrops jararacussu*

(http://www.univap.br/cen/serpentario/fotos/crotalidae_bothrops/04.jpg - Foto: Sabina Domingues Leonardo).

A BthTX-I é uma proteína básica, Lys49-PLA₂, composta por 121 aminoácidos (pI = 8,2; M_r = 13,675 kDa – UniProtKB/Swiss-Prot: Q90249 (Cintra *et al.*, 1993) e M_r = 13,667 kDa – GenBank/EMBL: X78599 (Ward *et al.*, 1995)). Embora esta proteína não apresente detectável atividade catalítica, ela é parcialmente responsável pela atividade miotóxica causada pelo veneno sendo, também, citotóxica, neurotóxica, indutora de edema,

capaz de bloquear a transmissão neuromuscular e desencadeadora de hiperalgesia (Homs-Brandeburgo *et al.*, 1988).

A BthTX-II é uma Asp49-PLA₂ básica e miotóxica, composta por 122 aminoácidos (pI = 8,5; M_r = 13,995 kDa – calculados através da seqüência de aminoácidos; NCBI: AAO27454 (Kashima *et al.* 2004)), porém destaca-se por apresentar baixa atividade catalítica (4 a 6 vezes menos ativa) quando comparada com a BthA-I, uma Asp49-PLA₂ ácida, também presente no veneno da *B. jararacussu*. No entanto, a BthTX-II apresenta consideráveis atividades miotóxica, citotóxica, anticoagulante, hemolítica, indução de agregação plaquetária e alta letalidade (Pereira *et al.*, 1998; Bonfim, 2004). Estas atividades são comuns nas Lys49-PLA₂s, o que sugere que a BthTX-II seja uma PLA₂ intermediária entre as Lys49 e Asp49-PLA₂s.

Diversos estudos com modificações químicas de aminoácidos específicos foram realizados em busca de inibições parciais ou totais para os efeitos tóxicos descrito para a BthTX-I (Andrião-Escarso *et al.*, 2000).

A alquilação do resíduo His48 da BthTX-I pelo BPB reduz 45% a atividade miotóxica, bem como em 85% e 15% as atividades citotóxica e indução de edema, respectivamente, não apresentando mudanças significativas na atividade de rompimento dos lipossomos, enquanto que a atividade letal apresentou expressiva redução (Andrião-Escarso *et al.*, 2000). A sulfonação do resíduo Trp77 pelo NPSC reduziu 35% a atividade miotóxica e 42% a citotoxicidade; já a sulfonação dos resíduos tirosina nas posições 52 e 119 pelo NBSF diminuiu 25% e 24% as atividades miotóxica e citotóxica, respectivamente. Tanto a modificação das tirosinas como do triptofano não alterou a letalidade desta proteína (Andrião-Escarso *et al.*, 2000).

1.5.4. MjTX-I

A proteína MjTX-I foi isolada do veneno de *Bothrops moojeni* (Figura 07). Esta serpente, popularmente conhecida por caissaca tem distribuição geográfica restrita às áreas de formação aberta, abrangendo do Brasil central até o sul do estado do Paraná (Campbell & Lamar, 1989).



Figura 07: Fêmea jovem de *Bothrops moojeni*

(http://eco.ib.usp.br/labvert/Jararaca/imagens/moojeni_foto1.htm) - Foto: Cristiano Nogueira.

A variação ontogenética na dieta, o desenvolvimento e o crescimento da serpente *B. moojeni* originam variações bioquímicas no veneno, determinando alterações em suas atividades biológicas (Furtado, 1987 e Soares, 1997).

A MjTX-I não apresenta mensurável atividade catalítica, sendo descrita como uma PLA₂ homóloga ou Lys49-PLA₂. Esta proteína é composta por 121 aminoácidos (pI = 8,2 e M_r = 13,669 kDa – calculados através da seqüência de aminoácidos) contendo elevada proporção de resíduos básicos e hidrofóbicos. Em solução, segundo Soares *et al.* (2000a) a MjTX-I é dimérica e quando liofilizada pode apresentar-se como dímeros, trímeros,

tetrâmeros e pentâmeros. A seqüência de aminoácidos desta proteína foi depositada no banco de dados UniProtKB/Swiss-Prot, código P82114 (Soares *et al.*, 2000a).

Os efeitos tóxicos e farmacológicos da MjTX-I são similares aos das demais Lys49-PLA₂s englobando as atividades miotóxicas, cardiotoxícas, formação de edema, rompimento dos lipossomos e letalidade, porém outros efeitos podem ser efetivamente observados quando a dose do veneno injetado é aumentada. O veneno da MjTX-I, na sua forma nativa, não apresenta diretamente atividade hemolítica ou anticoagulante (Soares *et al.*, 2000a).

2. OBJETIVOS

Na presente tese estão descritos os estudos cristalográficos (cristalização, elucidação, modelagem, refinamento e análise estrutural) de cinco fosfolipases A₂ (Asp49-PLA₂s e Lys49-PLA₂s):.

- ❖ Crotoxina B (CB) do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (PDB id: 2QOG);
- ❖ Piratoxina-I (PrTX-I) do veneno de *Bothrops pirajai* modificada quimicamente pelo brometo de p-bromofenacila (PDB id: 2OK9);
- ❖ Bothropstoxina-I (BthTX-I) do veneno de *B. jararacussu* modificada quimicamente pelo BPB;
- ❖ Bothropstoxina-II (BthTX-II) do veneno de *B. jararacussu* (PDB id: 2OQD);
- ❖ Miotoxina I (MjTX-I) do veneno de *B.moojeni*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O advento e o êxito da área cristalográfica possibilitaram o conhecimento geral e detalhado do modelo tridimensional de uma macromolécula biológica. As informações obtidas a partir de uma estrutura protéica constituem uma das bases para o desenho racional de fármacos pois permitem, juntamente com os estudos bioquímicos, determinar com precisão os mecanismos de reação das moléculas bem como localizar suas regiões funcionais. Esses fatos têm permitido um grande avanço da cristalografia de proteínas tanto em instituições de pesquisa científica como em empresas farmacêuticas (Drenth, 1994, Kubinyi, 1998 e Souza *et al.*, 2000).

Atualmente cristalografia de macromoléculas é o método mais utilizado para a determinação tridimensional de estruturas protéicas. Determinar estruturas tridimensionais de proteínas requer miligramas de amostra altamente pura e livre de contaminantes o que aumenta a probabilidade de formar cristais. A posterior elucidação e análise estrutural são possibilitadas após a obtenção de monocristais submetidos a experimentos de difração de raios-X (Kobe *et al.*, 1999; Souza *et al.*, 2000).

3.1. Obtenção das amostras – purificação e modificação química da His48

Todas as amostras protéicas aqui descritas foram purificadas, quimicamente modificadas e cedidas pelo Prof. Dr. Andreimar Martins Soares do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP-USP, Ribeirão Preto-SP, Brasil.

Os procedimentos de purificação das PLA₂s miotóxicas geralmente são conduzidos à temperatura ambiente, sem perda da atividade enzimática, em duas etapas: *a.* filtração em Sephadex G-75 ou HPLC de fase reversa do veneno; *b.* coluna de troca iônica em SP-Sephadex C-25 ou CM-Sepharose (ou CM-Sephadex) (Gutiérrez & Lomonte, 1995).

Outro método rápido e também eficiente para o isolamento de miotoxinas básicas de venenos de serpentes, é a utilização de cromatografia de afinidade (Lomonte *et al.*, 1994), uma vez que estas PLA₂s interagem com o poliânion heparina (Soares *et al.*, 2000a; Soares *et al.*, 2000b).

Os procedimentos empregados na purificação das Asp49-PLA₂s e Lys49-PLA₂s estão descritos em Soares *et al.* (1998) e Soares *et al.* (2001a) (Crotoxina B), Homs-Brandeburgo *et al.* (1988) (BthTX-I e BthTX-II), Mancuso *et al.* (1995) e Toyama *et al.*, 1995 (PrTX-I) e Soares *et al.* (2000a) (MjTX-I).

A metodologia utilizada para as modificações químicas dos resíduos His48 pelo brometo de *p*-bromofenacila, tanto da PrTX-I como da BthTX-I, estão descritas em Díaz-Oreiro *et al.* (1997), Toyama *et al.* (1998), Andrião-Escarso *et al.* (2000) e Soares & Giglio (2003).

3.2. Cristalização de proteínas

As amostras liofilizadas das proteínas descritas nesta tese foram solubilizadas tanto em água (MilliQ) como em tampão fosfato salina (PBS), atingindo concentrações finais menores que 12 mg/mL (amostra saturada). Preparadas as soluções das proteínas, diversas tentativas de cristalização foram realizadas empregando-se o método de difusão de vapor, *hanging drop* (MacPherson, 1989) em temperaturas constantes de 10 ou 18°C.

Os testes iniciais de cristalização foram feitos utilizando 50 soluções precipitantes previamente determinadas (soluções comerciais “Screen I” *Hampton Research* – Laguna Miguel, CA, USA). Analisando os resultados obtidos nos testes iniciais, diversas soluções precipitantes se destacaram e foram otimizadas através de sucessivas alterações da concentração de seus agentes precipitantes – método de matriz esparsa (Jancarik & Kim,

1991). Após a otimização das soluções de cristalização para as proteínas aqui descritas foram obtidos os respectivos monocristais regulares os quais apresentam satisfatório padrão de difração de raios-X, possibilitando as coletas dos diversos conjuntos de dados de difração de raios-X e posterior resolução e análise estrutural das proteínas crotoxina B, PrTX-I-BPB, BthTX-I-BPB, BthTX-II e MjTX-I.

3.3. Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Os experimentos de Espalhamento Dinâmico de Luz foram realizados no Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas-SP, Brasil.

Os experimentos de DLS foram executados com variação de temperatura (4, 10, 18, 25, 35°C) em duas concentrações de amostra protéica, 1,0 e 6,0 mg/mL, utilizando-se o sistema de DLS (DynaPro[®] – Molecular Sizing Instruments, Protein Solutions, Lakewood, NJ, USA). Os resultados foram analisados com o programa Dynamics V6. As amostras em diferentes concentrações foram solubilizadas em tampão fosfato salina (PBS) pH 7,5, centrifugadas por pelo menos 30 minutos e, em seguida, injetadas (60 µL) cuidadosamente dentro de uma cubeta de quartzo evitando a formação de bolhas de ar. Cada amostra foi medida 100 vezes.

3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida

O experimento de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio foi realizado pela equipe do Prof. Dr. Andreimar Martins Soares do

Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP-USP, Ribeirão Preto-SP, Brasil, como descrito por Laemmli (1970).

3.5. Coleta de dados de difração de Raios-X

Todos os cristais coletados foram montados em *loops* de nylon e expostos a um fluxo de nitrogênio (Oxford Cryosystems[®]) à temperatura de 100 K. As coletas dos dados de difração de raios-X foram executadas na linha de estudos de cristalografia de proteínas MX1 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), localizado em Campinas, SP. Os experimentos de difração de raios-X foram realizados com o emprego de radiação síncrotron e as imagens foram convertidas em dados digitais pelo detector da placa de imagens CCD Mar165 (MarResearch).

3.6. Processamento dos dados de difração

Todos os dados coletados nesta tese foram processados através dos programas DENZO / SCALEPACK ou pelo programa HKL2000 (Otwinowski & Minor, 1997).

Depois de avaliado os dados de difração de raios-X, determinou-se o número provável de moléculas presentes na unidade assimétrica. A quantidade de moléculas na unidade assimétrica está diretamente relacionada com a porcentagem de solvente (entre 27 a 65% - geralmente 43%) e com o volume da unidade assimétrica por massa protéica (coeficiente de Matthews – V_M , volume por Dalton em torno de $2,15 \text{ \AA}^3/\text{Da}$) (Matthews, 1968; Blundell & Johnson, 1976).

3.7. Determinação da estrutura protéica

Todas as estruturas protéicas aqui descritas foram determinadas pelo método da substituição molecular, empregando-se o programa AMoRe – *Automated Package for Molecular Replacement* (Navaza, 1994) que faz parte do pacote de programas do CCP4i (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994 (Potterton *et al.*, 2003)).

3.8. Modelagem manual e refinamento da estrutura protéica

Os ciclos de refinamento de corpo rígido e posição dos átomos, do fator de temperatura B (refinamento individual do tipo isotrópico com correção para o conteúdo de solvente – *bulk solvent*), mapas de densidade eletrônica (MDE) e *omit maps* (um tipo de MDE no qual é excluída uma determinada região de interesse antes de serem feitos os cálculos de fase e de fator de estrutura evitando que os dados desta região sejam tendenciosos) e inserção de moléculas de solvente (água) foram executados e gerados pelo programa CNS (Brünger *et al.*, 1998). O programa REFMAC (Murshudov *et al.*, 1996; Murshudov *et al.*, 1997) incluso no pacote de programas CCP4i (Collaborative Computational Project, N. 4, 1994; Potterton *et al.*, 2003) também foi utilizado para ciclos de refinamento entre as modelagens manuais.

A modelagem manual feita entre os ciclos de refinamento foi realizada tanto com o programa gráfico “O” (Jones *et al.*, 1990) como com o programa COOT (Emsley & Cowtan, 2004).

Análises de parâmetros estereoquímicos como distâncias e ângulos entre as ligações químicas (ângulos ϕ e ψ dos aminoácidos – ligação peptídica (diagrama de Ramachandran), planeza de certos grupos de átomos, contatos de van der Waals para átomos

não-ligados e do *G*-factor (análise geral das distâncias atômicas e ângulos de ligação entre os átomos de uma proteína), dentre outras foram realizadas durante o processo de refinamento para que os modelos tridimensionais pudessem satisfazer condições químicas, físicas e biológicas e não somente os termos cristalográficos. As análises estereoquímicas dos modelos cristalográficos das proteínas descritas na presente tese foram feitas pelo programa PROCHECK (Laskowski, 1993), incluso no pacote de programas CCP4i (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994; Potterton *et al.*, 2003)).

Análises da conformação oligomérica do modelo cristalográfico e dos resíduos envolvidos na estabilização dimérica foram feitas com os programas DIMPLOT (Wallace *et al.*, 1995) e PISA – *on-line* – Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies (Krissinel & Henrick, 2007).

Imagens e figuras de representação esquemática das estruturas protéicas foram geradas tanto pelo programa PyMol (DeLano, 2002) como pelo programa gráfico “O” (Jones *et al.*, 1990).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CROTOXINA B (Apêndices I e II)

4.1.1. Cristalização (Marchi-Salvador *et al.*, 2007)

- Concentração da amostra protéica: 10 mg/mL – solubilizada em água (MilliQ);
- Solução de cristalização: 11% (w/v) PEG 8000 / 0,1M TRIS HCl pH 9,0;
- Temperatura de cristalização: 18°C;
- Medidas aproximadas dos cristais: ~ 0,20 x 0,25 x 0,05 mm (Figura 08).

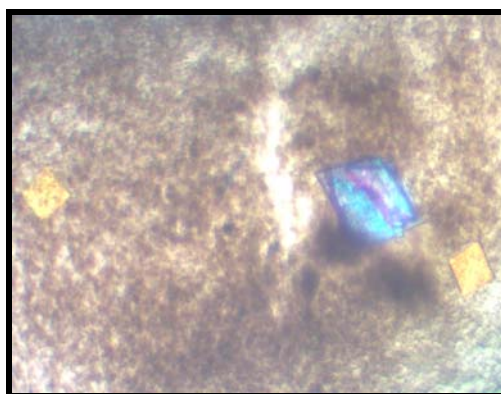


Figura 08: Cristais da crotoxina B do veneno de *Crotalus durissus terrificus* formados após 20 dias a 18° C.

4.1.2. Coleta e processamento de dados de difração de raios-X (Marchi-Salvador *et al.*, 2007)

- Dados de coleta: o cristal foi imerso, rapidamente, em 20% de glicerol (crioprotetor) antes de ser submetido à coleta de dados. O conjunto de dados foi coletado com comprimento de ondas de 1,427 Å e é formado por 103 imagens (85 mm de distância entre o cristal e o detector) com oscilação de 1°.

Os dados foram processados a 2,28 Å de resolução, R_{merge} de 12,7% e completeza de 85,9%. O cristal pertence ao grupo espacial $P2_12_12_1$, cujas dimensões da cela unitária são $a=72,9$, $b=81,2$ e $c=100,0$ Å. As estatísticas do processamento dos dados de difração de raios-X estão descritas na Tabela 01.

Tabela 01: Estatísticas do processamento dos dados de difração de raios-X da crotoxina B do veneno de *Crotalus durrisus terrificus* (Marchi-Salvador, *et al.*, 2007).

Crotoxina B	
Cela unitária (Å)	$a=72,9$; $b=81,2$; $c=100,0$
Grupo espacial	$P2_12_12_1$
Resolução (Å)	40-2,28 (2,36-2,28) ^a
Reflexões únicas	23669 (2423) ^a
Completeza (%)	85,9 (90,0) ^a
R_{merge} ^b	12,7 (54,7) ^a
$I/\sigma(I)$	9,57 (2,04) ^a
Redundância	4,2 (4,2) ^a
Moléculas na unidade assimétrica	4 moléculas
Coefficiente de Matthews (Å ³ /Dalton) ^c	2,60
Conteúdo de Solvente (%) ^c	52,61

^a Números entre parênteses correspondem aos dados de mais alta resolução; ^b $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl}(\sum_i(|I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle|))}{\sum_{hkl,i} \langle I_{hkl,i} \rangle}$, onde $I_{hkl,i}$ é a intensidade de uma medida individual da reflexão com índices de Miller h , k e l , $\langle I_{hkl} \rangle$ é a intensidade média daquela reflexão. Calculado para $I > -3\sigma(I)$; ^c Coeficiente de Matthews calculado assumindo um valor de 0,74 cm³/g para a proteína em um volume parcial específico – programa CNS (Brünger *et al.*, 1992).

4.1.3. Elucidação, modelagem manual, refinamento e validação estrutural (Marchi-Salvador *et al.*, 2008a)

- Modelo de coordenadas: monômero da BthTX-I, Lys49-PLA₂ do veneno de *Bothrops jararacussu* (da Silva-Giotto *et al.*, 1998).

Após a elucidação da estrutura quaternária da crotoxina B, ciclos de refinamento de corpo rígido, do tipo “*simulated annealing*” e de minimização de energia foram realizados e o mapa de densidade eletrônica (MDE) com coeficiente $3 |F_{\text{obs}}| - 2 |F_{\text{calc}}|$ foi gerado. O mapa de densidade eletrônica foi analisado sobre o modelo utilizado, sendo necessário corrigir a seqüência de aminoácidos, através de uma inserção e mutações de aminoácidos. Inicialmente foi inserida a seqüência de aminoácidos da isoforma CB2 obtida de Faure *et al.* (1994), nos quatro monômeros.

Durante o processo de refinamento não foi utilizada simetria não-cristalográfica. Depois de finalizado o processo inicial de modelagem e refinamento foi observado a existência de duas densidades eletrônicas próximas à região de ligação do íon Ca^{2+} , tanto no monômero B como no C, sugerindo ser íons de Ca^{2+} presentes na estrutura protéica antes mesmo desta ser purificada. Os íons de Ca^{2+} foram inseridos nas referidas densidades eletrônicas. Ainda, notou-se que tanto para o monômero B como para o C, alguns aminoácidos da seqüência inicial (isoforma CB2) não correspondiam à densidade eletrônica observada. No entanto, ao inserir a seqüência de aminoácidos da isoforma CB1 (Faure *et al.*, 1994) houve compatibilidade entre densidade eletrônica observada e os oito aminoácidos que diferem as duas isoformas da crotoxina B (Figura 09).

```

1           10           20           30           40           50
CB1 : HLLQFNKMIKFETRKNAI PFYAFYGCYCGWGGR GRPKDATDRCCFVHDCCYGKL
CB2 : SLLQFNKMIKFETRKNAV PFYAFYGCYCGWGGQ GRPKDATDRCCFVHDCCYGKL
      LLQFNKMIKFETRKNA PFYAFYGCYCGWGG GRPKDATDRCCFVHDCCYGKL

70           80           90 92           100           110
CB1 : AKCNTKWDIY EYSLKSGYITCGKGTWC E EQICECDRVA AECLRRSLSTYK YGYM
CB2 : AKCNTKWDIY RYSLKSGYITCGKGTWC K EQICECDRVA AECLRRSLSTYK NEYM
      AKCNTKWDIY YSLKSGYITCGKGTWC EQICECDRVA AECLRRSLSTYK YM

120           130
CB1 : FYPDSRCR GPSETC
CB2 : FYPDSRCR EPSETC
      FYPDSRCR PSETC

```

Figura 09: Alinhamento das duas isoformas CB1 e CB2 da crotoxina B. As seqüências de aminoácidos foram numeradas de acordo com Renetseder *et al.* (1985) – programa GeneDoc (Nicholas *et al.*, 1997).

O modelo cristalográfico formado entre as isoformas CB1 e CB2 da crotoxina B contém 3944 átomos de proteínas (não-hidrogênios), dois íons Ca^{2+} e 379 moléculas de água (Figura 10). Os valores de R_{cryst} e R_{free} convergiram para 22,4% e 24,8%, respectivamente, para todos os dados entre 28,93 – 2,28 Å. O valor de G -factor médio foi 2,5, resultado classificado como excelente pelo programa PROCHECK (Laskowski, 1993).

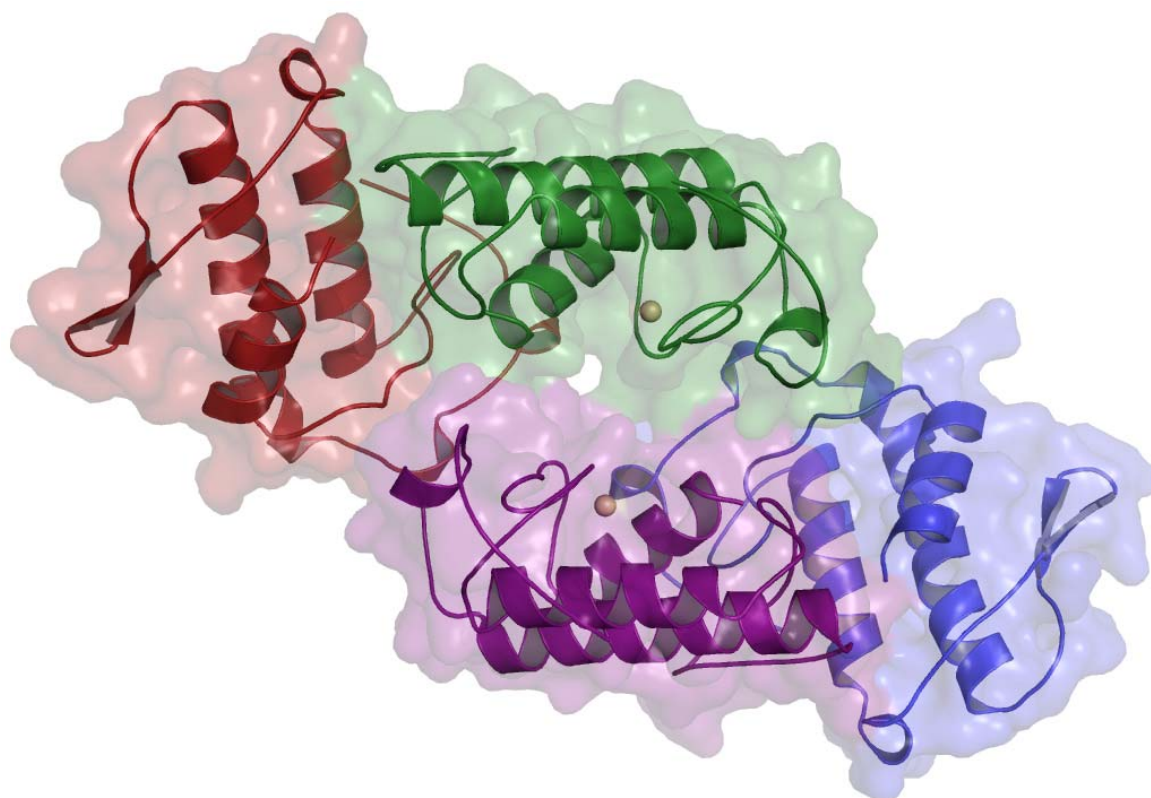


Figura 10: Tetrâmero da crotoxina B formado pela complexação das isoformas CB1/CB2 . Vermelho-monômero A (CB2), violeta-monômero B (CB1), verde-monômero C (CB1) e azul-monômero D (CB2). As duas esferas em amarelo são os íons de Ca^{2+} – programa PyMol (DeLano, 2002).

Em determinadas regiões onde a densidade eletrônica mostrou-se descontínua ou ambígua, mesmo após vários ciclos de refinamento, optou-se por fazer a mutação de alguns resíduos por outros de glicina ou alanina. A troca de resíduos dotados de grandes cadeias laterais por outros que não apresentam (Gly) ou tem cadeia lateral pequena (Ala) minimizou

possíveis incorreções estatísticas. Seis mutações foram realizadas (monômero A: Lys38 → Ala, Arg74 → Ala; monômero B e C: Trp31 → Gly e Pro74 → Ala).

Os resíduos Trp31 dos monômeros A e D dispostos na região generosamente permitida no gráfico de Ramachandran (Figura 11) localizam-se na região do *loop* de ligação de Ca^{2+} . O fator médio de temperatura dos átomos que compõe a estrutura protéica foi de 41,6 \AA^2 (Figura 12). As estatísticas do refinamento da CB estão apresentadas na Tabela 02.

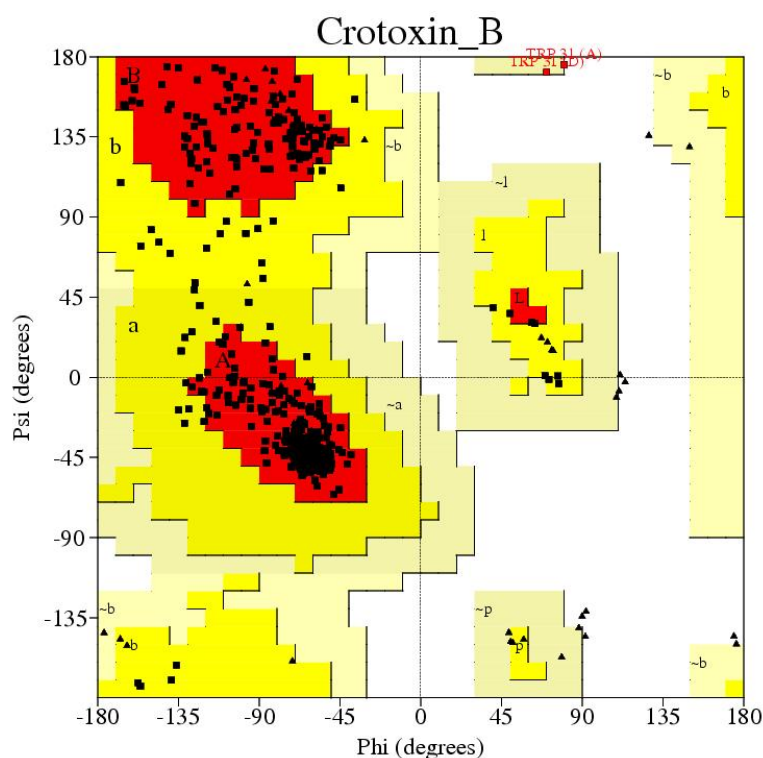


Figura 11: Diagrama de Ramachandran. 90,3% dos resíduos dispostos nas regiões mais favoráveis (vermelho), 9,2% encontrados nas regiões permitidas (amarelo escuro), 0,5% nas regiões generosamente permitidas (amarelo claro) e nenhum resíduo em regiões não permitidas (branco) – programa PROCHECK (Laskowski, 1993).

O modelo cristalográfico da crotoxina B formado por duas isoformas (CB1/CB2) foi depositado no banco de dados de estruturas protéicas – *Protein data bank* (PDB) (<http://www.rcsb.org>) – sob o código 2QOG.

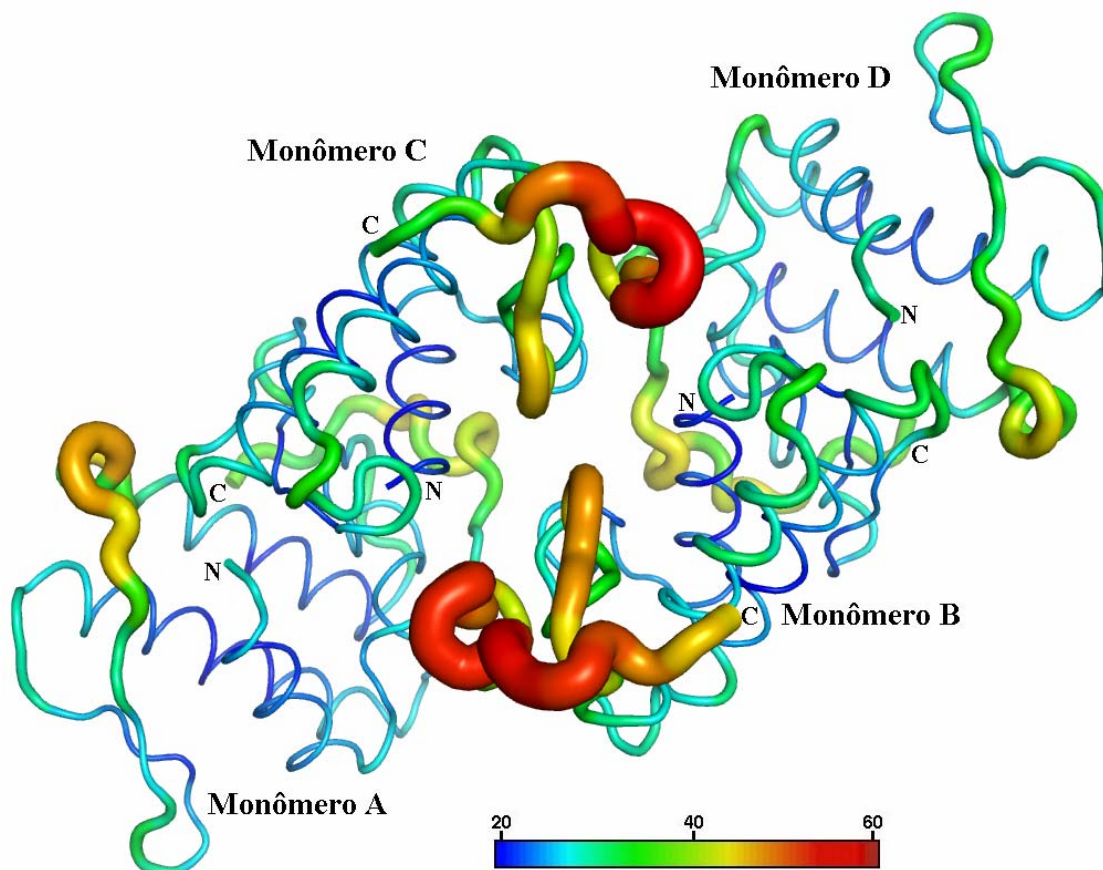


Figura 12: Fator de temperatura da crotoxina B. A diferença de cores indica desde locais com temperaturas mais elevadas (vermelho) até regiões mais estáveis (azul) – programa PyMol (DeLano, 2002).

4.1.4. Espalhamento dinâmico de luz e eletroforese em gel de poliacrilamida (Marchi-Salvador *et al.*, 2008a)

A análise dos resultados de DLS das amostras com concentração de 1,0 e 6,0 mg/mL a 18°C indicaram que ambas são amostras monomodais com o raio hidrodinâmico (R_H) de 2,7 e 3,2 nm, respectivamente (Figura 13). Estes valores de R_H correspondem a associações moleculares com massa molecular de aproximadamente 34 kDa e 52 kDa. Ainda, a porcentagem de polidispersão das duas amostras foi abaixo de 15%, possibilitando inferir que em solução portéica menos concentrada (1,0 mg/mL), as moléculas de crotoxina B se

associam e formam dímeros enquanto que soluções mais concentradas (6,0 mg/mL) a formação tetramérica é favorecida. Os resultados de R_H e massa molecular obtidos em diferentes temperaturas (4, 10, 25 e 35°C) corroboraram os dados de 18°C.

Tabela 02: Estatísticas de refinamento do modelo cristalográfico do complexo CB1/CB2 da crotoxina B (Marchi-Salvador *et al.*, 2008a).

Crotoxina B	
Resolução (Å)	28,93-2,28 (2,42-2,28) ^a
Completeza (%)	85,6 (86,6) ^a
Reflexões únicas	23613 (3737) ^a
R_{Cryst} (%) ^b	22,4 (28,6) ^a
R_{free} (%) ^c	24,8 (35,1) ^a
Número de átomos não hidrogênios ^d	
Proteína	3932
Solvente (H ₂ O)	379
Íons Ca ²⁺	2
Fator de temperatura médio (Å ²) ^d	41,6
Diagrama de Ramachandran ^e	
Resíduos em regiões mais favoráveis (%)	90,3
Resíduos em regiões adicionalmente permitidas (%)	9,2
Resíduos em regiões generosamente permitidas (%)	0,5
Resíduos em regiões não permitidas (%)	0,0
<i>G</i> -factor médio ^e	2,5
Desvio <i>r.m.s.</i> dos valores ideais ^d	
Comprimento das ligações (Å)	0,008
Ângulo das ligações (°)	1,4
Ângulos diédricos (°)	22,9
Ângulos impróprios (°)	0,88
Erros nas coordenadas (Å) ^d	
Gráfico de Luzzati (<i>cross-validated Luzzati plot</i>)	0,32 (0,40) ^a
SIGMAA (<i>cross-validated SIGMAA</i>)	0,31 (0,37) ^a

^a Valores referentes a camada de maior resolução. ^b $R_{\text{cryst}} = \frac{\sum_{hkl} (||F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}||)}{\sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|}$, onde $|F_{\text{obs}}|$ e $|F_{\text{calc}}|$ são as amplitudes dos fatores de estrutura observados e calculados; ^c R_{free} é equivalente ao R_{cryst} , calculado com base em 5% do total das reflexões obtidas; ^d Calculado pelo programa CNS (Brünger *et al.*, 1992), ^e Calculado pelo programa PROCHECK (Laskowski, 1993).

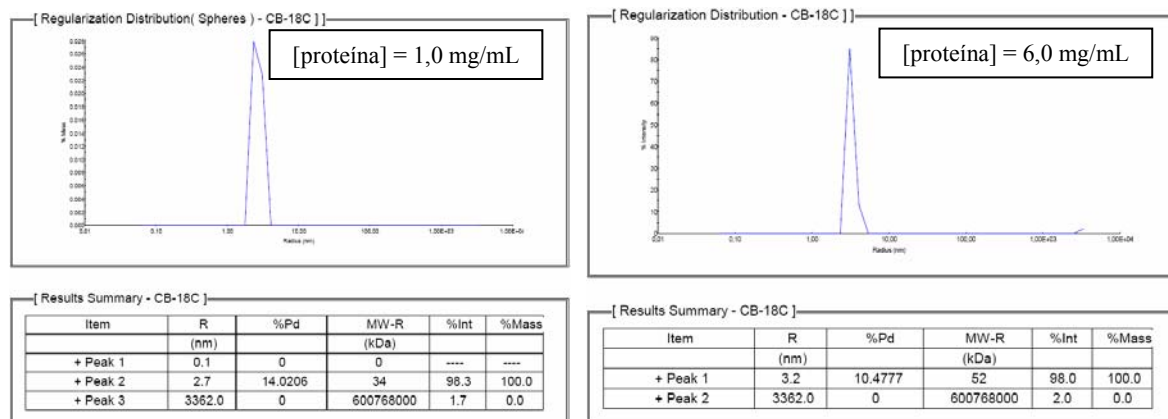


Figura 13: Distribuição monomodal das amostras de crotoxina B a 1,0 mg/mL (esquerda) e 6,0 mg/mL (direita).

O experimento de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) foi realizado pela equipe do Prof. Dr. Andreimar Martins Soares do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP-USP, Ribeirão Preto-SP, Brasil, como descrito por Laemmli (1970).

A análise da eletroforese em gel de poliacrilamida indicou que quando a amostra protéica é reduzida por β -mercaptoetanol apenas uma única banda é observada com massa molecular de aproximadamente 13,5 kDa (Figura 14 – colunas 2 e 3). Este valor corresponde à massa molecular de um monômero, indicando que a CB, quando reduzida, é monomérica. No entanto, sob condições de não-redução, foram observadas duas bandas de aproximadamente 28,0 e 52,5 kDa, o que indica que a CB pode estar presente como dímero ou tetrâmero, respectivamente (Figura 14 – colunas 4 e 5).

Quando o gel de eletroforese foi submetido à análise pelo Sistema de Aquisição de Imagens (VDS, *Pharmacia Biotech*) no Laboratório de Biologia Molecular (Departamento de Física e Biofísica – IB, UNESP, Botucatu, SP), observou-se que a intensidade de densidade ótica (IOD) da banda associada ao tetrâmero (52,5 kDa) é aproximadamente 30% superior à banda relativa ao dímero (28,0 kDa).

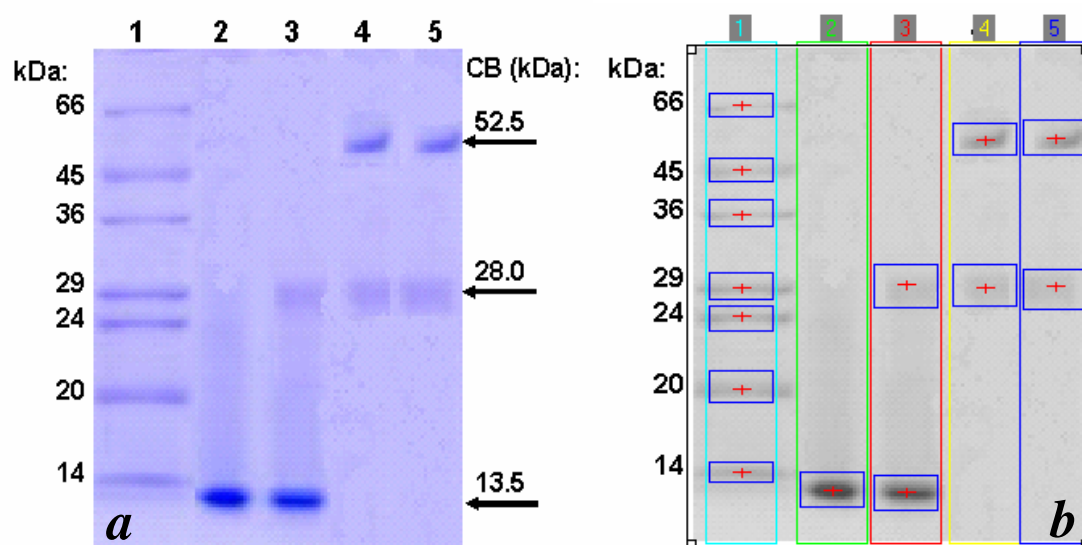


Figura 14: *a.* Eletroforese SDS-PAGE a 12% corada com *Comassie blue*. *b.* Análise eletroforética feita pelo VDS. Coluna 1. Marcador de massa molecular (kDa); 2. Crotoxina B reduzida (20 μ g) + β -mercaptoetanol (20 mM); 3. CB reduzida (20 μ g) + β -mercaptoetanol (5 mM). Colunas 4 e 5: CB não-reduzida.

4.1.5. Análise estrutural da Crotoxina B (Marchi-Salvador *et al.*, 2008a)

A conformação oligomérica das PLA₂s de venenos de serpentes pode estar associada às propriedades estruturais e funcionais que estas enzimas desempenham. No caso da crotoxina B, a estrutura quaternária indica ser biologicamente significativa devido aos seguintes dados teóricos e experimentais:

1. eletroforese SDS-PAGE sugere que a CB na sua forma não-reduzida pode ser dimérica ou tetramérica (predominante) em solução;
2. experimentos de DLS também sugerem a presença da associação de duas moléculas quando a amostra protéica está em menor concentração (1,0 mg/mL) e a formação de tetrâmeros quando a concentração da proteína é próxima daquela utilizada nos experimentos de cristalização (6,0 mg/mL);

3. análise detalhada da estrutura cristalográfica e da disposição dos quatro monômeros que compõem a CB mostrou que o tetrâmero é formado pela associação de dois dímeros, os quais, por sua vez, são constituídos por dois monômeros, cada qual com uma isoforma da crotoxina B. Os dois dímeros que formam o tetrâmero são semelhantes e a superposição de seus átomos de C^α gerou um desvio (*r.m.s. desviaton*) de 0,4 Å (Figura 15).

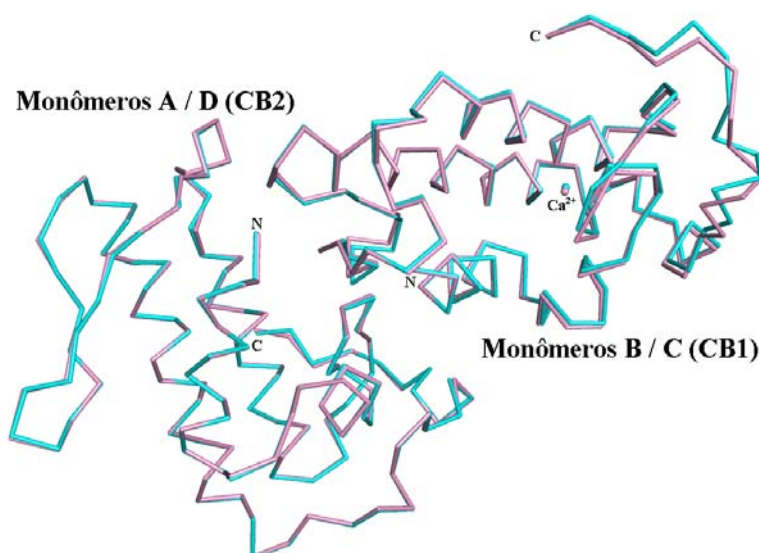


Figura 15: Superposição dos átomos de C^α dos dímeros que compõem o tetrâmero da crotoxina B; Em azul claro: dímero formado pelos monômeros A e C e em rosa: monômeros B e D – programa PyMol (DeLano, 2002).

4. análises realizadas com o programa PISA (Krissinel & Henrick, 2007) indicaram que a estrutura tetramérica da crotoxina B é estável em solução (*buried surface area* - BSA = 5370 \AA^2 , $\Delta G^{\text{int}} = -34,3 \text{ Kcal/M}$ e $\Delta G^{\text{diss}} = 8,8 \text{ Kcal/M}$). A estabilização do dímero formado pelos monômeros A e C são dada por quatro pontes salinas, 11 pontes de hidrogênio e 32 resíduos envolvidos em contatos hidrofóbicos. No entanto o outro dímero (formado pelos monômeros B e D) é estabilizado por duas pontes salinas, seis pontes de hidrogênio e 36 resíduos envolvidos em interações hidrofóbicas (Tabela 03).

Tabela 03: Tipos e distâncias de interações envolvidas na estabilização dos dímeros que formam o tetrâmero da crotoxina B.

Dímero 1			Dímero 2		
Pontes Salinas					
Monômero A	Distância (Å)	Monômero C	Monômero B	Distância (Å)	Monômero D
Asp122 [OD2]	3,27	Lys10 [NZ]	Glu92 [OE1]	3,15	Ser1 [N]
Asp122 [OD1]	3,15	Lys10 [NZ]	Glu92 [OE2]	3,72	Ser1 [N]
Ser1 [N]	2,92	Glu92 [OE1]			
Ser1 [N]	3,60	Glu92 [OE2]			
Pontes de Hidrogênio					
Monômero A	Distância (Å)	Monômero C	Monômero B	Distância (Å)	Monômero D
Gly30 [O]	2,91	Gln4 [NE2]	Tyr75 [O]	3,21	Gly32 [N]
Trp31 [O]	2,81	Lys7 [NZ]	Gln4 [NE2]	2,96	Gly30 [O]
Asp122 [OD2]	3,27	Lys10 [NZ]	Lys7 [NZ]	3,82	Cys27 [O]
Asp122 [OD1]	3,15	Lys10 [NZ]	Lys7 [NZ]	3,45	Trp31 [O]
Trp31 [O]	3,80	Tyr75 [OH]	Tyr75 [OH]	3,60	Trp31 [O]
Gly33 [O]	3,83	Lys78 [N]	Lys78 [NZ]	3,30	Glu131 [O]
Thr132 [O]	3,89	Lys78 [NZ]			
Thr68 [O]	3,71	Lys87 [NZ]			
Gly32 [N]	3,29	Tyr75 [O]			
Ser1 [N]	2,92	Glu92 [OE1]			
Leu2 [N]	3,88	Glu92 [OE2]			

A estrutura tetramérica da crotoxina B é formada pela associação dos dímeros A/C e B/D. No entanto, o mesmo não ocorre com a agkistrotoxina (PLA₂ extraída do veneno de *Agkistrodon halys* Pallas (PDB id. 1BJJ) (Tang *et al.*, 1999), uma Asp49-PLA₂ hexamérica e neurotóxica. De acordo com o programa on-line PISA (Krissinel & Henrick, 2007) a agkistrotoxina é estável em solução somente como dímero e a estrutura quaternária,

aparentemente, é estabilizada por interações entre íons Ca^{2+} presentes nas interfaces dos dímeros que formam o hexâmero. Similarmente, o modelo cristalográfico dimérico da PLA_2 presente no veneno da cobra indiana (*Naja naja sagittifera*) apresenta um íon Ca^{2+} na interface dimérica, o qual é responsável pela dimerização desta proteína, que também é formada pela associação de duas isoformas (Jabben *et al.*, 2005). Tanto a PLA_2 de *N. n. sagittifera* como a CB são formadas por duas isoformas e ambas apresentam o íon Ca^{2+} (no *loop* de ligação de Ca^{2+}) somente em uma das isoformas. Quando a PLA_2 de *N. n. sagittifera* está presente em solução com alta concentração de Ca^{2+} , a sua dimerização é induzida e é estabilizada pela formação de pontes salinas entre o resíduo Arg31 de um dos monômeros com a Asp49 do outro. Esta interação dificulta a coordenação do íon Ca^{2+} no monômero, cujo resíduo Asp49 participa das interações responsáveis pela estabilização dimérica.

A dimerização e, conseqüentemente, a estrutura tetramérica da crotoxina B não pode ser atribuída ao excesso de Ca^{2+} , pois a condição de cristalização da CB não continha cálcio. De fato, o deslocamento ocorrido no *loop* de ligação de Ca^{2+} nos monômeros A e D, aparentemente, é causado pela interação desta região da isoforma CB2 com a região Gly53-Cys91 (*loop* que antecede a β -wing) da isoforma CB1 durante a formação dos dímeros 1 e 2. O deslocamento ocorrido no *loop* de ligação de Ca^{2+} da isoforma CB2 impede a coordenação de íons Ca^{2+} nos monômeros A e D.

O valor de r.m.s.d. resultante da superposição entre os átomos de C^α dos monômeros B e C (isoforma CB1) foi 0,42 Å e entre os átomos de C^α dos monômeros A e D (isoforma CB2) foi 0,21 Å. Já, as superposições entre os átomos de C^α das isoformas CB1 e CB2 indicaram diferenças expressivas: tanto o monômero A como o monômero D (isoforma CB2) quando superpostos com o monômero B (isoforma CB1) resultaram numa diferença de 1,72 Å, enquanto que as superposições entre o monômero C (isoforma CB1) com os monômeros A e D geraram valores de r.m.s.d. de 1,66 e 1,65 Å, respectivamente (Figura 16).

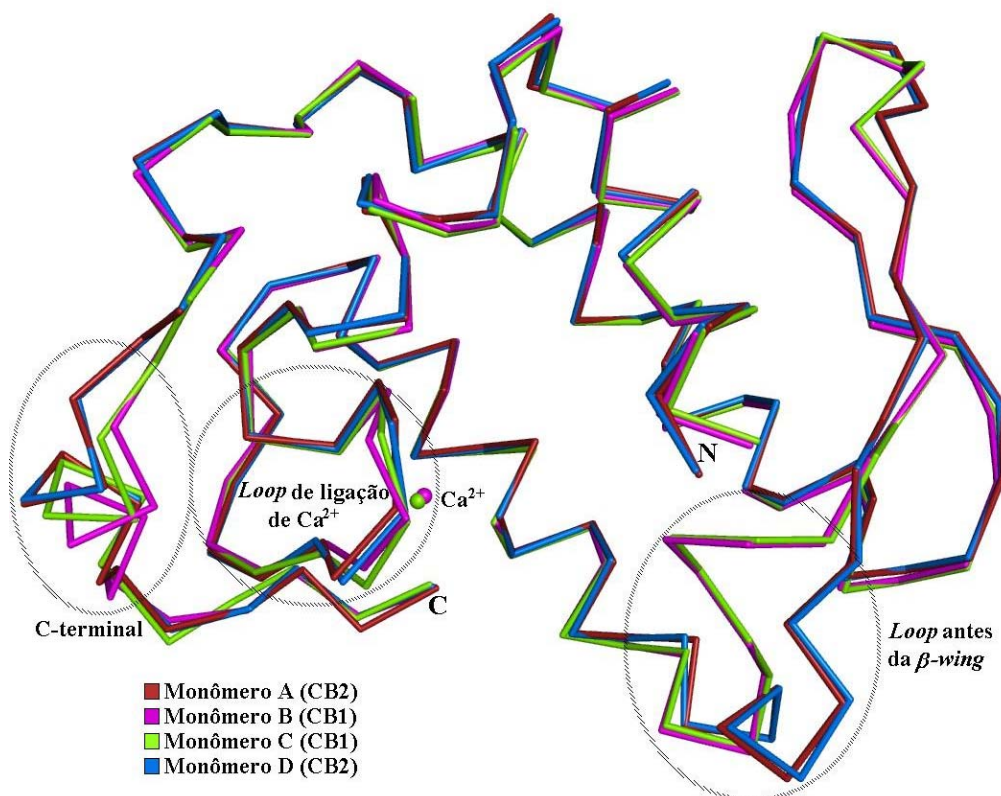


Figura 16: Superposição dos átomos de C^{α} dos quatro monômeros da crotoxina B destacando as regiões com maiores desvios estruturais entre as isoformas CB1 e CB2 – programa PyMol (DeLano, 2002).

As superposições entre os quatro monômeros indicou diferenças consideráveis em quatro principais regiões: o *loop* de ligação de Ca^{2+} (resíduos 27-34), o *loop* que antecede a β -wing (resíduos 53-72), a região de β -wing (resíduos 73-91) e a região C-terminal (resíduos 119-133). No entanto, as regiões que mais se destacaram foram os *loops* de ligação de Ca^{2+} e o que antecede a β -wing pois, além destas regiões apresentarem diferenças estruturais significativas, participam da estabilidade dimérica e, conseqüentemente da formação tetramérica da CB. A superposição entre as regiões de ligação de Ca^{2+} dos monômeros A e B e dos monômeros A e C geraram valores de r.m.s.d de 0,98 e 0,93 Å, respectivamente. No entanto a superposição entre os *loops* que antecedem as β -wings dos monômeros A e B foi de 3,10 e dos monômeros A e C foi de 3,08 Å. Quando feita a superposição destas mesmas regiões entre os monômeros B e D e entre os C e D geraram valores aproximados de r.m.s.d.

(*loop* de ligação de Ca^{2+} : monômeros B e D – desvio r.m.s. de 0,91 Å e monômeros C e D – r.m.s.d. de 0,83 Å; *loop* que antecede a β -wing: monômeros B e D – r.m.s.d de 3,10 Å e monômeros C e D – desvio r.m.s. de 3,08 Å).

Como descrito, a estabilização dimérica entre as isoformas CB1 e CB2 é dada, respectivamente, pela interação entre o *loop* que antecede a β -wing e a região de ligação de Ca^{2+} . No entanto, as regiões de ligação de íon Ca^{2+} dos monômeros A e D (isoforma CB2), não estão aptas a coordenar o íon Ca^{2+} pois, em ambos os monômeros, os resíduos Cys29, Gly30, Gly32 estão invertidos em relação aos mesmos resíduos dos monômeros B e C (isoforma CB1), monômeros aptos a coordenar o íon Ca^{2+} . Ainda, os resíduos Trp31 dos monômeros A e D, devido ao desarranjo estrutural ocorrido nesta região, estão alocados em regiões generosamente permitidas no gráfico de Ramachandran ($71,3^\circ/173,9^\circ$ e $70,2^\circ/171,3^\circ$, respectivamente).

A solução de cristalização do complexo de isoformas CB1 e CB2 não continha íons Ca^{2+} . Contudo, os íons Ca^{2+} atribuídos às densidades eletrônicas (monômeros B e C) encontradas nos exatos locais de coordenação deste íon, provavelmente, não foram retirados durante a purificação da CB, estando presentes na proteína *in vivo*.

A coordenação dos íons Ca^{2+} encontrados nos monômeros B e C é similar às demais Asp49-PLA₂s (Scott, 1997), um arranjo bipiramidal suportado por sete interações englobando quatro resíduos (Tyr28, Gly30, Gly32 e Asp49, este último participa com duas interações) e duas moléculas de água (W145 e W254 no monômero B; W84 e W221 no monômero C) (Figura 17).

Outro aspecto interessante é a interação entre os resíduos Ser1 (CB2) e Glu92 (CB1). Estes resíduos se ligam por pontes salinas duplas, em ambos os dímeros e estabilizam a estrutura quaternária da crotoxina B (Figura 18).

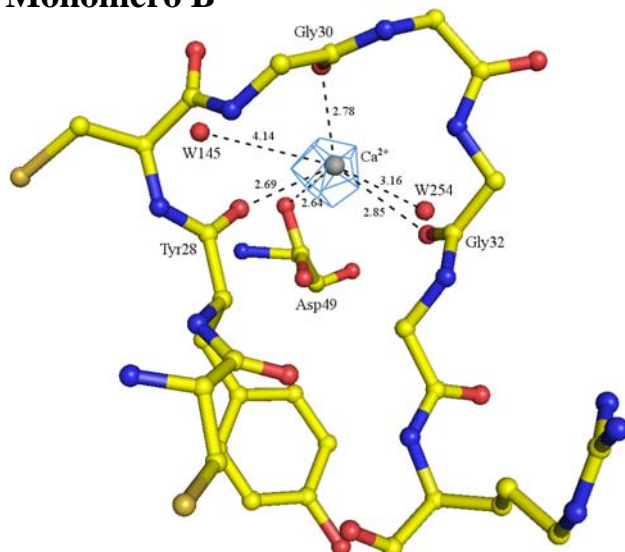
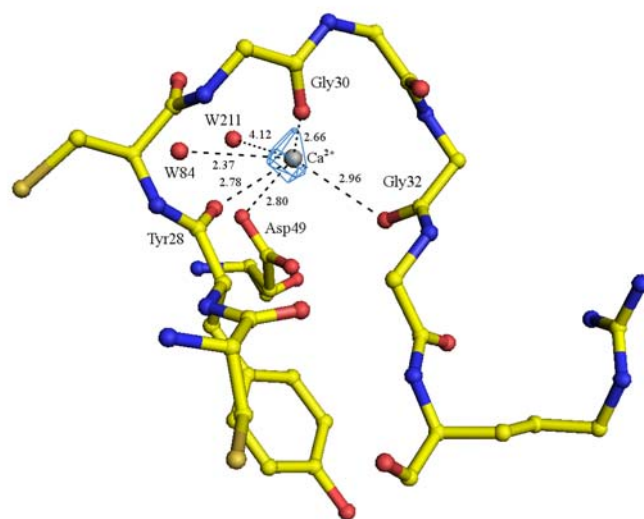
Monômero B**Monômero C**

Figura 17: Região de ligação de Ca^{2+} da isoforma CB1. Os átomos de Ca^{2+} estão inseridos em suas respectivas densidades eletrônicas (mapa $3|F_{\text{obs}}|-2|F_{\text{calc}}|$), com corte de $3,0\sigma$ (distâncias em Å) – programa PyMol (DeLano, 2002).

Se Considerarmos que as duas isoformas (CB1 e CB2) são encontradas no veneno de um único espécime de *Crotalus durissus terrificus* (Faure & Bon, 1987; Faure & Bon, 1988; Faure *et al.*, 1994), é possível inferir que a associação CB1/CB2 ocorra após a dissociação do complexo crotoxina na sinapse neural (Bon, 1997), ainda *in vivo*. No entanto, pode-se dizer que as isoformas CB1 e CB2 operam como partes complementares, pois formam um complexo molecular funcional, a crotoxina B, para o qual a conformação oligomérica é essencial e necessária para o desencadeamento da principal atividade biológica causada pela CB – a neurotoxicidade.

A localização exata do sítio neurotóxico das PLA₂s de venenos de serpentes ainda não foi determinada. Diversos estudos sugerem diferentes regiões (N-terminal, *loop* de ligação de Ca^{2+} , região de β -wing e C-terminal) responsáveis pela atividade neurotóxica das PLA₂s (Krizaj *et al.*, 1989; Carredano *et al.*, 1998; Chioato & Ward, 2003; Rouault *et al.*, 2001).

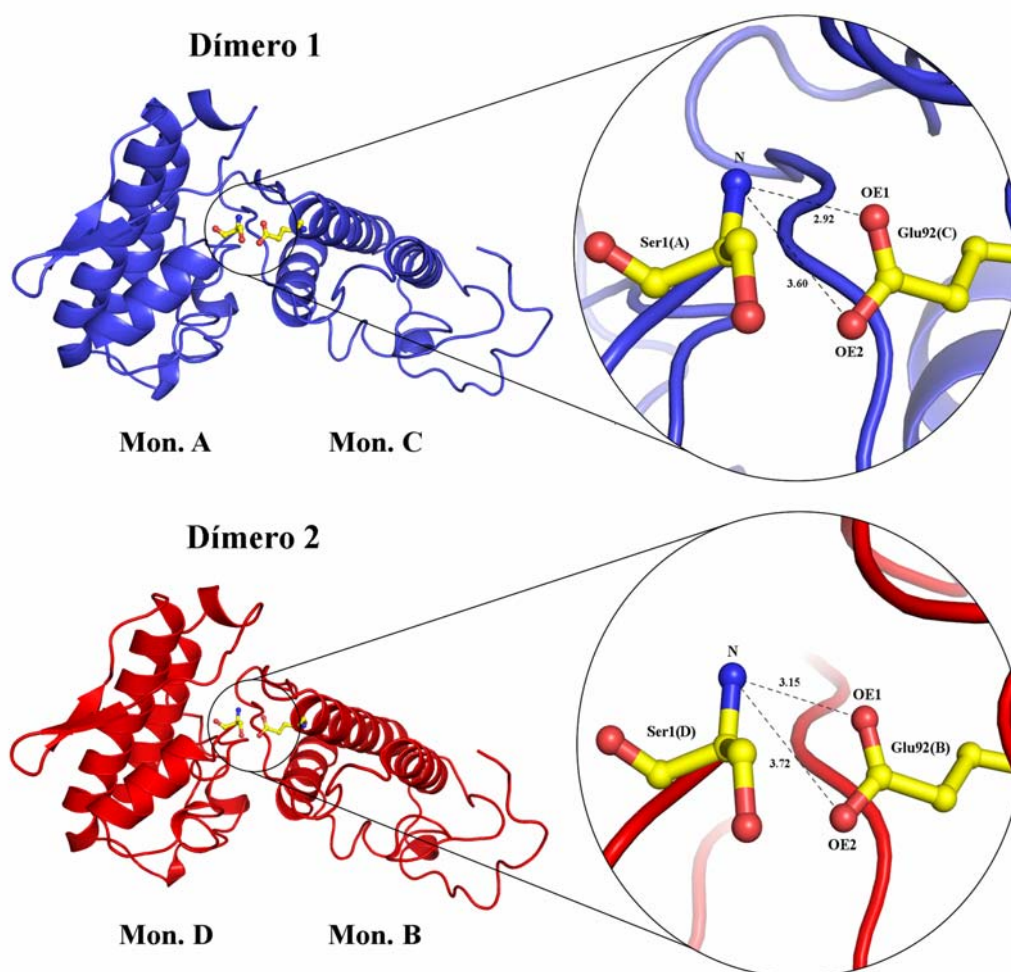


Figura 18: Pontes salinas formadas entre os resíduos Ser1 (isoforma CB2 – monômeros A e D) e Glu92 (isoforma CB1 – monômeros B e C) (distâncias em Å) – programa PyMol (DeLano, 2002).

Estudos baseados na seqüência de aminoácidos de três amoditoxinas (PLA₂s neurotóxicas monoméricas do veneno de *Vipera ammodytes ammodytes*) identificaram o C-terminal dessas enzimas como região responsável pela neurotoxicidade exercida por esta enzima (Krizaj *et al.*, 1989). Em outro estudo, Carredano *et al.* (1998) mostraram que algumas PLA₂s neurotóxicas do grupo I de venenos de serpentes não apresentam variação estrutural na região de β -wing (resíduos 70-100) quando comparadas com toxinas similares que não apresentam atividade neurotóxica. Usando o modelo teórico da amoditoxina A de *Vipera ammodytes ammodytes*, Chioato & Ward (2003) concluíram que as PLA₂s com

neurotoxicidade pré-sináptica possuem uma superfície biologicamente ativa mais extensa incluindo as regiões de C-terminal, *loop* de ligação de cálcio, hélice curta, hélice 1 (N-terminal) e de β -wing. Em contraste com os estudos anteriores, Rouault *et al.* (2001) atribuíram a neurotoxicidade da PLA₂ de *Oxyuranus scutellatus scutellatus* à região de N-terminal, descartando a participação do *loop* de C-terminal e demais regiões.

No entanto, todas as regiões anteriormente sugeridas estão expostas na superfície externa do tetrâmero indicando que a estrutura oligomérica proposta favorece o desencadeamento da atividade neurotóxica exercida pela crotoxina B (Figura 19). Uma vez que a estrutura quaternária da CB é formada pela associação das isoformas CB1/CB2 e indica que a formação oligomérica possivelmente está relacionada com atividade neurotóxica desencadeada pela CB, pode-se sugerir um novo sítio neurotóxico o qual não é encontrado nos monômeros separados. Ainda, este possível sítio neurotóxico pode aumentar a possibilidade da formação do complexo CB1/CB2 na membrana pré-sináptica.

A análise do modelo estrutural da crotoxina B formado por duas isoformas (CB1 e CB2) indicou a possível ocorrência de um interessante processo de evolução molecular: as isoformas CB1 e CB2 provavelmente estão envolvidas na formação de um complexo molecular que suporta ou mesmo maximiza a principal atividade exercida pela CB – a neurotoxicidade. O suposto aumento da atividade neurotóxica pode estar relacionado a uma provável diminuição da atividade catalítica. Esta redução é, certamente, afetada pelo deslocamento do *loop* de ligação de Ca²⁺ que ocorre nos monômeros A e D e, conseqüentemente, pela não coordenação do íon Ca²⁺.

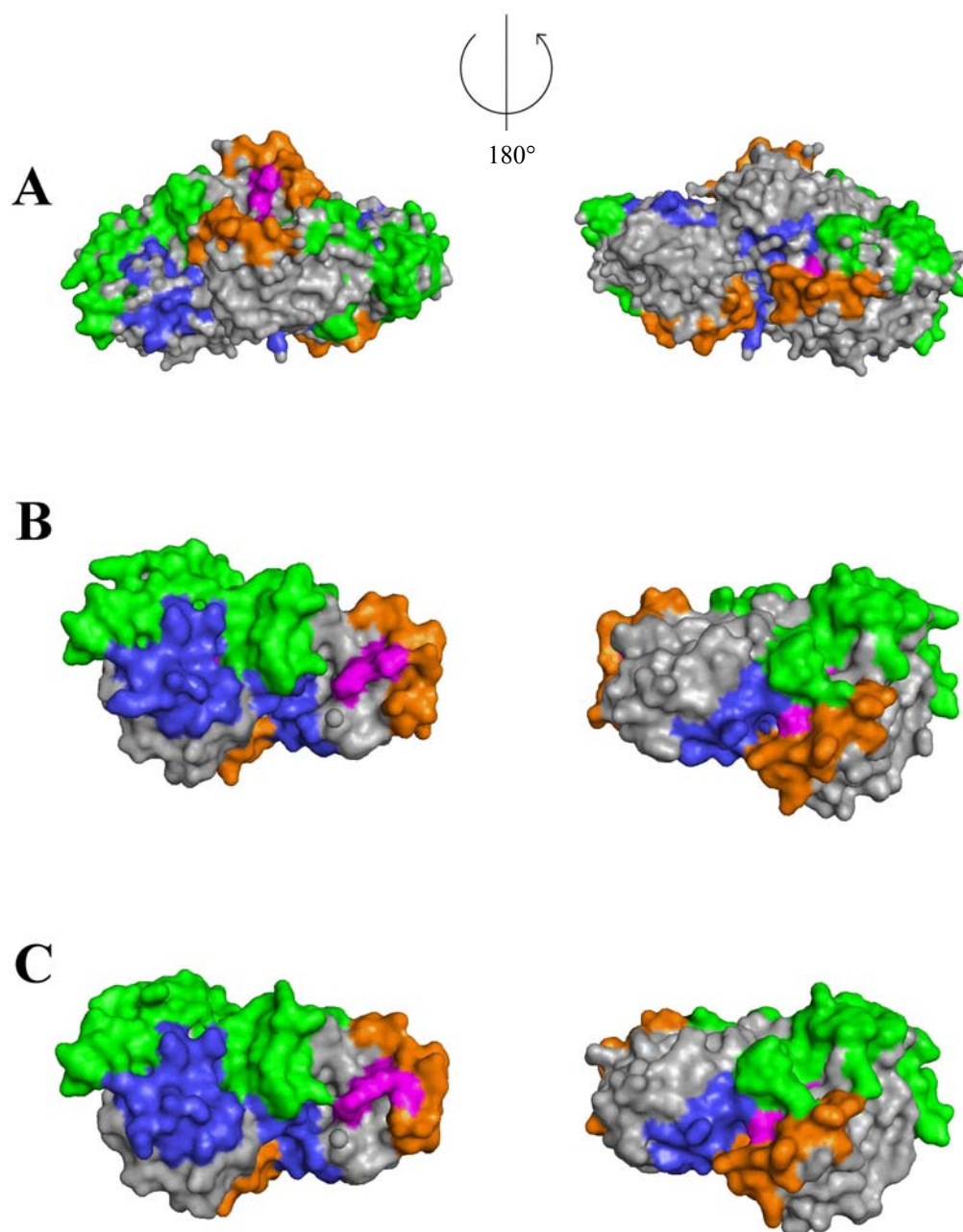


Figura 19: Regiões expostas a superfície externa da crotoxina B. Os N-terminais estão indicados em azul, os *loops* de ligação de Ca^{2+} em rosa escuro, as β -wings em verde e os C-terminais em alaranjado. *a.* Tetâmero; *b.* Dímero 1 (monômeros A (CB2) e C (CB1)); *c.* Dímero 2 (monômeros B (CB1) e D (CB2)) – programa PyMol (DeLano, 2002).

4.2. Lys49-PLA₂s modificadas quimicamente pelo brometo de *p*-bromefenacila (BPB) – PrTX-I-BPB (Apêndice III) e BthTX-I-BPB (Apêndice IV)

4.2.1. Cristalização (dos Santos *et al.*, 2007 e Marchi-Salvador *et al.*, 2006)

A alquilação da His48 da proteína PrTX-I pelo BPB reduz as atividades miotóxica e indução de edemas em 46% e 15%, respectivamente (Soares *et al.*, 2001b e Soares & Giglio, 2003). Já, esta mesma modificação química da His48-BPB feita na BthTX-I-BPB reduz em 45% a atividade miotóxica, bem como em 85% e 15% as atividades citotóxica e de indução de edemas, respectivamente.

- Tempo de incubação entre a proteína e o ligante (BPB): PrTX-I-BPB – 24 horas (Toyama *et al.*, 1998) e BthTX-I-BPB – 3 horas (Adrião-Escarso *et al.*, 2000);
- Concentração das amostras protéicas: saturada, menor que 12 mg/mL – tampão fosfato salino (PBS);
- Solução de cristalização: 20-23% (w/v) PEG 4000 / 20% (v/v) Isopropanol / 0,1M Citrato de Sódio pH 5,8-6,0;
- Medidas aproximadas dos cristais: PrTX-I-BPB: ~ 0,40 x 0,10 x 0,05 mm (Figura 20a) e BthTX-I-BPB: ~ 0,40 x 0,15 x 0,15 mm (Figura 20 b, c).

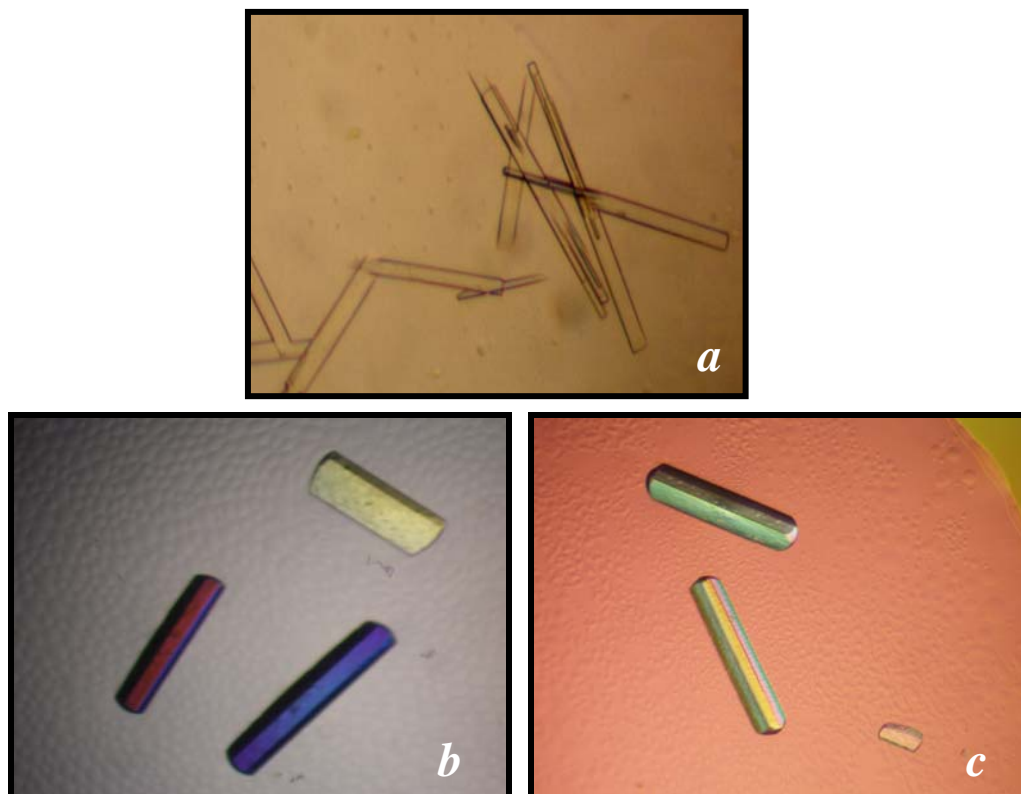


Figura 20: Cristais dos complexos PrTX-I-BPB e BthTX-I-BPB. *a.* PrTX-I-BPB formados após 60 a 18° C; *b.* BthTX-I-BPB formados após 15 dias a 18° C; *c.* BthTX-I-BPB formados após 30 dias a 10° C.

4.2.2. Coleta e processamento de dados de difração de raios-X (Marchi-Salvador *et al.*, 2006 e dos Santos *et al.*, 2007)

Os dados dos complexos PrTX-I-BPB e BthTX-I-BPB foram coletados a 100K, sem adição de crioprotetor com comprimento de ondas de 1,427 Å, utilizando radiação síncrotron.

- PrTX-I-BPB: conjunto de dados composto por 163 imagens (90 mm de distância entre o cristal e o detector) com oscilação de 1°. Dados com resolução máxima de 2,34 Å, R_{merge} de 10,6% e completude de 98,6%. O cristal pertence ao grupo espacial

monoclínico $P2_1$, cujas dimensões da cela unitária são $a=38,6$, $b=70,0$, $c=43,8$ Å e $\beta=102,65^\circ$. As estatísticas dos dados estão descritas na Tabela 04.

Tabela 04: Estatísticas do processamento de dados de difração de raios-X da PrTX-I-BPB (Santos *et al.*, 2007).

PrTX-I-BPB	
Temperatura de cristalização	18° C
Cela unitária (Å)	$a=38,6$; $b=70,0$; $c=43,8$; $\beta=102,65^\circ$
Grupo espacial	$P2_1$
Resolução (Å)	40-2,34 (2,42-2,34) ^a
Reflexões únicas	9854 (916) ^a
Completeza (%)	98,6 (94,0) ^a
R_{merge} (%) ^b	10,6 (38,3) ^a
$I/\sigma(I)$	9,44 (1,95) ^a
Redundância	2,9 (2,4) ^a
Moléculas na unidade assimétrica	2 moléculas
Coeficiente de Matthews (Å ³ /Dalton) ^c	2,138
Conteúdo de solvente (%) ^c	42,52

^a Números entre parênteses correspondem aos dados de mais alta resolução; ^b $R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} (\sum_i (|I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle|)) / \sum_{hkl,i} \langle I_{hkl} \rangle$, onde $I_{hkl,i}$ é a intensidade de uma medida individual da reflexão com índices de Miller h , k e l , e $\langle I_{hkl} \rangle$ é a intensidade média daquela reflexão. Calculado para $I > -3\sigma(I)$; ^c Coeficiente de Matthews calculado assumindo um valor de 0,74 cm³/g para a proteína em um volume parcial específico – programa CNS (Brünger *et al.*, 1992).

- BthTX-I-BPB – conjunto de dados #1: composto por 111 imagens (110 mm de distância entre o cristal e o detector) com oscilação de 1°; conjunto de dados #2: formado por 230 imagens (50 mm de distância entre o cristal e o detector) com oscilação de 0,7°. As estatísticas do processamento dos dados estão descritas na Tabela 05.

Tabela 05: Estatísticas das coletas de dados de difração de raios-X da BthTX-I-BPB (Marchi-Salvador *et al.*, 2006).

BthTX-I-BPB	# 1	# 2
Temperatura de cristalização	18° C	10° C
Cela unitária (Å)	$a=49,2; b=65,8; c=85,4$	$a=56,8; b=78,3; c=66,6$
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	C222 ₁
Resolução (Å)	40-2,28 (2,36-2,28) ^a	40-1,48 (1,53-1,48)
Reflexões únicas	12419 (1202) ^a	22361 (2212) ^a
Completeza (%)	93,3 (94,0) ^a	88,7 (88,4) ^a
R _{merge} ^b	4,7 (23,5) ^a	9,1 (49,1) ^a
I/σ(I)	26,26 (4,81) ^a	10,45 (3,08) ^a
Redundância	4,2 (4,1) ^a	6,1 (6,1) ^a
Moléculas na unidade assimétrica	2 moléculas	1 molécula
Coeficiente de Matthews (Å ³ /Dalton) ^c	2,557	2,745
Conteúdo de Solvente (%) ^c	51,84	55,24

^a Números entre parênteses correspondem aos dados de mais alta resolução; ^b $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} (\sum_i (|I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle|))}{\sum_{hkl,i} \langle I_{hkl} \rangle}$, onde $I_{hkl,i}$ é a intensidade de uma medida individual da reflexão com índices de Miller h, k e l, e $\langle I_{hkl} \rangle$ é a intensidade média daquela reflexão. Calculado para $I > -3\sigma(I)$; ^c Coeficiente de Matthews calculado assumindo um valor de 0,74 cm³/g para a proteína em um volume parcial específico – programa CNS (Brünger *et al.*, 1992).

4.2.3 Elucidação, modelagem manual, refinamento e validação estrutural (Marchi-Salvador *et al.*, 2008b)

- Modelo de coordenadas: monômero da BthTX-I, Lys49-PLA₂, do veneno de *Bothrops jararacussu* (da Silva-Giotto *et al.*, 1998).

Após as elucidações estruturais das proteínas PrTX-I e BthTX-I (conjuntos #1 e #2) modificadas quimicamente pelo BPB foram realizados ciclos de refinamento de corpo rígido, do tipo “*simulated annealing*”, de minimização de energia e foram gerados os respectivos mapas de densidade eletrônica ($3 |F_{\text{obs}}| - 2 |F_{\text{calc}}|$). As correções da seqüência de aminoácidos da PrTX-I em relação ao modelo utilizado foram feitas por mutação de aminoácidos.

Analisando os mapas de densidade eletrônica, cada qual sobre a referida estrutura elucidada, pode-se concluir que próximo aos resíduos de histidina na posição 48 haviam densidades eletrônicas não ocupadas por átomos protéicos. Para estas densidades foram atribuídas moléculas de brometo de *p*-bromofenacila.

Todos os resíduos His48 (monômeros A e B) dos complexos com BPB foram substituídos por resíduos de His ligados covalentemente às moléculas de BPB (Figura 21 *a-c*). Os resíduos de His48-BPB foram obtidos do modelo estrutural da BthA-I-BPB, Asp49-PLA₂ ácida do veneno de *B. jararacussu* (código no PDB: 1Z76 – Magro *et al.*, 2005).

Inseridas as moléculas de BPB, iniciou-se o refinamento das estruturas intercalando-se ajustes manuais a ciclos de refinamento (minimização de energia e fator de temperatura). Entre as etapas de modelagem e refinamento foram gerados mapas de densidade eletrônica (MDEs) e/ou “*omit maps*” (quando necessário sanar dúvidas de posição de resíduos) com coeficiente $3 |F_{\text{obs}}| - 2 |F_{\text{calc}}|$ para que as correções manuais de posição dos aminoácidos pudessem ser feitas. Entre as referidas etapas, diagramas, como por exemplo o de Ramachandran, foram gerados para auxiliar o processo de modelagem manual.

Durante o processo de refinamento da PrTX-I-BPB não foi utilizado simetria não-cristalográfica. As etapas de modelagem e refinamento foram finalizadas quando os valores de R_{cryst} e R_{free} convergiram para 21,93% e 24,28%, respectivamente, para todos os dados entre 20,67 – 2,34 Å. Nos ciclos finais de modelagem manual foram observadas, ainda, três

regiões com densidades eletrônicas não ocupadas (duas próximas às moléculas de BPB e uma outra na interface dimérica, entre os C-terminais), e a estas foram atribuídas moléculas de isopropanol. A atribuição de moléculas de isopropanol às densidades excedentes é explicada pela presença desta substância na composição da solução utilizada para a cristalização desta proteína.

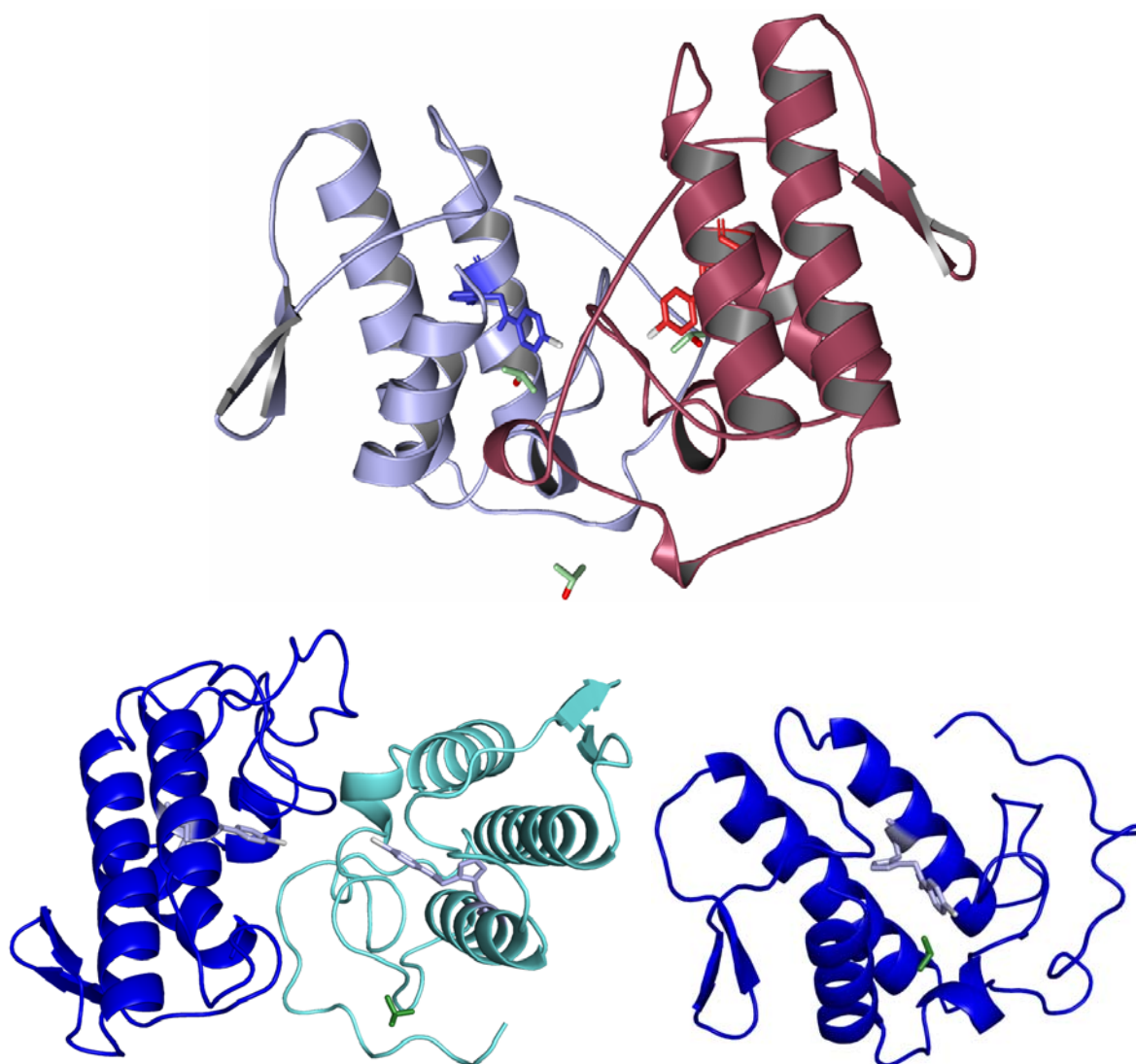


Figura 21: *a.* PrTX-I modificada quimicamente pelo BPB – monômero A (azul claro), monômero B (vermelho escuro), His48-BPB (vermelho e azul) e moléculas de isopropanol (verde); *b.* BthTX-I-BPB dimérica – monômero A (azul), monômero B (ciano), His48-BPB (azul claro), átomo de bromo (cinza) e moléculas de isopropanol (verde); *c.* BthTX-I-BPB monomérica – programa PyMol (DeLano, 2002).

Em determinadas regiões da PrTX-I-BPB onde a densidade eletrônica mostrou-se descontínua ou ambígua, mesmo após vários ciclos de refinamento, optou-se por fazer a mutação de alguns resíduos por outros de glicina ou alanina. A troca dos resíduos Lys69 (monômero A) e Lys127 (monômero B) dotados de grandes cadeias laterais por resíduos de Ala (apresenta menor cadeia lateral) minimizou possíveis incorreções estatísticas.

O modelo cristalográfico final da PrTX-I-BPB é composto por 1894 átomos de proteínas (não-hidrogênios), duas moléculas de BPB, três moléculas de isopropanol e 178 moléculas de solvente (água). O valor de *G*-factor geral foi 2,2, valor classificado como excelente pelo programa PROCHECK (Laskowski, 1993). Demais valores estatísticos relevantes do refinamento estrutural da PrTX-I-BPB estão descritos na Tabela 06.

O modelo cristalográfico da PrTX-I modificada quimicamente pelo BPB foi depositado no banco de dados de estruturas protéicas – *Protein data bank* (PDB) (<http://www.rcsb.org>) – sob o código: 2OK9.

O fator de temperatura médio dos átomos que compõe a PrTX-I-BPB terminou em 49,0 Å². A média de temperatura para os átomos que compõem as cadeias principais foi de 50,2 Å² e para os de cadeias laterais foi de 47,5 Å² (Figura 23).

O processo de modelagem e refinamento do conjunto #2 do complexo BthTX-I-BPB monomérico foi finalizado com os valores de $R_{\text{cryst}} = 19,6\%$ e $R_{\text{free}} = 24,3\%$. O modelo monomérico final é formado por 953 átomos de proteína, uma molécula de BPB, 372 moléculas de solvente (água) e uma molécula de isopropanol (substância presente na composição da solução precipitante utilizada na cristalização da proteína), não apresentando nenhum resíduo disposto em regiões generosamente permitidas ou não permitidas no gráfico de Ramachandran (91,3% dos resíduos dispostos nas regiões mais favoráveis), bem como um *G*-factor geral de 0,8 (Tabela 07).

Tabela 06: Estatísticas de refinamento estrutural do complexo PrTX-I-BPB (Marchi-Salvador *et al.*, 2008b).

PrTX-I-BPB	
Resolução (Å)	20,67 – 2,34 (2,49 – 2,34) ^a
Completeza (%)	98,7 (88,6) ^a
Reflexões únicas	9425 (1355) ^a
R _{cryst} (%) ^b	21,93 (35,0) ^a
R _{free} (%) ^c	24,28 (36,3) ^a
Fator de temperatura médio (Å ²) ^d (Figura 23)	49,0
Número de átomos não hidrogênios ^d	
Proteína	1894
Brometo de <i>p</i> -brompfenacila	20
Solvente (H ₂ O)	178
Isopropanol	12
Diagrama de Ramachandran ^e (Figura 22)	
Resíduos em regiões mais favoráveis (%)	91,8
Resíduos em regiões adicionalmente permitidas (%)	8,2
Resíduos em regiões generosamente permitidas (%)	0,0
Resíduos em regiões não permitidas (%)	0,0
<i>G</i> -factor médio ^e	2,2
Desvio <i>r.m.s.</i> dos valores ideais ^d	
Comprimento das ligações (Å)	0,013
Ângulo das ligações (°)	1,9
Ângulos diédricos (°)	22,8
Ângulos impróprios (°)	1,2
Erros nas coordenadas (Å) ^d	
Gráfico de Luzzati (<i>cross-validated Luzzati plot</i>)	0,33 (0,39) ^a
SIGMAA (<i>cross-validated SIGMAA</i>)	0,41 (0,43) ^a

^a Valores referentes a camada de maior resolução; ^b $R_{\text{cryst}} = \frac{\sum_{hkl} (||F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}||)}{\sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|}$, onde $|F_{\text{obs}}|$ e $|F_{\text{calc}}|$ são as amplitudes dos fatores de estrutura observados e calculados; ^c R_{free} é equivalente ao R_{cryst} , calculado com base em 5% do total das reflexões obtidas; ^d Calculado pelo programa CNS (Brünger *et al.*, 1992); ^e Calculado pelo programa PROCHECK (Laskowski, 1993).

Os processos de modelagem manual e refinamento do modelo da BthTX-I-BPB dimérica (conjunto #1) foram iniciados e, ainda, não finalizados. A estrutura dimérica preliminar é composta de 1877 átomos não hidrogênios de proteína, duas moléculas de BPB, 130 moléculas de solvente (água) e uma molécula de isopropanol (Tabela 07). Os dados estereoquímicos desta estrutura ainda não são totalmente satisfatórios, pois 0,5% e 1,0% dos

resíduos estão dispostos, respectivamente, em regiões não permitidas e generosamente permitidas.

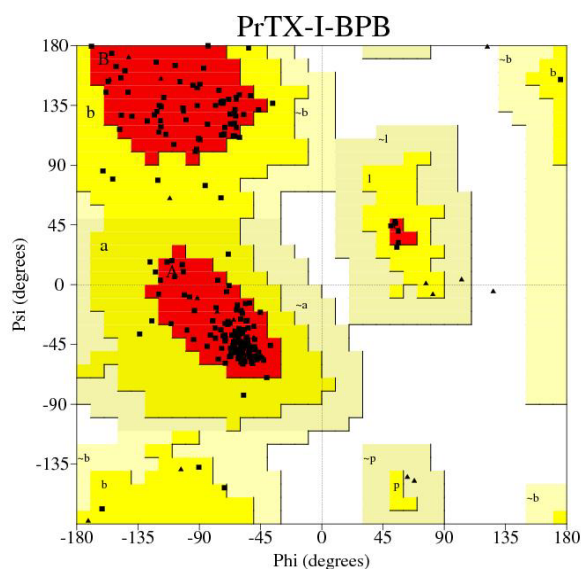


Figura 22: Diagrama de Ramachandran. 91,8% dos resíduos dispostos nas regiões mais favoráveis (vermelho), 8,2% encontrados nas regiões permitidas (amarelo escuro) e nenhum resíduo em regiões generosamente permitidas (amarelo claro) ou não permitidas (branco) – programa PROCHECK (Laskowski, 1993).

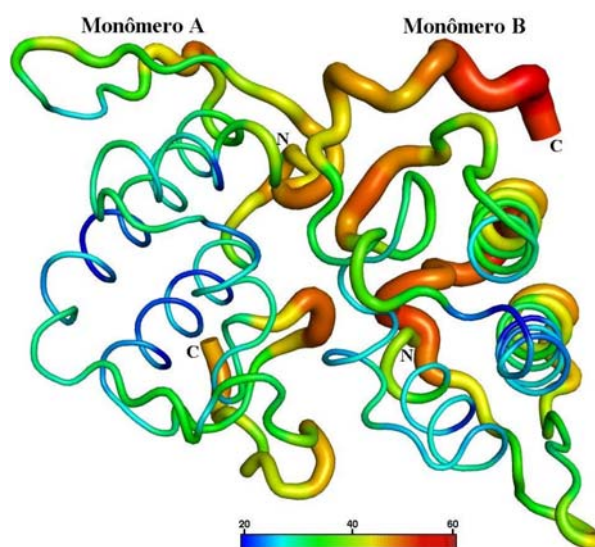


Figura 23: Fator de temperatura da PrTX-I-BPB. A diferença de cores indica desde regiões temperatura mais elevadas (vermelho) até locais com mais estáveis (azul) – programa PyMol (DeLano, 2002).

Tabela 07: Estatísticas de refinamento das estruturas complexo BthTX-I-BPB.

BthTX-I-BPB	# 1	# 2
Resolução (Å)	29,40 – 2,28 (2,42 – 2,28) ^{a*}	20,67 – 1,48 (1,57– 1, 48) ^a
Completeza (%)	94,2 (94,3) ^{a*}	88,2 (88,9) ^a
Reflexões únicas	12390 (1943) ^{a*}	22198 (3496) ^a
R _{cryst} ^a (%)	22,6 (26,8) ^{a*}	20,6 (26,0) ^a
R _{free} ^b (%)	27,6* (30,7) ^{a*}	24,3 (26,8) ^a
Fator de temperatura médio (Å ²) ^d	51,8 [*]	29,3
Número de átomos não-hidrogênios ^c		
Proteína	1877 [*]	953
Heterogêneos (Isopropanol)	4 [*]	4
Heterogêneos (BPB)	20	10
Solvente (H ₂ O)	130 [*]	372
Diagrama de Ramachandran (%) ^d		
Resíduos em regiões mais favoráveis	81,3 [*]	91,3
Resíduos em regiões adicionalmente permitidas	14,3 [*]	8,7
Resíduos em regiões generosamente permitidas	0,5 [*]	0,0
Resíduos em regiões não permitidas	1,0 [*]	0,0
G-factor médio ^c	2,5 [*]	0,8
Desvio <i>r.m.s.</i> dos valores ideais ^d		
Comprimento das ligações (Å)	0,006 [*]	0,019
Ângulo das ligações (°)	1,3 [*]	2,1
Ângulos diédricos (°)	21,0 [*]	22,5
Ângulos impróprios (°)	0,7 [*]	2,2
Erros nas coordenadas (Å) ^d		
Gráfico de Luzzati (<i>cross-validated Luzzati plot</i>)	0,30 (0,41) ^{a*}	0,18 (0,23) ^a
SIGMAA (<i>cross-validated SIGMAA</i>)	0,19 (0,26) ^{a*}	0,08 (0,08) ^a

^a Valores referentes a camada de maior resolução. ^b $R_{cryst} = \frac{\sum_{hkl} (|F_{obs_{hkl}}| - |F_{calc_{hkl}}|)}{\sum_{hkl} |F_{obs_{hkl}}|}$, onde $|F_{obs_{hkl}}|$ e $|F_{calc_{hkl}}|$ são as amplitudes dos fatores de estrutura observados e calculados; ^c R_{free} é equivalente ao R_{cryst} , calculado com base em 5% do total das reflexões obtidas. ^d Calculado pelo programa CNS (Brünger *et al.*, 1992). ^e Calculado pelo programa PROCHECK (Laskowski, 1993); * Dados em fase de refinamento/modelagem.

Os dímeros dos complexos PrTX-I-BPB e BthTX-I-BPB são formados pela interação entre as regiões de C-terminais. O modelo cristalográfico da PrTX-I-BPB é estabilizado por duas pontes de hidrogênio (Trp119A : Trp119B e Trp119A : Asn 17B) e diversos contatos hidrofóbicos envolvendo resíduos de ambos os N-terminais (Leu2A e

PheB), hélice- α 1 (Asn17, Ala19, Lys20 e Ala24A), *loop* de ligação de Ca^{2+} (Val31) e C-terminais (Trp119 e Lys122A) (Figura 24).

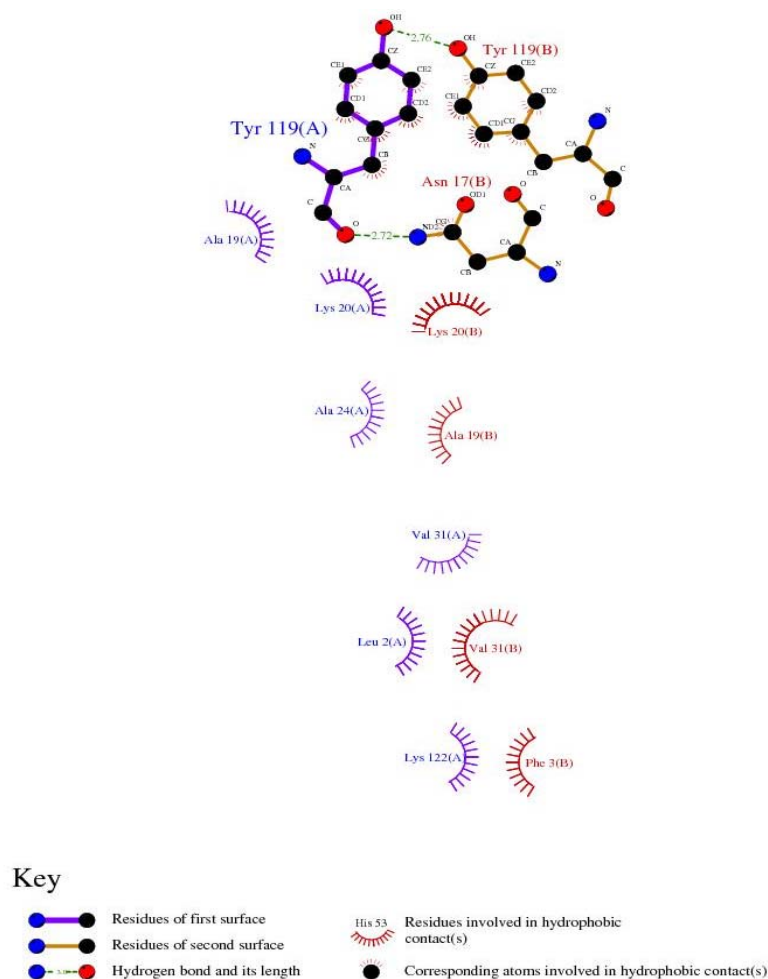


Figura 24: Interações entre os monômeros A (violeta) e B (vermelho) que estabilizam o dímero da PrTX-I-BPB. Contatos polares são indicados em linhas tracejadas, contatos hidrofóbicos são mostrados por arcos com traços. Átomos de carbonos, nitrogênio e oxigênios são pretos, azuis e vermelhos, respectivamente – programa DIMPLOT (Wallace *et al.*, 1995).

Análises preliminares dos dados de refinamento dos modelos cristalográficos da BthTX-I-BPB nos possibilitou inferir que, tanto a estrutura monomérica, como a dimérica moléculas de BPB apresentam ocupação parcial (Figura 25 *a-c*).

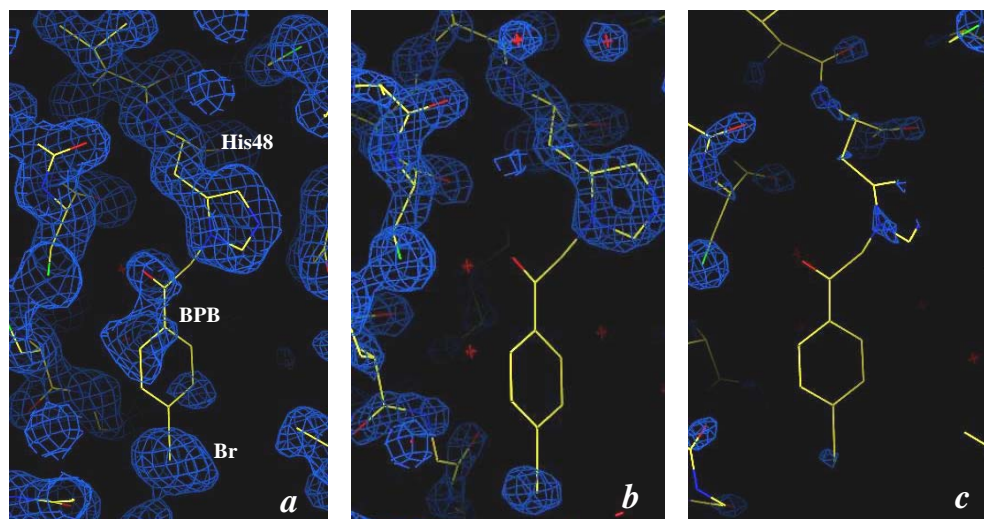


Figura 25: Região da His48-BPB da proteína BthTX-I monomérica sob o mapa de densidade eletrônica $3 |F_{\text{obs}}| - 2 |F_{\text{calc}}|$ foram feitas com diferentes cortes (valores de σ) para demonstrar a ocupação parcial do BPB e do átomo de bromo. *a.* MDE com corte de $1,1\sigma$; *b.* MDE com corte de $3,5\sigma$; *c.* MDE com corte de $4,5\sigma$ – programa “O” (Jones *et al.*, 1990).

Como já mencionado, a molécula de BPB é ligada covalentemente ao átomo $N^{\delta 1}$ do resíduo His48 (Figuras 25 *a-c* e 26 *a-c*).

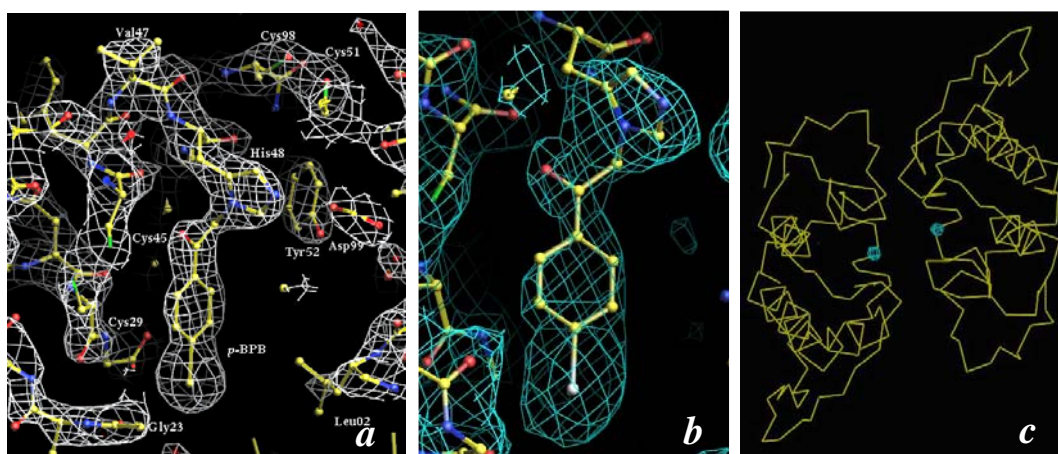


Figura 26: Mapa de densidade eletrônica com coeficiente $3 |F_{\text{obs}}| - 2 |F_{\text{calc}}|$ da PrTX-I-BPB; *a.* zoom da região de ligação do BPB no monômero A com corte de $1,6\sigma$; *b.* monômero B (BPB – His48) com corte de $1,2\sigma$; *c.* MDE com corte de $5,5\sigma$ mostrando densidade eletrônica somente dos átomos de bromo das moléculas de BPB – programa “O” (Jones *et al.*, 1990).

As duas moléculas de água ligadas ao átomo N^{δ1} da His48 na PrTX-I nativa não estão presentes no complexo com BPB, ainda as cadeias laterais das His48 da proteína nativa e complexada estão praticamente na mesma posição.

A alquilação da His48 pelo BPB resultou em alterações sutis tanto da estrutura terciária quanto da quaternária. No entanto, diferenças pouco expressivas na conformação oligomérica podem estar relacionadas aos diferentes grupos espaciais: a proteína nativa pertence ao grupo espacial P3₁21 e o complexo ao P2₁. Já esta mudança de grupo espacial pode ser atribuída à modificação química da His48 pelo BPB.

4.2.4. Conformação dimérica alternativa para as Lys49-PLA₂s

A estrutura oligomérica é um aspecto importante associado às propriedades tóxicas e funcionais de vários modelos cristalográficos de PLA₂s extraídas de venenos de serpentes. Cinco estruturas cristalográficas de Lys49-PLA₂s complexadas com diferentes ligantes só puderam ser resolvidas quando utilizada uma conformação dimérica diferente da convencional (Murakami *et al.*, 2005; dos Santos *et al.*, 2005; Marchi-Salvador *et al.*, 2006; dos Santos *et al.*, 2007 e Marchi-Salvador *et al.*, 2008b; Takeda *et al.*, 2008).

A estrutura cristalográfica do complexo formado entre a BaspTX-II (Lys49-PLA₂) do veneno de *Bothrops asper* e a suramina (uma naftilurea polisulfonada simétrica; droga antitripanosomal) revelou que somente uma molécula de suramina interagiu com os dois monômeros desta proteína (Murakami *et al.*, 2005). A molécula de suramina ligou-se, por pontes de hidrogênio, com os resíduos Arg34 e Lys53. Os grupos sulfonados do anel naftaleno da suramina interagiram com o *loop* de ligação de Ca²⁺. No entanto, a complexação entre BaspTX-II-suramina só foi possível quando os *loops* de ligação de Ca²⁺ estão dispostos

“frente a frente”, pois se esta estrutura fosse resolvida utilizando como modelo o dímero convencional, uma porção significativa da molécula de suramina não interagiria com nenhuma porção da proteína, ficando esta parte exposta ao solvente.

Adicionalmente, três complexos formados entre Lys49-PLA₂s (BnSP-7, BthTX-I e PrTX-I) e vitamina E (α -tocoferol) foram recentemente cristalizados e solucionados (dos Santos *et al.*, 2005; Takeda *et al.*, 2007; dos Santos *et al.*, 2007). Resultados preliminares do complexo BnSP-7- α T (dos Santos *et al.*, 2005 e Marchi-Salvador, 2005) indicaram somente uma densidade eletrônica correspondente a uma molécula de α -tocoferol na região referente ao sítio ativo no monômero A. Este fato pode ser explicado porque na conformação dimérica alternativa a região de interação da vitamina E no monômero B está obstruída pelo monômero A, impedindo a ligação da segunda molécula de α -tocoferol. Para os complexos PrTX-I- α T e BthTX-I- α T também há restrições quanto ao uso do dímero convencional uma vez que as moléculas lipossolúveis de α -tocoferol ficariam expostas ao solvente. Na conformação dimérica alternativa as moléculas de vitamina E ficam totalmente inseridas no dímero.

Análises de dados de espalhamento de raios-X à baixo ângulo realizadas por Murakami *et al.* (2007) com a proteína BthTX-I nativa (Lys49-PLA₂), indicaram que a conformação dimérica alternativa é mais favorável por apresentar um envelope protéico teórico mais compacto.

Duas Lys49-PLA₂s (BthTX-I e PrTX-I, aqui descritas) modificadas quimicamente pelo brometo de *p*-bromofenacila (BPB) foram elucidadas indicando que a conformação dimérica alternativa é mais favorável. Análises das conformações diméricas convencional e alternativa do complexo PrTX-I-BPB com o programa PISA (Krissinel & Henrick, 2007) mostrou que a conformação alternativa é estável em solução (índice de significância de complexação de 0,41 e superfície de contato entre os dímeros de 537,3 Å²) enquanto que a convencional não (índice de significância de complexação nulo e menor superfície de contato

entre os dímeros $400,4 \text{ \AA}^2$) (Marchi-Salvador *et al.*, 2008b). Da mesma forma que no complexo BaspTX-II-suramina, os *loops* de ligação de Ca^{2+} e as regiões referentes ao sítio ativo (conseqüentemente as moléculas de BPB) da PrTX-I-BPB ficam “frente a frente”. Ainda, os *loops* de C-terminal (monômeros A e B) da PrTX-I-BPB que são descritos como responsáveis pela miotoxicidade se correlacionam.

Complementando as análises mencionadas, sete Lys49-PLA₂s diméricas elucidadas com a conformação dimérica convencional foram revisadas e, para todas, confirmou-se a presença da conformação dimérica alternativa. A comparação entre a superfície de contato e o número de contatos polares e não polares das Lys49-PLA₂s para as conformações alternativas e convencionais indicou maior superfície de contato e maior quantidade de contatos não polares entre os dímeros de conformação alternativa enquanto que os dímeros convencionais são estabilizados por contatos polares (Marchi-Salvador, 2005).

4.2.5. Análise estrutural da PrTX-I modificada quimicamente pelo BPB (Marchi-Salvador *et al.*, 2008b)

O programa PISA (Krisenel & Henrick, 2007) analisa os contatos de interface protéica para todas as possibilidades de simetria cristalográfica e calcula qual a interface com maior probabilidade de ocorrer em solução. Análises realizadas com este programa indicaram que a conformação dimérica alternativa utilizada na elucidação estrutural da PrTX-I-BPB é estável em solução, com índice de significância de complexação de 0,41, $537,3 \text{ \AA}^2$ de área de interface entre os monômeros, $-9,3 \text{ Kcal/M}$ de energia livre de solvatação gerada após a formação do dímero (ΔG^{int}) e $\Delta G^{\text{diss}} = 0,15 \text{ Kcal/M}$. No entanto, a conformação oligomérica anteriormente sugerida para as Lys49-PLA₂s não foi identificada como sendo uma estrutura

quaternária estável em solução. A conformação quaternária convencional apresentou índice nulo de significância de complexação, valor inferior para área de interface dimérica ($400,4 \text{ \AA}^2$), e valores superiores para energia livre de solvatação ($0,80 \text{ Kcal/M}$) e $\Delta G^{\text{diss}} = 0,80 \text{ Kcal/M}$.

Kini (2003) descreveu que a alquilação pelo BPB não afeta a estrutura tridimensional das PLA₂s nem sua habilidade de ligar fosfolipídios, porém pode alterar a capacidade de interagir com proteínas específicas ou ligantes. Por outro lado, superposições entre átomos de C^α dos monômeros A e B da PrTX-I-BPB resultou em um desvio de r.m.s. igual a $0,52 \text{ \AA}$, enquanto que o valor da mesma superposição feita com a estrutura nativa foi de $1,04 \text{ \AA}$. Já as superposições entre os átomos de C^α do monômero A da PrTX-I com o mesmo monômero da PrTX-I-BPB gerou um desvio r.m.s. de $1,10 \text{ \AA}$ e entre os monômeros B, o desvio r.m.s. foi de $0,65 \text{ \AA}$. Todas as superposições entre C^α foram calculadas sem considerar moléculas de água.

As superposições entre os quatro monômeros (monômeros A e B da PrTX-I e monômeros A e B da PrTX-I-BPB) indicaram três regiões com diferenças estruturais superficiais: *loop* de ligação de Ca²⁺ (resíduos 29-34), *loop* após a *β-wing* (resíduos 85-90) e *loop* do C-terminal (resíduos 119-133). Dentre estas diferenças estruturais, a mais evidente foi observada entre os resíduos 85 – 90 e 119 – 125 nos monômeros A (Figura 27).

Experimentos de mutações sítio-dirigida realizados com BthTX-I (Lys49-PLA₂ de *B. jararacussu*), confirmaram que as três regiões destacadas acima participam do mecanismo de dano à membrana independente da presença do íon Ca²⁺ (Ward *et al.*, 2002; Chioato, *et al.*, 2002; Sá *et al.*, 2004; Chioato, *et al.*, 2007).

A presença do BPB ligado covalentemente a His48 (nos dois monômeros) deslocou o *loop* de ligação de Ca²⁺ (Gly30, Val31, e Leu32), o qual interagiu com a região de C-terminal, desordenando-na.

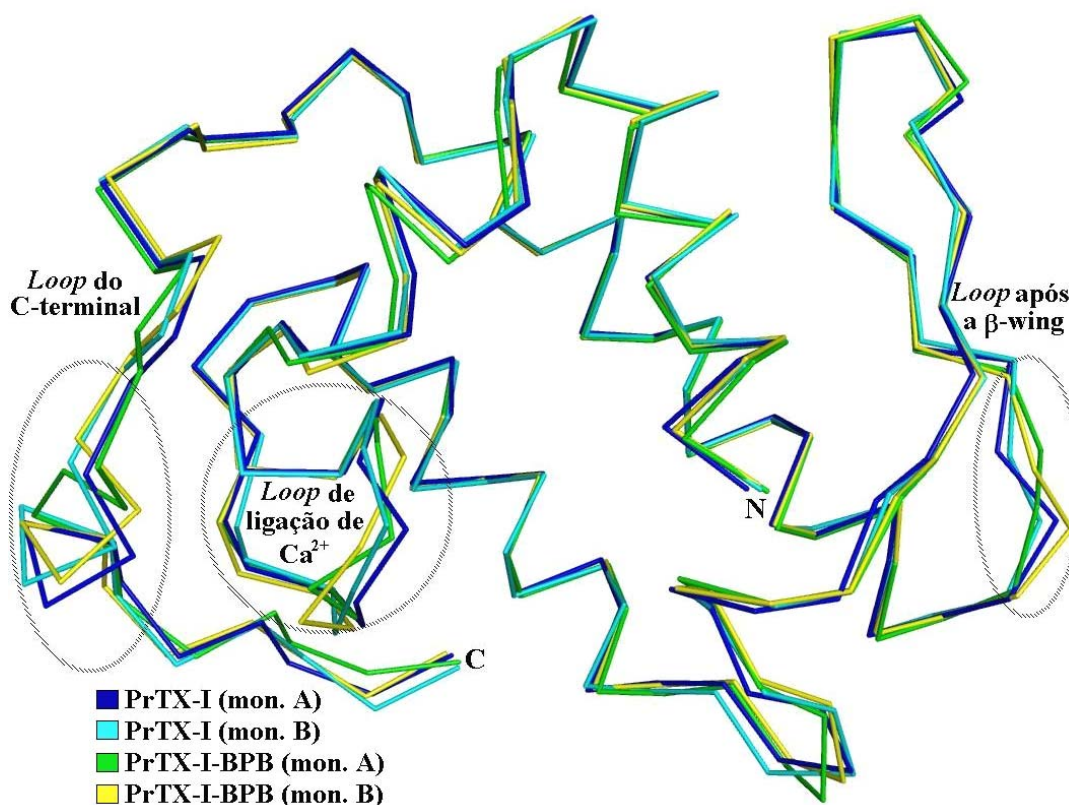


Figura 27: Superposição entre os átomos de C^α da PrTX-I e PrTX-I-BPB. As principais alterações estruturais estão destacadas – programa PyMol (DeLano, 2002).

A comparação entre os *loops* de ligação de Ca^{2+} (monômeros A e B) das PrTX-I e PrTX-I-BPB indicaram modificações estruturais significantes tanto de cadeias principais (Val31 e Leu32) e como de laterais (Leu32). No monômero A da PrTX-I-BPB o átomo de oxigênio do resíduo Leu32 liga-se com o átomo N^ϵ da Lys49 (2,72 Å) e o átomo $C^{\delta 1}$ da cadeia lateral da Leu32 interage com o átomo C^β da Lys122 (3,25 Å). Já, no monômero B o átomo O do resíduo Val31 está rotacionado aproximadamente 180° em relação a este mesmo átomo da PrTX-I e o átomo N^ϵ da Lys49 interage com o átomo C^α da Leu32 (3,86 Å).

Diferenças pouco notáveis foram observadas nas comparações entre os resíduos 57-90 (β -wing e o *loop* após a β -wing) da PrTX-I e da estrutura modificada pelo BPB. A superposição entre os átomos de C^α entre os monômeros A (PrTX-I e PrTX-I-BPB) gerou um desvio r.m.s. de 0,92 Å enquanto que a mesma superposição, porém entre os monômeros B,

foi de 0,63 Å. Em contrapartida, a superposição os átomos de C^α entre as regiões de C-terminal (resíduos 115-133) da PrTX-I e PrTX-I-BPB gerou valor expressivo de r.m.s.d. para o monômero A, 2,34 Å (maior desvio entre os resíduos 119-125, r.m.s. = 2,90 Å), enquanto que para o monômero B (resíduos 115-133) o valor de r.m.s.d. foi de 0,60 Å (Figura 28). Já, a superposição entre os átomos de C^α dos monômeros A e B da PrTX-I-BPB demonstrou que a região 119-125 não apresenta diferenças significativas (r.m.s.d.= 0,18 Å), enquanto que esta mesma superposição quando realizada entre os monômeros A e B da PrTX-I nativa foi de 2,88 Å. Contudo, análises de superposição entre os monômeros A e B da PrTX-I-BPB e entre os monômeros A e B da PrTX-I indicaram que a estrutura modificada quimicamente pelo BPB apresenta maior semelhança estrutural entre seus monômeros.

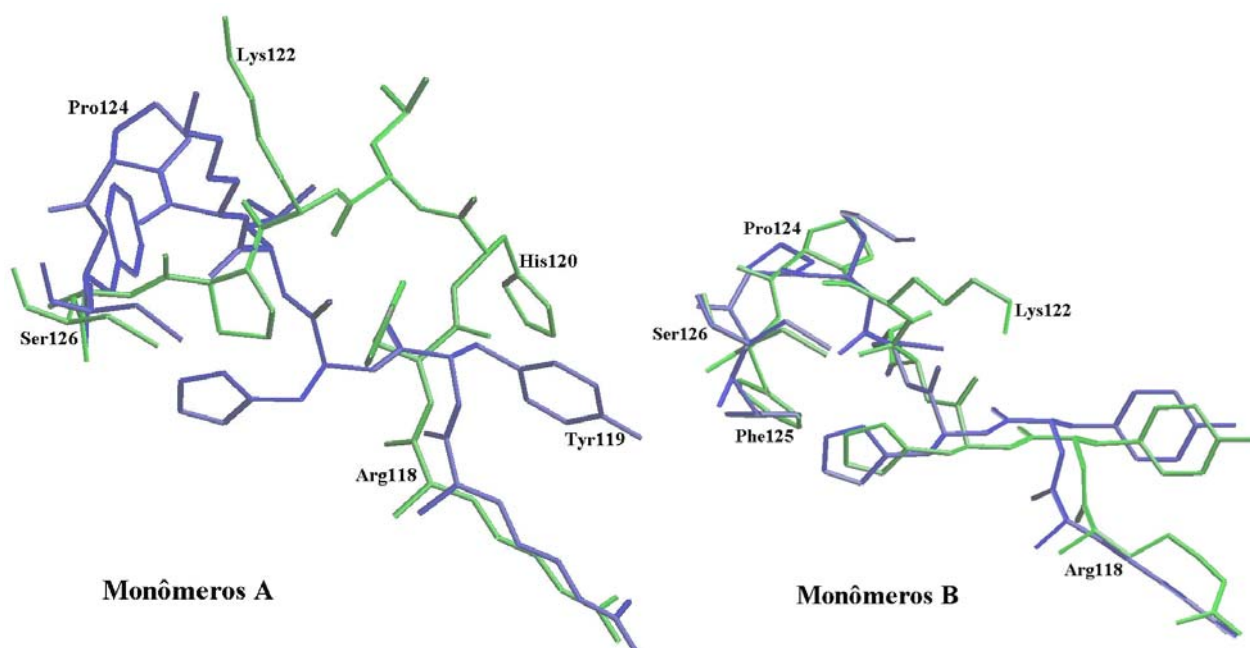


Figure 28: Superposição entre os resíduos de C-terminal da PrTX-I e PrTX-I-BPB – programa “O” (Jones *et al.*, 1990).

Experimentos de mutação sítio-dirigida realizados em BthTX-I por Chioato *et al.* (2002), indicaram que a eliminação de cargas positivas das cadeias laterais e a substituição conservativa de resíduos aromáticos reduzem a atividade miotóxica. O *loop* do C-terminal

pode ser dividido em duas regiões: *i.* resíduos 115 ao 119 que interagem de modo mais superficial, imobilizando a região distal do *loop* de C-terminal através do favorecimento da inserção parcial dos resíduos 122-125; *ii.* resíduos 122-125 que se inserem nas membranas causando dano através de um mecanismo independente da ligação de Ca^{2+} (Chioato *et al.*, 2002; Chioato *et al.*, 2007).

A comparação entre as estruturas cristalográficas da PLA₂ pancreática bovina nativa e a modificada quimicamente pelo BPB (Renetseder *et al.*, 1988) indicou diferenças estruturais significativas principalmente em duas regiões: *loop* de ligação de Ca^{2+} e *loop* pancreático (resíduos 59-72). Em contraste, a mesma análise (entre a proteína nativa e modificada pelo BPB) realizada com a Ag, PLA₂ ácida do veneno de *Agkistrodon halys* Pallas (Zhao *et al.*, 1998), revelou notável similaridade entre as estruturas (r.m.s.d. dos átomos de C^α das estruturas: 0,24 Å). Por outro lado, a comparação estrutural entre as BthA-I e BthA-I-BPB, uma PLA₂ ácida do veneno de *Bothrops jararacussu* (Magro *et al.*, 2004; Magro *et al.*, 2005) mostrou três principais regiões com elevadas diferenças estruturais: *loop* de ligação de Ca^{2+} , região de *β-wing* e *loop* do C-terminal e, ainda, revelou mudança na estrutura quaternária. Embora os autores defendam que a modificação química causada pelo BPB altere a conformação oligomérica, análises da estrutura nativa depositada no PDB sob o código 1U73 apresentam, por simetria cristalográfica, a mesma estrutura quaternária da proteína modificada pelo BPB depositada no PDB sob o código 1Z76.

Os resultados acima descritos são contraditórios: um indicou mudanças estruturais severas tanto na conformação oligomérica como de estrutura terciária (Magro *et al.*, 2005), outro mostrou mudanças significativas de estrutura terciária (Renetseder *et al.*, 1988) enquanto que um terceiro não apresentou diferenças estruturais notáveis (Zhao *et al.*, 1998).

Análises comparativas entre os modelos cristalográficos da PrTX-I-BPB e da PrTX-I indicaram mudanças pouco significativas de estrutura terciária e da conformação

oligomérica. Embora a estrutura cristalográfica da PrTX-I pareça ser mais compacta do que a da PrTX-I-BPB, o cálculo da área de superfície externa dos dímeros são similares 11901,7 Å² e 11891,2 Å², respectivamente. No entanto a superfície de contato entre os monômeros de cada dímero é de 1323,72 Å² para a PrTX-I e de 1063,85 Å² para a PrTX-I-BPB.

O pequeno, mas existente desvio estrutural do *loop* de ligação de Ca²⁺ ocorrido na estrutura da PrTX-I-BPB em relação à da PrTX-I nativa pode estar associado à presença da molécula de BPB próxima a esta região. Já a insignificante diferença nesta mesma região da Ag-BPB de *Agkistrodon halys* Pallas (Zhao *et al.*, 1998) foi correlacionada com a presença do íon Na⁺ no *loop* de ligação de Ca²⁺. O íon Na⁺ presente na região de ligação de Ca²⁺ impede que esta região seja desordenada. No entanto, a PrTX-I-BPB apresenta o átomo N^ε da Lys49 na mesma posição do íon Na²⁺ (da Ag-BPB), o que não permite deslocamentos severos deste *loop* como observado na BthA-I BPB e na PLA₂ bovina.

Estudos baseados em modificações químicas de resíduos específicos em PLA₂s (por exemplo, a His48) apontaram dissociação entre os efeitos farmacológicos e a atividade enzimática nestas enzimas (Díaz-Oreiro & Gutiérrez, 1997; Toyama *et al.*, 1998; Soares *et al.*, 2001b; Soares *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2004a), contudo, são necessários estudos mais detalhados para elucidar uma importante questão: Qual a relação entre a alquilação da His48 pelo BPB com a redução de atividades tóxicas (miotoxicidade, citotoxicidade e indução de edema)?

A alquilação da His48 pelo BPB em algumas Lys49-PLA₂s (extraídas dos venenos de *B. pirajai*, *B. moojeni*, *B. asper*, *B. jararacussu* e *B. pauloensis*) reduziram o efeito miotóxico em 40-50%, a citotoxicidade em 80-85% e a atividade de indução de edemas em 15-20%, sem apresentar mudança significativa na habilidade destas proteínas de romper lipossomos (Díaz-Oreiro & Gutiérrez, 1997; Toyama *et al.*, 1998; Soares *et al.*, 2000a; Soares *et al.*, 2000b; Soares & Giglio 2003; Soares *et al.*, 2004a; Soares *et al.*, 2004b).

Recentemente, experimentos de mutagênese sítio-dirigida em BthTX-I associaram as atividades miotóxicas e de dano à membrana independente do íon Ca^{2+} com a região de C-terminal. Estes resultados corroboraram os dados obtidos em experimentos de modificação química pelo BPB e, ainda, nos possibilitou inferir que estas atividades podem ser determinadas por *motifs* superpostos ou não no *loop* de C-terminal (Chioato *et al.*, 2002; Ward *et al.*, 2002; Chioato *et al.*, 2007). Adicionalmente, estes experimentos realizados por Chioato *et al.* (2007) mostraram que os resíduos entre as posições 117-125 (com exceção dos resíduos His120 e Leu121) juntamente com o resíduo Pro37 são essenciais para a ocorrência da miotoxicidade. Já, os resíduos localizados entre as posições 115-127 unidos aos da região 36-43 e junto com a Tyr46 e Lys53, reduzem a atividade de dano à membrana (Chioato *et al.*, 2007).

O estudo estrutural da PrTX-I, uma Lys49-PLA₂ (não apresenta atividade catalítica mensurável, porém expressam elevada atividade miotóxica) modificada quimicamente pelo BPB (alquilação da His48) é inédito e pode auxiliar na compreensão de como os mecanismos tóxicos e farmacológicos se desencadeiam bem como a região molecular responsável por estes efeitos. A alquilação da conservada His48 pelo BPB reduz, significativamente, a miotoxicidade, a citotoxicidade e as atividades tóxicas atribuídas à região de C-terminal, indicando que o mecanismo tóxico desta proteína não é exclusivo do sítio ativo.

4.3. BthTX-II (Apêndices VI e VI)

Estudos cristalográficos com a BthTX-II foram realizados em colaboração com o Mestre Luíz Cláudio Corrêa e estão detalhadamente descritos em sua dissertação (Corrêa, 2007).

4.3.1. Cristalização (Corrêa *et al.*, 2006)

- Concentração da amostra protéica: 12 mg/mL solubilizada em água (MilliQ);
- Solução de cristalização: 13% (w/v) PEG 4000 / 20% (v/v) Isopropanol / 0,1M Citrato de Sódio pH 5,6;
- Medidas aproximadas dos cristais: ~ 0,40 x 0,20 x 0,10 mm (Figura 29).



Figura 29: Cristais da BthTX-II formados após 60 dias em temperatura constante de 18°C.

4.3.2. Coleta e processamento de dados de difração de raios-X (Corrêa *et al.*, 2006)

- Dados de coleta: os dados da BthTX-II foram coletados a 100K, sem adição de crioprotetor, com comprimento de ondas de 1,427 Å, usando radiação síncrotron. O

conjunto de dados é composto por 149 imagens (100 mm de distância entre o cristal e o detector) com oscilação de 1°.

- Processamento dos dados: O cristal pertence ao grupo espacial centrado monoclinico C2, cujas dimensões da cela unitária são $a=58,9$; $b=98,5$; $c=46,7$; $\beta=125,89^\circ$. Os dados com resolução máxima de 2,13 Å apresentaram R_{merge} de 9,1% e 96,1% de completude. As estatísticas do processamento dos dados estão descritas na Tabela 08.

Tabela 08: Estatísticas do processamento dos dados de difração de raios-X da BthTX-II (Corrêa *et al.*, 2006).

BthTX-II	
Cela unitária (Å)	$a=58,912$; $b=98,458$; $c=46,720$; $\beta=125,89^\circ$
Grupo espacial	C2
Resolução (Å)	40-2,13 (2,21-2,13) ^a
Reflexões únicas	11560 (1127) ^a
Completeza (%)	96,1 (94,2) ^a
R_{merge} ^b	9,1 (26,4) ^a
$I/\sigma(I)$	10,6 (3,7) ^a
Redundância	3,0 (2,9) ^a
Moléculas na unidade assimétrica	2 moléculas
Coefficiente de Matthews (Å ³ /Dalton) ^c	2,0
Conteúdo de Solvente (%) ^c	37,4

^a Números entre parênteses correspondem aos dados de mais alta resolução; ^b $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} (\sum_i (|I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle|))}{\sum_{hkl,i} \langle I_{hkl} \rangle}$, onde $I_{hkl,i}$ é a intensidade de uma medida individual da reflexão com índices de Miller h, k e l, e $\langle I_{hkl} \rangle$ é a intensidade média daquela reflexão. Calculado para $I > -3\sigma(I)$; ^c Coeficiente de Matthews calculado assumindo um valor de 0,74 cm³/g para a proteína em um volume parcial específico – programa CNS (Brünger *et al.*, 1992).

4.3.3. Elucidação, modelagem manual, refinamento e validação estrutural (Corrêa *et al.*, 2008)

- Modelo de coordenadas: monômero da PrTX-III (Asp49-PLA₂ do veneno de *Bothrops pirajai*) depositada no banco de dados PDB sob o código 1GMZ (Rigden *et al.*, 2003).

Após a elucidação estrutural da BthTX-II, foram feitos ciclos de refinamento de corpo rígido, do tipo *simulated annealing*, de minimização de energia e o mapa de densidade eletrônica (MDE) com coeficiente $3 |F_{\text{obs}}| - 2 |F_{\text{calc}}|$ foi gerado. Baseado nas informações do MDE, algumas mutações foram realizadas para corrigir a seqüência de aminoácidos da BthTX-II em relação ao modelo utilizado (PrTX-III).

Seguidos ciclos de modelagem manual e de refinamento de energia e temperatura dos átomos que compõem o modelo estrutural foram realizados no intuito de melhor adequar o modelo utilizado aos dados obtidos do cristal da BthTX-II. Intercalados aos os últimos ciclos de modelagem e refinamento, foram inseridas 321 de moléculas de água. O modelo cristalográfico final da BthTX-II apresenta uma excelente estereoquímica, não apresentando nenhum resíduo em regiões generosamente ou não permitidas no gráfico de Ramachandran (Laskowski *et al.*, 1993). Dados estatísticos de refinamento da BthTX-II estão descritos na Tabela 09.

O modelo cristalográfico da BthTX-II foi depositado no banco de dados de estruturas protéicas – *Protein data bank* (PDB) (<http://www.rcsb.org>) – sob o código: 2OQD.

Tabela 09: Estatísticas do refinamento estrutural da BthTX-II (Corrêa *et al.*, 2008).

BthTX-II	
Resolução (Å)	30,01-2,19 (2,33-2,19) ^a
Completeza (%)	95,9 (92,9) ^a
Reflexões únicas	10687 (1619) ^a
R _{Cryst} (%) ^b	20,7 (35,9) ^a
R _{free} (%) ^c	22,7 (40,4) ^a
Número de átomos não hidrogênios ^d	
Proteína	1891
Solvente (H ₂ O)	231
Fator de temperatura médio (Å ²) ^d (Figura 30)	35,1
Diagrama de Ramachandran ^e	
Resíduos em regiões mais favoráveis (%)	88,9
Resíduos em regiões adicionalmente permitidas (%)	11,1
Resíduos em regiões generosamente permitidas (%)	0,0
Resíduos em regiões não permitidas (%)	0,0
G-factor médio ^e	-0,1
Desvio <i>r.m.s.</i> dos valores ideais ^d	
Comprimento das ligações (Å)	0,023
Ângulo das ligações (°)	2,3
Ângulos diédricos (°)	24,6
Ângulos impróprios (°)	1,81
Erros nas coordenadas (Å) ^d	
Gráfico de Luzzati (<i>cross-validated Luzzati plot</i>)	0,27 (0,31) ^a
SIGMAA (<i>cross-validated SIGMAA</i>)	0,34 (0,35) ^a

^a Valores referentes a camada de maior resolução. ^b $R_{cryst} = \sum_{hkl} (||F_{obs_{hkl}}| - |F_{calc_{hkl}}||) / |F_{obs_{hkl}}|$, onde $|F_{obs_{hkl}}|$ e $|F_{calc_{hkl}}|$ são as amplitudes dos fatores de estrutura observados e calculados; ^c R_{free} é equivalente ao R_{cryst} , calculado com base em 5% do total das reflexões obtidas. ^d Calculado pelo programa CNS (Brünger *et al.*, 1992).

^e Calculado pelo programa PROCHECK (Laskowski, 1993).

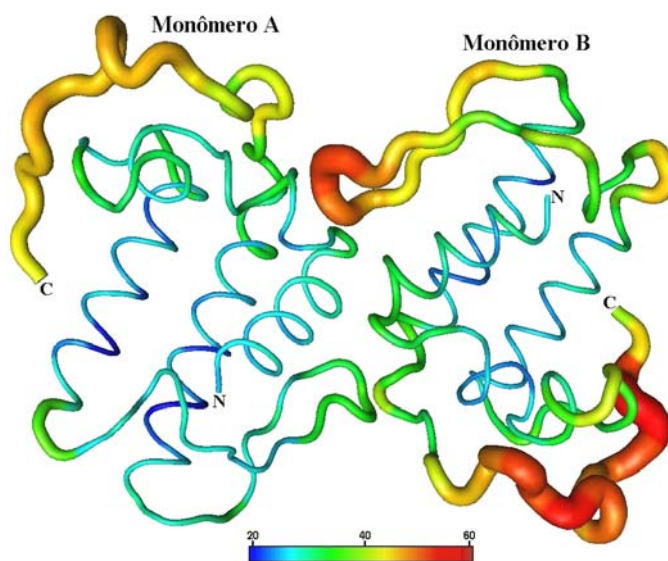


Figura 30: Dímero da BthTX-II indicando as regiões com fatores de temperaturas desde regiões menos instáveis (em vermelho e alaranjado) a regiões mais estáveis (azul escuro) – programa PyMol (DeLano, 2002).

4.3.4. Análise estrutural da BthTX-II (Corrêa *et al.*, 2008)

A BthTX-II é uma Asp49-PLA₂ básica, dimérica e apresenta mensuráveis atividades miotóxica e citotóxica (geralmente observadas em Lys49-PLA₂s). O sítio catalítico formado pelos resíduos His48, Tyr52, Tyr73 e Asp99 está conservado embora esta proteína apresente reduzida atividade catalítica quando comparada com as demais PLA₂s.

A estrutura quaternária da BthTX-II é formada pela interação das regiões de β -wing em direções opostas (Figura 32). O dímero é estabilizado por duas pontes de hidrogênio (Arg77A : Thr13B e Lys16A : Ala78B) e diversos contatos hidrofóbicos. A maioria dos contatos envolve resíduos da hélice- α 1 (resíduos 10-14), β -wing (resíduos 78-80) e Leu110 do C-terminal. Esta formação dimérica é semelhante à formação dimérica convencional das Lys49-PLA₂s (Figura 31).

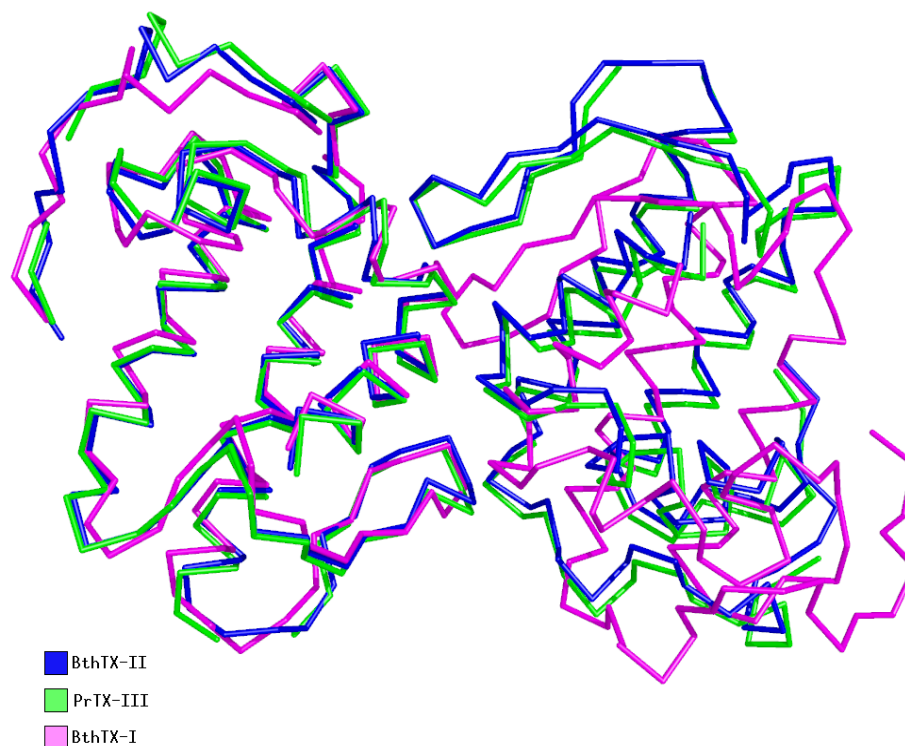


Figura 31: Superposição entre os átomos de C^α dos dímeros da BthTX-II, PrTX-III de *Bothrops pirajai* (Asp49-PLA₂s com baixa atividade catalítica) e da BthTX-I de *B. jararacussu* (Lys49-PLA₂s) indicando a semelhança conformacional entre as estruturas – programa PyMol (DeLano, 2002).

A superposição entre os átomos de C^α da BthTX-II e seis outras PLA₂s (duas Asp49-PLA₂s ácidas – BthA-I de *Bothrops jararacussu* e Ag-ácida de *Agkistrodon halys* Pallas; duas Asp49-PLA₂s básicas – PrTX-III de *B. pirajai* e Ag-básica de *A. h. Pallas*; duas Lys49-PLA₂s – BthTX-I de *B. jararacussu* e PrTX-II de *B. pirajai*) indicou três principais regiões com significativos desvios r.m.s.: *loop* de ligação de Ca^{2+} , β -wing e *loop* do C-terminal (Figura 32a). Dentre as três regiões destacadas, o *loop* de ligação de Ca^{2+} demonstrou interessante distorção (Figura 32b), a qual pode ter sido gerada pela presença de uma ponte de hidrogênio entre as cadeias laterais da Tyr28 (OH) e da Asp49 ($O^{\delta 2}$) (distância de 2,74 Å) (Figura 33).

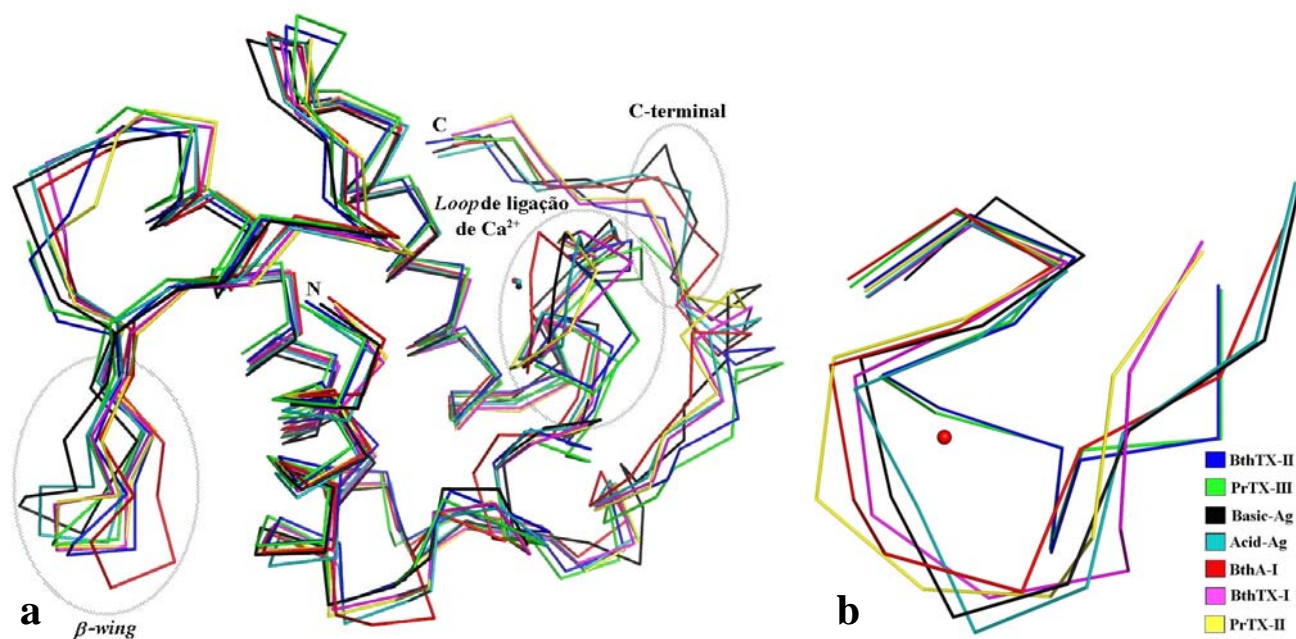


Figura 32: Superposição de átomos de C^α da BthTX-II e seis PLA₂s. *a.* superposição entre os monômeros A; *b.* zoom do *loop* de ligação de Ca^{2+} , a esfera vermelha representa o íon Ca^{2+} (BthA-I, Asp49-PLA₂ ácida) – programa PyMol (DeLano, 2002).

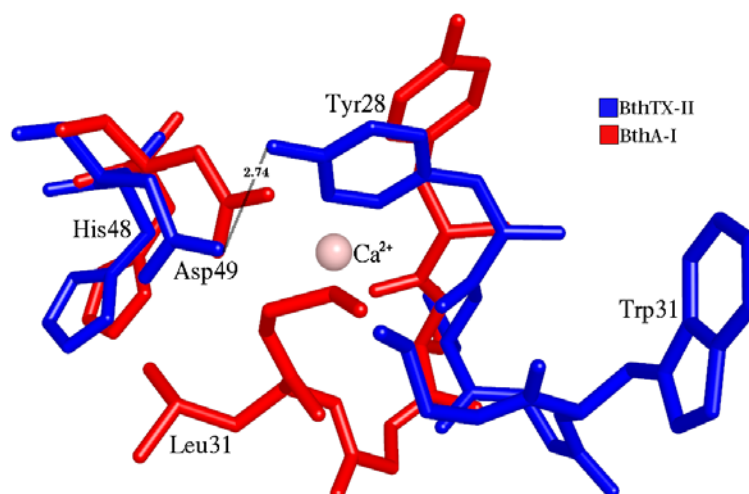


Figura 33: Superposição entre a BthTX-I e BthA-I indicando a ponte de hidrogênio entre a Tyr28 e Asp49 e as diferentes posições entre a cadeia lateral dos resíduos Tyr28 e cadeias principais/laterais dos resíduos 30-32 (principalmente os Leu31-BthA-I e Trp31-BthTX-II) – programa PyMol (DeLano, 2002).

A visível distorção do *loop* de ligação de Ca^{2+} pôde ser confirmada quando foi feita a superposição entre os átomos de C^α da região do *loop* de ligação de Ca^{2+} da BthTX-II

com as demais PLA₂s (BthA-I, BthTX-I, Ag-ácida, Ag-básica e PrTX-II) resultando em um desvio *r.m.s.* em torno de 2,0 Å, em contraste com o desvio *r.m.s.* de 0,2 Å obtido com a superposição entre a BthTX-II e a PrTX-III.

O deslocamento do *loop* de ligação de Ca²⁺ observado na BthTX-II (e PrTX-III) compromete a habilidade de ligar o íon Ca²⁺ e, conseqüentemente interfere na ação catalítica desta proteína. Contudo, a reduzida atividade catalítica ainda exercida pela BthTX-II pode ser ocasionadas por um mecanismo alternativo diferente das demais PLA₂s.

4.4. MjTX-I (Apêndice VII)

4.4.1. Cristalização (Marchi-Salvador *et al.*, 2005)

- Concentração da amostra protéica: 12 mg/mL, solubilizada em água (MilliQ);
- Solução de cristalização: 32% (w/v) PEG 4000 / 0,1M TRIS HCl pH 8,5 / 0,15M Cloreto de Magnésio;
- Temperatura constante: 18°C;
- Medidas aproximadas dos cristais: ~ 0,20 x 0,15 x 0,10 mm (Figura 34).

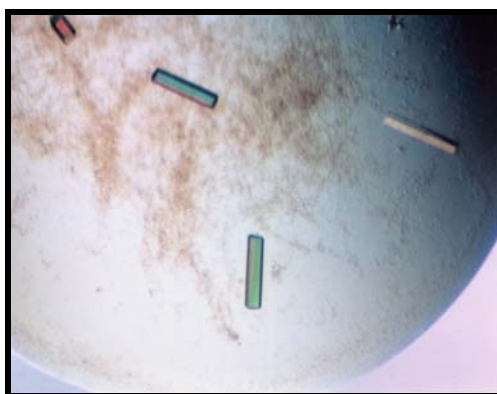


Figura 34: Monocristais de MjTX-I nativa formados após 347 dias a 18° C.

4.4.2. Coleta e processamento de dados de difração de raios-X (Marchi-Salvador *et al.*, 2005)

- Dados de coleta: os dados da MjTX-I foram coletados a 100K, sem adição de crioprotetor com comprimento de ondas de 1,421 Å, usando radiação síncrotron. O conjunto de dados é composto por 146 imagens (80 mm de distância entre o cristal e o detector) com oscilação de 1°.

- Processamento dos dados: os dados foram processados a 2,18 Å de resolução, R_{merge} de 6,0% e 97,0% completeza. O cristal pertence ao grupo espacial centrado monoclinico C2, cujas dimensões da cela unitária são $a=56,8$; $b=125,0$; $c=64,7$ Å e $\beta=105,5^\circ$. As estatísticas do processamento dos dados estão descritas na Tabela 10.

Tabela 10: Estatísticas do processamento de dados de difração de raios-X da MjTX-I (Marchi-Salvador *et al.*, 2005).

MjTX-I	
Cela unitária (Å)	$a=56,8$; $b=125,0$; $c=64,7$; $\beta=105,5$
Grupo espacial	C2
Resolução (Å)	40-2,18 (2,28-2,18) ^a
Reflexões únicas	22875 (2843) ^a
Completeza (%)	97,0 (96,8) ^a
R_{merge} (%) ^b	6,0 (52,5) ^a
$I/\sigma(I)$	19,2 (2,0) ^a
Redundância	3,8 (3,7) ^a
Moléculas na unidade assimétrica	4 moléculas
Coeficiente de Matthews (Å ³ /Dalton) ^c	2,7
Conteúdo de solvente (%) ^c	39,3

^a Números entre parênteses correspondem aos dados de mais alta resolução; ^b $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} (\sum_i (|I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle|))}{\sum_{hkl,i} \langle I_{hkl,i} \rangle}$, onde $I_{hkl,i}$ é a intensidade de uma medida individual da reflexão com índices de Miller h, k e l, e $\langle I_{hkl} \rangle$ é a intensidade média daquela reflexão. Calculado para $I > -3\sigma(I)$; ^c Coeficiente de Matthews calculado assumindo um valor de 0,74 cm³/g para a proteína em um volume parcial específico – programa CNS (Brünger *et al.*, 1992).

4.4.3. Elucidação e dados preliminares de modelagem manual e refinamento estrutural

- Modelo de coordenadas: monômero da PrTX-II (Lys49-PLA₂ do veneno de *Bothrops pirajai*) depositada no bando de dados PDB sob o código 1QQL (Lee *et al.*, 2001).

Após a elucidação estrutural da MjTX-I, ciclos de refinamento (corpo rígido, do tipo “*simulated annealing*”, e minimização de energia) e o mapa de densidade eletrônica (MDE) com coeficiente $3 |F_{\text{obs}}| - 2 |F_{\text{calc}}|$ foram feitos. Baseando-se nas informações do MDE, algumas mutações foram realizadas para corrigir a seqüência de aminoácidos da MjTX-I em relação ao modelo (PrTX-II) utilizado.

Análises da conformação oligomérica do modelo cristalográfico e dos resíduos envolvidos na estabilização dimérica foram feitas com o programa PISA – Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies (Krissinel & Henrick, 2007).

A oligomerização da MjTX-I, para ser melhor compreendida, pode ser dividida em duas etapas: dois dímeros formados pela interação das regiões de β -wing em direções opostas (modelo dimérico convencional semelhante ao observado para as Lys49-PLA₂s) e um tetrâmero constituído pela interação de dois dímeros lado a lado (β -wing de um monômero ao lado do *loop* de C-terminal de outro monômero) (Figura 35).

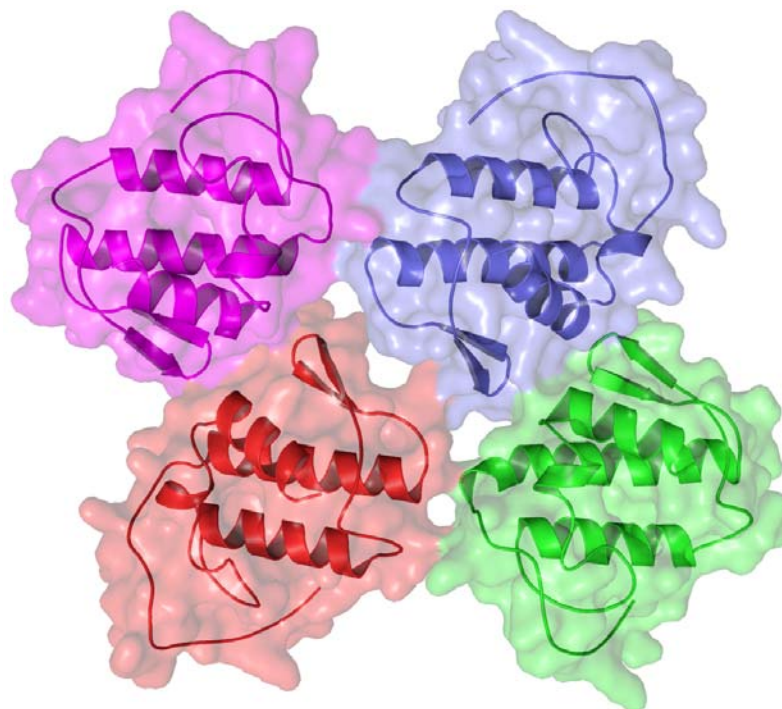


Figura 35: Tetrâmero da MjTX-I. Vermelho-monômero A; magenta-monômero B; verde-monômero C; azul-monômero D – programa PyMol (DeLano, 2002).

A estrutura tetramérica da MjTX-I é estabilizada por onze pontes de hidrogênio, seis pontes salinas e diversos contatos hidrofóbicos (Tabela 11). A maioria dos contatos hidrofóbicos envolve resíduos da hélice- α 1 (resíduos 10-16), β -wing (resíduos 76-82) e do C-terminal (resíduos 104-116).

O processo de modelagem manual e refinamento de átomos ainda não foi finalizado, porém, foi encerrado, oportunamente, com valores elevados de R_{cryst} e R_{free} de 27,18% e 29,91% para todos os dados entre 40 e 2,25 Å de resolução. O modelo cristalográfico atual é composto por 3940 átomos protéicos (não-hidrogênios) e 132 moléculas de solvente (H_2O). A disposição dos resíduos protéicos no Gráfico de Ramachandan ainda é indesejável, contando com somente 75,5% dos resíduos em regiões favoráveis; conseqüentemente com 18,8% em regiões adicionalmente permitidas, 3,6% em generosamente permitidas e 2,2% em não permitidas (Figura 36).

Tabela 11: Tipos e distâncias de interações envolvidas na estabilização do tetrâmero da MjTX-I.

Pontes Salinas					
Monômero A	Distância (Å)	Monômero B	Monômero C	Distância (Å)	Monômero D
Glu12 [OE1]	3,23	Lys80 [NZ]	Lys80 [NZ]	3,37	Glu12 [OE1]
Glu12 [OE2]	2,95	Lys80 [NZ]	Lys80 [NZ]	2,11	Glu12 [OE2]
Lys80 [NZ]	3,59	Glu12 [OE1]			
Lys80 [NZ]	2,78	Glu12 [OE2]			
Pontes de Hidrogênio					
Monômero A	Distância (Å)	Monômero B	Monômero C	Distância (Å)	Monômero D
Gln11 [O]	2,63	Trp77 [NE1]	Gln11 [O]	3,48	Trp77 [NE1]
Lys80 [O]	3,06	Lys80 [NZ]	Glu12 [O]	3,25	Trp77 [NE1]
Trp77 [NE1]	3,16	Gln11 [O]	Lys80 [O]	3,21	Lys80 [NZ]
Trp77 [NE1]	3,85	Glu12 [O]	Trp77 [NE1]	3,12	Gln11 [O]
Monômero B	Distância (Å)	Monômero D			
Gly111 [O]	2,71	Lys93 [NZ]			
Trp113 [O]	3,39	Asn60 [ND2]			
Asn114 [OD1]	3,33	Thr56 [OG1]			

Nos primeiros ciclos de refinamento foi utilizada a simetria não-cristalográfica (SNC). Os resultados obtidos tanto com o emprego da SNC restrita (quando os monômeros são exatamente iguais) como com a SNC não restrita (monômeros semelhantes) só geraram resultados satisfatórios nos ciclos iniciais. No entanto, para os ciclos seguintes de refinamento optou-se por não continuar utilizando a SNC.

Até o presente modelo cristalográfico nenhuma mutação foi realizada por falta ou ambigüidade na densidade eletrônica. O valor médio preliminar do fator de temperatura médio para todos os átomos que compõe a estrutura é de 42,4 Å².

amostra a 12 mg/mL, solubilizada em água (MilliQ). As medidas de DLS foram realizadas em diferentes temperaturas (20, 25, 30, 35 e 50° C) e todos resultados obtidos indicaram que a amostra apresentava indícios de amostra não-monomodal. O valor do raio hidrodinâmico (R_H) para todas as medidas foi superior a 10 nm e a porcentagem de polidispersão obtida foi acima de 25%. Contudo, pode-se concluir que, em solução, a MjTX-I apresenta agregados protéicos que dificultaram a sua cristalização (Marchi-Salvador, 2005).

Soares *et al.* (2000a) realizaram experimentos de eletroforese SDS-PAGE em condições de não-redução com amostras de MjTX-I liofilizadas e estocadas a 4° C por três semanas. A análise destes experimentos de eletroforese revelou a formação de dímeros (84,1%), trímeros (6,3%) e pentâmeros (2,3%). Já, os resultados obtidos de experimentos eletroforese feitos na presença de ditioneitol (DDT) indicaram a presença de monômeros (91,8%), de dímeros (5,2%) e de tetrâmeros (1,2%).

No entanto, podemos inferir que a formação tetramérica observada na MjTX-I pode tanto ser um artefato de cristalização que se repetiu em três conjuntos de dados de difração de raios-X (obtidos de diferentes cristais formados em semelhantes condições físico-químicas (dois destes conjuntos não foram aqui descritos)), como ser um dos estados oligoméricos no qual a MjTX-I pode se encontrar (como observado no experimento de eletroforese realizado por Soares *et al.* (2000a)).

5. CONCLUSÕES

O entendimento dos sistemas biológicos ao nível molecular tem apresentado avanços importantes, em grande parte, devido aos conhecimentos gerais e detalhados de estruturas tridimensionais obtidos com o avanço da área cristalográfica. A determinação da estrutura tridimensional de uma proteína é apenas um passo na elucidação de seus mecanismos envolvidos nas relações estrutura/função.

A análise do modelo estrutural do tetrâmero da Crotoxina B indicou que esta Asp49-PLA₂ básica é formada pela associação de dois dímeros compostos por dois monômeros distintos – isoformas CB1 (monômeros B e C) e CB2 (monômeros A e D). Experimentos de eletroforese e de espalhamento dinâmico de luz, juntamente com análise feita pelo programa PISA (Krissinel & Henrick, 2007) indicam que a conformação oligomérica da Crotoxina B é biologicamente significativa. Considerando-se que as duas isoformas são encontradas no veneno de um único animal, é possível que a formação do complexo CB1/CB2 ocorra após a dissociação do complexo Crotoxina na sinapse neural, ainda *in vivo*. Ainda, as regiões de N e C-terminais, *loop* de ligação de Ca²⁺ e *β-wing* relatadas como responsáveis pela atividade neurotóxica estão expostas à superfície do tetrâmero indicando que a estrutura oligomérica proposta para a Crotoxina B favorece o desencadeamento da atividade neurotóxica exercida por esta toxina. Esta associação das isoformas CB1 e CB2 provavelmente forma um complexo molecular que suporta ou mesmo maximiza sua principal atividade: a neurotoxicidade. O suposto aumento da atividade neurotóxica pode estar relacionado a uma provável diminuição da atividade catalítica. A redução da atividade catalítica é certamente afetada pelo deslocamento do *loop* de ligação de Ca²⁺ que ocorre nos monômeros A e D e, conseqüentemente, pela não coordenação do íon Ca²⁺.

Pela primeira vez duas Lys49-PLA₂ modificadas quimicamente pelo brometo de *p*-bromofenacila (BthTX-I-BPB e PrTX-I-BPB) foram cristalizadas e tiveram suas estruturas

cristalográficas determinadas. A elucidação estrutural da PrTX-I-BPB indicou a presença de duas moléculas de BPB, cada qual ligada covalentemente aos resíduos de histidina na posição 48 do dímero. Análises comparativas entre as estruturas da PrTX-I nativa e da PrTX-I-BPB demonstrou que a presença do BPB não resulta em diferenças estruturais significativas. No entanto, a região de C-terminal (resíduos 115 – 133), principalmente entre os resíduos 119 – 125 do monômero A, apresentou considerável diferença conformacional. Esta alteração posicional pode estar relacionada com a modificação suave que ocorre no *loop* de ligação de Ca^{2+} causada pela presença da molécula de BPB. A redução de atividades tóxicas (miotoxicidade, citotoxicidade e indução de edema) gerada pela modificação química da His48, pode ser atribuída à modificação citada acima, pois a região de C-terminal é referida como responsável por estas atividades. Análises estruturais e comparativas, como as aqui descritas, podem auxiliar na compreensão do mecanismo miotóxico desempenhado pelas Lys49-PLA₂s.

A BthTX-II é uma Asp49-PLA₂ básica que apresenta de quatro a seis vezes menos atividade catalítica quando comparada com a BthA-I, Asp49-PLA₂ ácida extraída do veneno da mesma espécie. O sítio catalítico formado pelos resíduos His48, Tyr52, Tyr73 e Asp99 está totalmente conservado embora esta proteína apresente reduzida atividade catalítica. O estudo comparativo da BthTX-II com outras fosfolipases A₂, tanto Asp49 como Lys49, foi fundamental para propor que a posição significativamente deslocada da região do *loop* de ligação do Ca^{2+} da BthTX-II impede a coordenação do íon Ca^{2+} e, conseqüentemente, interfere na ação catalítica desta proteína. No entanto, as atividades tóxicas como miotoxicidade e citotoxicidade conferidas as Lys49-PLA₂s também é comum a BthTX-II o que sugere que esta proteína seja uma PLA₂ intermediária entre as Lys49 e Asp49-PLA₂s.

O modelo cristalográfico da MjTX-I foi elucidado e, embora as etapas de modelagem e refinamento não estejam concluídas, podemos afirmar de que se trata de uma

estrutura tetramérica, inédita para as Lys49-PLA₂s. O programa PISA (Krissinel & Henrick, 2007) indicou que a formação oligomérica da MjTX-I não é estável em solução. Entretanto, a formação tetramérica observada em três conjuntos de dados obtidos de diferentes cristais pode ser um artefato de cristalização restrito a esta proteína.

6. REFERÊNCIAS*

AMBROSIO, A.L.B., NONATO, M.C., SOUZA, D.H.F., SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S., ARNI, R., WARD, R.J., OWNBY, C.L., GARRATT, R.C. A molecular mechanism for Lys49 phospholipase A₂ activity based on ligand-induced conformational change. **J. Biol. Chem.**, v.280, n.8, p.7326 – 7335, 2005

ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; ÂNGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Myotoxic phospholipases A₂ in *Bothrops* snake venoms: effects of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of Bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**, v.82, p.755-763, 2000.

ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M.; FULY, A.L.; CORRÊA, F.M.A.; ROSA, J.C.; GREENE, L.J.; GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochem. Pharmacol.**, v.64, p.723-732, 2002.

AIRD, S.D.; KAISER, I.I.; LEWIS, R.V.; KRUGGEL, W.G. Rattlesnake presynaptic neurotoxins: primary structure and evolutionary origin of the acid subunit. **Biochemistry**, v.24, p.7054-7058, 1985.

AIRD, S.D.; KAISER, I.I.; LEWIS, R.V.; KRUGGEL, W.G. A complete aminoacid sequence for the basic subunit of crotoxin. **Arch. Biochim. Biophys.**, v.249, p.296-300, 1986.

AIRD, S.D.; YATES III, J.R.; MARTINO, P.A.; SHABANOWITZ, J.; HUNT, D.F.; KAISER, I.I. The aminoacid sequence of the acidic subunit β-chain of crotoxin. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1040, p.217-224, 1990.

ARNDT, U.W.; WONACOTT A.J. **The rotation method in crystallography**. Amsterdam: North Holland Publishing Company, 1977. 275p.

ARNI, R.K.; WARD, R.J.; GUTIERREZ, J.M.; TULINSKY, A. Structure of a calcium-independent phospholipase-like myotoxic protein from *Bothrops asper*. **Acta Crystallogr. D**, v.51, p.311-317, 1995.

ARNI, R.K.; WARD, R.J. Phospholipase A₂ - a structural review. **Toxicon**, v.34, n.8, p.827-841, 1996.

de AZEVEDO JR., W.F.; WARD, R.J.; LOMBARDI, F.R.; GIGLIO, J.R.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M.; ARNI, R.K. Crystal structure of myotoxin-II: a myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Bothrops moojeni* venom. **Protein. Pept. Lett.**, v.4. p.329-334, 1997.

de AZEVEDO JR., W.F.; WARD, R.J.; GUTIÉRREZ, J.M.; ARNI, R.K. Structure of a Lys49-phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of *Bothrops nummifer* (Jumping Viper). **Toxicon**, v.37, p.371-384, 1999.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação - Referências - Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.
BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

- BABU, A.S.; GOWDA, T.V. Effects of chemical modification on enzymatic and toxicological properties of phospholipases A₂ from *Naja naja naja* and *Vipera russelli* snake venoms. **Toxicon**, v.29, p.1251–1262, 1991.
- BERGFORS, T. M. **Protein crystallization: techniques, strategies, and tips – a laboratory manual**. La Jolla: International University Line, 1999. 306p.
- BLUNDELL, T.L.; JOHNSON, L.N. **Protein crystallography**. London: Academic Press, 1976. 336p.
- BON, C. Multicomponent neurotoxic phospholipases A₂. In: KINI, R.M. (Ed.). **Venom phospholipase A₂ enzymes: structure, function and mechanism**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 1997. p. 269-285.
- BONFIM, V.L. **Caracterização bioquímica e biológica de duas isoformas de BthTX-II: Bj-IV e Bj-V (PLA₂) isoladas do veneno de *Bothrops jararacussu***. 2004. 62f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2004.
- BOTES, D.P.; VILJOEN, C.C. The amino acid sequence of three non-curaremimetic toxins from *Naja nicea* venom. **J. Biol. Chem.**, v.249, p.3827-3835, 1974.
- BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venoms proteins acting on homeostasis. **Biochimie**, v.82, p.851-859, 2000.
- BREITHAUPT, H.; RÜBSAMEN, K.; HABERMANN, E. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. **Eur. J. Biochem.**, v.49, p.333-345, 1974.
- BRÜNGER, A.T. The free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. **Nature**, v.355, p.472-474, 1992.
- BRÜNGER, A. T.; ADAMS, P. D.; CLORE, G. M.; DELANO, W. L.; GROS, P.; GROSSE-KUNSTLEVE, R. W.; JIANG, J. S.; KUSZEWSKI, J.; NILGES, M.; PANNU, N. S.; READ, R. J.; RICE, L. M.; SIMONSON, T.; WARREN, G. L. Crystallography & NMR System (CNS): A new software system for macromolecular structure determination. **Acta Crystallogr. D**, v.54, p.905-921, 1998.
- BURLEY, S.K. Dynamic light scattering in evaluating crystallizability of macromolecules. **Methods Enzymol.**, v.276, p.57-68, 1997.
- CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. **The venomous reptiles of Latin America**. New York: Cornell University, 1989. 425p.
- CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S; HADDAD JR., V. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003. 468p.
- CARDOSO, R.M.F. **Estudos estruturais de enzimas antioxidantes relacionadas à doença de Lou Gehrig e à esquistossomose**. 2002. 178f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

CARREDANO, E.; WESTERLUND, B.; PERSSON, B.; SAARINEN, M.; RAMASWAMY, S.; EAKER, D.; EKLUND, H. The three-dimensional structures of two toxins from snake venom throw light on the anticoagulant and neurotoxic sites of phospholipase A₂. **Toxicon**, v.36, p.75-92, 1998.

COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, Number 4. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. **Acta Crystallogr. D**, v.50, p.760–763, 1994.

CHANDRA, V.; JAYANSAKAR, J.; KAUR, P.; BETZEL, C.; SRINIVASAN, A.; SINGH, T. P. First structural evidence of a specific inhibition of phospholipase A₂ by α -tocopherol (vitamin E) and its implications in inflammation: crystal structure of the complex formed between phospholipase A₂ and α -tocopherol at 1.8Å resolution. **J. Mol. Biol.**, v.320, p.215-222, 2002.

CHIOATO, L.; de OLIVEIRA, A.H.C.; RULLER, R.; Sá, J.M.; WARD, R.J. Distinct sites for myotoxic and membrane-damaging activities in the C-terminal region of a Lys49-phospholipase A₂. **Biochem. J.**, v.366, p. 971-976, 2002.

CHIOATO, L.; WARD, R.J. Mapping structural determinants of biological activities in snake venom phospholipases A₂ by sequence analysis and site directed mutagenesis. **Toxicon**, v.42, p.869-883, 2003.

CHIOATO, L.; ARAGÃO, E.A.; FERREIRA, T.L.; MEDEIROS, A.I.; FACCIOLI, L.H.; WARD, R.J. Mapping of the structural determinants of artificial and biological membrane damaging activities of a Lys49 phospholipase A₂ by scanning alanine mutagenesis. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1768, p.1247-1257, 2007.

CINTRA, A.C.O.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J.R. Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function. **J. Protein Chem.**, v.12, p.57-6464, 1993.

CORRÊA, L.C. Estudos estruturais com a BthTX-II, uma Asp49-Fosfolipase A₂ miotóxica e com baixa atividade catalítica do veneno de *Bothrops jararacussu*. 2007. 71f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 2007.

CORRÊA, L.C.; MARCHI-SALVADOR, D.P.; CINTRA, A.O.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M. Preliminary X-ray crystallographic studies of BthTX-II, a myotoxic Asp49-phospholipase A₂ with low catalytic activity from *Bothrops jararacussu* venom. **Acta Crystallogr. F**, v.62, n.7, p.765-767, 2006.

CORRÊA, L.C.; MARCHI-SALVADOR, D.P.; CINTRA, A.O.; SAMPAIO, S.V.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M. Crystal structure of a myotoxic Asp49-phospholipase A₂ with low catalytic activity: insights into Ca²⁺ independent catalytic mechanism. **Biochim. Biophys. Acta**, 2008 – DOI:[10.1016/j.bbapap.2008.01.007](https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.01.007).

DELANO, W.S. **The PyMOL molecular graphics system**. San Carlos: Delano Scientific, 2002. Disponível em <<http://www.pymol.org>>. Acesso em: 26/11/2007.

DEMARET, J.P.; BRUNIE, S. Molecular dynamics simulations of phospholipase A₂. **Prot. Engng.**, v.4, p.163-170, 1990.

DENNIS, E.A. Diversity of group types, regulation and function of phospholipase A₂. **J. Biol. Chem.**, v.269, p.13057-13060, 1994.

DÍAZ, C.; GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B.; NÚÑEZ, J. *p*-Bromophenacyl bromide modification of *Bothrops asper* myotoxin II, a lysine-49 phospholipase A₂, affects its pharmacological activities. **Toxicon**, v.31, p.1202–1206, 1993.

DÍAZ, C.; ALAPE, A.; LOMONTE, B.; OLAMENDI, T.; GUTIÉRREZ, J.M. Cleavage of the NH₂-terminal octapeptide of *Bothrops asper* myotoxic lysine-49 phospholipase A₂, reduces its membrane-destabilizing effect. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 312, p. 336-339, 1994.

DÍAZ-OREIRO, C.; GUTIÉRREZ, J.M. Chemical modification of histidine and lysine residues of myotoxic phospholipases A₂ isolated from *Bothrops asper* and *Bothrops godmani* snake venoms: effects on enzymatic and pharmacological properties. **Toxicon**, v.35; n.2, p.241-252, 1997.

DRENTH, J. **Principles of protein X-ray crystallography**. New York: Springer-Verlag, 1994. 311p.

DUCRUIX, A.; GIEGÉ, R. **Crystallization of nucleic acids and proteins: A practical approach**. New York: Oxford University Press, 1992. 331p.

DUFTON, M.J.; HIDER, R.C. Classification of phospholipases A₂ according to sequence evolutionary and pharmacological implications. **Eur. J. Biochem.**, v.137, p.545-551, 1983.

EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallogr. D**, v.60, p.2126-2132, 2004.

EVANS, H.J.; KINI, R.M. Effects of phospholipase A₂ enzymes on platelet aggregation. In: KINI, R.M. (Ed.). **Venom phospholipase A₂ enzymes: structure, function and mechanism**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 1997. p.1-28.

FAURE, G.; BON, C. Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v.25, p.229-234, 1987

FAURE, G.; BON, C. Crotoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*: purification, of several isoforms and comparison of their molecular structure and of their biological activities. **Biochemistry**, v.27, p.730-738, 1988.

FAURE, G.; CHOUMET, V.; BOUCHIER, C.; CAMOIN, L.; GUILAUME, J.L.; MONEGIER, B.; VUILHORGNE, M.; BON, C. The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Eur. J. Biochem.**, v.223, p.161-164, 1994.

FAURE, G.; VILLELA, C.; PERALES, J.; BON, C. Interaction of the neurotoxic and nontoxic secretory phospholipases A₂ with the crotoxin inhibitor from *Crotalus* serum. **Eur. J. Biochem.**, v.267, p.4799-4808, 2000.

- FONTES, M.R.M.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; MONTEIRO, L.H.; da SILVA, R.J.; GIGLIO, J.R. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of BnSP-6, a myotoxic phospholipase A₂ from *Bothrops neuwiedi* venom. **Protein Pept. Lett.**, v.7, n.6, p.421-425, 2000.
- FRAENKEL-CONRAT, H.; JENG, T.W.; HSIANG, M. Biological activities of crotoxin and amino acid sequence of crotoxin B. In EAKER, D.; WADSTRÖM, T. (Ed.). **Natural toxins**. Oxford: Pergamon Press, 1980. p.561-567.
- FREMONT, D. H.; Anderson, D.H.; Wilson, I.A.; Dennis, E.A.; Xuong, N.H. Crystal structure of phospholipase A₂ from indian cobra reveals a trimeric association. **Proc. natn. Acad. Sci.**, v.90, p.342-346, 1993.
- FRANCIS, B.; GUTIERREZ, J.M.; LOMONTE, B.; KAISER, I.I. Myotoxin II from *Bothrops asper* (Terciopelo) venom in a lysine-49 phospholipase A₂. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.284, p.352-359, 1991.
- FULY, A.L.; CALIL-ELIAS, S.; ZINGALI, R.B.; GUIMARÃES, J.A.; MELO, P.A. Myotoxic activity of an acidic phospholipase A₂ isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) snake venom. **Toxicon**, v.38, n.7; p.961-972, 2000.
- FURTADO, M.F.D. **Contribuição ao estudo do veneno de *Bothrops moojeni* (HOGE, 1965) [Serpentes, Viperidae, Crotalinae] em função da idade das serpentes**. 1987. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1987.
- GIACOVAZZO, C. **Fundamentals of crystallography**. Oxford: Oxford Science Publishers, 1992. 654p.
- GREEN, A.A. The solubility of hemoglobin in solutions of chlorides and sulphates of varying concentration. **J. Biol. Chem.**, v.95, p.47-66, 1932.
- GUTIERREZ, J. M; LOMONTE, B. Review article. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, p. 1405-1424, 1995.
- GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: KINI, R.M. (Ed). **Venom phospholipase A₂ enzymes: structure, function and mechanism**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 1997. p.321-352.
- HABERMANN, E.; BREITHAUPT, H. Mini-review. The crotoxin complex – an example of biochemical and pharmacological protein complementation. **Toxicon**, v.16, p.19–30, 1978.
- HEINRIKSON, R.L.; KRUEGER, E.T.; KEIM, P.S. Amino acid sequence of phospholipase A₂-alpha from the venom of *Crotalus adamanteus*. A new classification of phospholipases A₂ based upon structural determinants. **J. Biol. Chem.**, v.252, p.4913-4921, 1977.
- HENDON, R.A.; FRAENKEL-CONRAT, H. Biological roles of the two components of crotoxin. **Proc. Natl Acad. Sci.**, v.68, p.1560-1563, 1971
- HOGE, A.R. Preliminary account on neotropical Crotalinae (serpentes-Viperidae). **Mem. Inst. Butantan**, v.32, p.109-184, 1965.

- HOLLAND, D.R.; CLANCY, L.L.; MUCHMORE, S.W.; RYDEL, T.J.; EINSPAHR, H.M.; FINZEL, B.C.; HEINRICKSON, R.L.; WATENPAUGH, K.D. The crystal structure of a lysine 49 phospholipase A₂ from the venom of the cottonmouth snake at 2.0Å. **J. Biol. Chem.**, v.266, p.17649-17656, 1990.
- HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; QUEIROZ, L.S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; GIGLIO, J.R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, v.26, p.615-627, 1988.
- JABBEN, T.; SHARMA, S.; SINGH, N.; SINGH, R.K.; KAUR, P.; PERBANDT, M.; BETZEL, Ch.; SRINIVASAN, A.; SINGH, T.P. Crystal structure of a calcium-induced dimer of two isoforms of cobra phospholipase A₂ at 1.6 Å resolution. **Proteins: Struct. Funct. Bioinform.**, v.59, p.856-863, 2005.
- JANCARICK, J.; KIM, S.H. Sparse matrix sampling – a screening method for crystallization of proteins. **J. Appl. Crystallogr.**, v.24, p.409-411, 1991.
- JOUBERT, F.J.; TOWNSHEND, C.S.; BOTES, D.P. Purification, some properties of two phospholipases A₂ (CM-I and CM-II) and the amino acid sequence of CM-II from *Bitis nasicornis* (honed adder venom). **Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.**, v.364, p.1717-1726, 1983.
- JONES, T.A.; BERGDOLL, M.; KJELDGAARD, M. Crystallographic and modeling methods in molecular design. In: BUGG, C.E., EALICK, S.E. (Eds.). **O: a macromolecule modeling environment**. New York: Springer-Verlag, 1990. p.189-195.
- KASHIMA, S.; ROBERTO, P.G.; SOARES, A.M.; ASTOLFI-FILHO, S.; PEREIRA, J.O.; GIULIATI, S.; FARIA, M.Jr.; XAVIER, M.A.; FONTES, M.R.M.; GIGLIO, J.R.; FRANÇA, S.C. Analysis of *Bothrops jararacussu* venomous gland transcriptome focusing on structural and functional aspects: I--gene expression profile of highly expressed phospholipases A₂. **Biochimie**, v.86, n.3, p.211-219, 2004.
- KINI, R.M.; EVANS, H.J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipase A₂. **Toxicon**, v.27, p.613-635, 1989.
- KINI, R.M.; IWANAGA, S. Structure-function relationships of phospholipases I: prediction of presynaptic neurotoxicity. **Toxicon**, v.24, p.895-905, 1986.
- KINI, R.M. Phospholipase A₂: a complex multifunctional protein puzzle. In: KINI, R.M. (Ed.). **Venom phospholipase A₂ enzymes: structure, function and mechanism**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 1997. p.1-28.
- KINI, R.M.; CHAN, Y.M. Accelerated evolution and molecular surface of venom phospholipase A₂ enzymes. **J. Mol. Evol.**, v.48 p.125-132, 1999.
- KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**, v.42, p.827-840, 2003.

KLEYWEGT, G.J.; JONES, T.A. Model-building and refinement practice. **Methods Enzymol.**, v.277, p.208-230, 1997.

KLEYWEGT, G.J. Validation of Protein Crystal Structures. **Acta Crystallogr. D**, v.56, p.249-265, 2000.

KOBE, B.; GLEICHMANN, T.; TEH, T.; HEIERHORST, J.; KEMP, B.E. Crystallization of protein kinases and phosphatases. In: HARDIE D.G. (Ed). **Protein phosphorylation: a practical approach**. 2nd Ed. Oxford: Oxford University Press. 1999. p.127- 151.

KRISSINEL, E.; HENRICK, K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. **J. Mol. Biol.**, v.372, p.774-797, 2007.

KRIZÁJ, I.; TURK, D.; RITONJA, A.; GUBENSĚK, F. Primary structure of ammodytotoxin C further reveals the toxic site of ammodytotoxin. **Biochim Biophys Acta**, v.999, p.198-202, 1989.

KUBINYI, H. Structure-based design of enzyme inhibitors and receptor ligands. **Curr. Opin. Drug Discov. Devel.**, v.1, p.4-15, 1998.

KUDO, I.; MURAKAMI, M. Phospholipase A₂ enzymes. **Prostag. Lipid Mediators**, n. 68-69, pp.3-58, 2002.

KUNTZ, I.D. Structure-based strategies for drug design and discovery. **Science**, v.257, p.1078-1082, 1992.

LAEMMLI U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** v.227, p.680-685, 1970.

LASKOWSKI, R.A.; MACARTHUR, M.W.; MOSS, D.S.; THORNTON, J.M. Procheck: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **J. Appl. Crystallogr**, v.26, p.283-91, 1993.

LEE, W.H.; da SILVA-GIOTTO, M.T.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M.H.; POLIKARPOV, I.; GARRAT, R.C. Structural basis for low catalytic activity in Lys49-phospholipase A₂ – a hypothesis: the crystal structure of Piratoxin II complexed to fatty acid. **Biochemistry**, v.40, p.28-36, 2001.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Principles of biochemistry**. 2nd Ed. New York: Worth Publishers, 1993. 725p.

LIU, S.Y.; YOSHIZUMI, K.; ODA, N.; OHNO, M.; TOKUNAGA, F.; IWANAGA, S.; KIHARA, H. Purification and amino acid sequence of basic protein II, a lysine-49-phospholipase A₂ with low activity, from *Trimeresurus flavoviridis* venom. **J. Biochem.**, v.107, p.400-408, 1990.

LOMONTE, B.; CARMONA, E. Individual expression patterns of myotoxin isoforms in the venom of the snake *Bothrops asper*. **Comp. Biochem. Physiol. B**, v.102, p.325-329, 1992.

LOMONTE, B.; MORENO, E.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L.A.; MACCARAMA, M. Neutralizing interaction between heparin and myotoxin II, a Lys49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. **J. Biol. Chem.**, v.269, p.29867-29873, 1994.

LOMONTE, B.; PIZARRO-CERDÁ, J.; ÂNGULO, Y.; GORVEL, J.P.; MORENO, E. Expression of myotoxicity and enhanced membrane-damaging activity by Tyr Trp-substituted peptide 115-129 of myotoxin II, a Lys49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1461, p.19-26, 1999.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; SANTAMARIA C. Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115–129 in Lys49 myotoxic phospholipases A₂ from snake venoms. **Toxicon**, v.42, p.307-312, 2003a.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERÓN, L. An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v.42, p.885-901, 2003b.

MAGRO, A.J.; SOARES, A.M.; GIGLIO, O.J.R.; FONTES, M.R.M. Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A₂: quaternary structure and inhibition mechanism insights. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.311, p.713-720, 2003.

MAGRO, A.J.; MURAKAMI, M.T.; MARCUSSI, S.; SOARES, A.M.; ARNI, R.K.; FONTES, M.R.M. Crystal structure of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A₂ in the monomeric and dimeric states: insights into its oligomeric state. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.323, p.24-31, 2004.

MAGRO, A.J.; TAKEDA, A.A.S.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M. Crystal structure of BthA-I complexed with *p*-bromophenacyl bromide: possible correlations with lack of pharmacological activities. **Acta Crystallogr. D**, v.61, p.1670-1677, 2005.

MANCUSO, L.C.; CORREA, M.M.; VIEIRA, C.A.; CUNHA, O.A.B.; LACHT, J.J.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; OWNBY, C.; GIGLIO, J.R. Fractionation of *Bothrops pirajai* snake venom: isolation and characterization of Piratoxin-I, a new myotoxic protein. **Toxicon**, v.33, p.615-626, 1995.

MARCHI-SALVADOR, D.P. **Estudos estruturais com miotoxinas Lys49-PLA₂s nativas e complexadas com vitamina E**. 2005. 127f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 2005.

MARCHI-SALVADOR, D.P.; SILVEIRA, L.B.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of myotoxin I, a Lys49-phospholipase A₂ from *Bothrops moojeni*. **Acta Crystallogr. F**, v.61, n.10, p.873-875, 2005.

MARCHI-SALVADOR, D.P.; FERNANDES, C.A.H.; AMUI, S.F.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a myotoxic Lys49-PLA₂ complexed with *p*-bromophenacyl bromide. **Acta Crystallogr. F**, v.62, n.6, p.600-603, 2006.

MARCHI-SALVADOR, D.P.; CORREA, L.C.; SALVADOR, G.H.M.; MAGRO, A.J.; OLIVEIRA, C.Z.; IULEK, J.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M. Preliminary X-ray crystallographic studies of a tetrameric phospholipase A₂ formed by two isoforms of crotoxin B from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Acta Crystallogr. F**, v.63, p.1067-1069, 2007.

MARCHI-SALVADOR, D.P.; CORREA, L.C.; MAGRO, A.J.; OLIVEIRA, C.Z. SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M. Insights into the role of oligomeric state on the biological activities of Crotoxin: crystal structure of a tetrameric phospholipase A₂ formed by two isoforms of Crotoxin B from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Proteins**, 2008a – DOI: [10.1002/prot.21980](https://doi.org/10.1002/prot.21980).

MARCHI-SALVADOR, D.P.; CORREA, L.C.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M. Crystal structure of the first myotoxic Lys49-phospholipase A₂ from *Bothrops pirajai* venom chemically modified by *p*-bromophenacyl bromide. 2008b – em fase final de redação.

MARCUSSI, S.; SANTANA, C.D.; OLIVEIRA, C.Z.; RUEDA A.Q.; MENALDO D.L.; BELEBONI, R.; STÁBELI, R.G.; GIGLIO, J.R.; FONTES, M.R.M.; SOARES, A.M. Snake Venom Phospholipase A₂ Inhibitors: Medicinal Chemistry and Therapeutic Potential. REVIEW. **Curr. Top. Med. Chem.**, v.7, p.743-756, 2007.

MATTHEWS, B.W. Solvent content of protein crystals. **J. Mol. Biol.**, v.33, p.491-497, 1968.

McPHERSON, A. **Crystallization of biological macromolecules**. Malabar: Krieger Publishing Company, 1989. 371p.

McREE, D.E. **Practical protein crystallography**. San Diego: Academic Press, 1993. 477p.

MELGAREJO, A. R. **Serpentes peçonhentas: principais grupos, identificação, veneno, acidentes e primeiros socorros**. Disponível em <<http://www.ivb.rj.gov.br/palestras/roteiro.doc>> Acesso em 12 dez. 2007

MIYAKE, T.; INOUE, S.; IKEDA, K.; TESHIMA, K.; SAMEJIMA, Y.; OMORI-SATOH T. pH dependence of the reaction rate of His48 with *p*-bromophenacyl bromide and of the binding constant to Ca²⁺ of the monomeric forms of intact and alpha- NH₂ modified phospholipases A₂ from *Trimeresurus flavoviridis*. **J. Biochem.**, (Tokyo), v.105, p.565–572, 1989.

MONTEIRO, R.Q; DUTRA, D.L.; MACHADO, O.L.; CARLINI, C.R.; GUIMARÃES, J.A.; BON, C; ZINGALI, R.B. *Bothrops jararaca* snakes produce several bothrojaracin isoforms following an individual pattern. **Comp. Biochem Physiol.**, v.120, n.4, p.791-798, 1998.

MOOLENAAR, W.H.; KRANENBURG, O.; POSTMA, F.R.; ZONDAG, G.C.M. Lysophosphatidic acid: G protein signaling and cellular responses. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v.9, p.168-173, 1997.

MOREIRA, L.A.; ITO, J.; GHOSH, A.; DEVENPORT, M.; ZIELER, H.; ABRAHAM, E.G.; CRISANTI, A.; NOLAN, T.; CATTERUCCIA, F.; JACOBS-LORENA, M. Bee venom phospholipase inhibits malaria parasite development in transgenic mosquitoes. **J. Biol. Chem.**, v.277, n.43, p.40839-40843, 2002.

MUKHERJEE, A.B.; MIELE, L.; PATTABIRAMAN, N. Phospholipase A₂ enzymes: regulation and physiological role. **Biochem. Pharmacol.**, v.48, p.1-10, 1994.

MURAKAMI, M.T.; ARRUDA, E.Z.; MELO, P.A.; MARTINEZ, A.B; CALIL-ELIÁS, S.; TOMAZ, M.A.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; ARNI, R.K. Inhibition of myotoxic activity of *Bothrops asper* Myotoxin II by the anti-trypanosomal drug Suramin. **J. Mol. Biol.**, v.350, p.416-426, 2005.

MURSHUDOV, G.N.; VAGIN, A.; DODSON, E. Application of Maximum Likelihood Refinement. In: The Refinement of Protein structures, Proceedings of Daresbury Study Weekend. 1996. Disponível em <<http://www.ccp4.ac.uk/html/REFERENCES.html>>. Acesso em: 01/12/2007

MURSHUDOV, G.N.; VAGIN, A.; DODSON, E. Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method. **Acta. Crystallogr. D**, v.53, p.240-255, 1997.

NAKASHIMA, K.I.; NOBUHISA, I.; DESHIMARU, M.; NAKAI M.; OGAWA, T.; SHIMOHIGASHI, Y.; FUKUMAKI, Y.; HATTORI, M.; SAKAKI, Y.; HATTORI, S.; OHNO, M. Accelerated evolution in the protein-coding regions is universal in Crotalinae snake venom gland phospholipase A₂ isozyme genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.92, p.5605-5609, 1995.

NAVAZA, J. AMoRe: An Automated Package for Molecular Replacement. **Acta. Crystallogr. A**, v.50, p.157-163, 1994.

NICHOLAS, K.B.; NICHOLAS, H.B.Jr; DEERFIELD, D.W.II. GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. **Embnet.News** v.4, p.1-4, 1997.

OGAWA, T.; NAKASHIMA, K.; NOBUHISA, I.; DESHIMARU, M.; SHIMOHIGASHI, Y.; FUKUMAKI, Y.; SAKAKI, Y.; HATTORI, S.; OHNO, M. Accelerated evolution of snake venom phospholipase A₂ isozymes for acquisition of diverse physiological functions. **Toxicon**, v.34, p.1229-1236, 1996.

OHNO, M.; CHIJIWA, T.; ODA-UEDA, N.; OGAWA, T.; HATTORI, S. Molecular evolution of myotoxic phospholipases A₂ from snake venom. **Toxicon**, v. 42. pp.841-854, 2003.

OTWINOWSKI, Z.; MINOR, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. **Methods Enzymol.**, v.276, p.307-326, 1997.

OWNBY, C.L.H.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, S.; WHITE, S.P.; FLEETHER, J.E. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. **Toxicon**, v.37, p.411-445, 1999.

PERALES, J.; VILLELA, C.; DOMONT, G.B.; CHOUMET, V.; SALIOU, B.; MOUSSATCHÉ, H.; BON, C.; FAURE, G. Molecular structure and mechanism of action of the crotoxin inhibitor from *Crotalus durissus terrificus* serum. **Eur. J. Biochem.**, v. 227, p.19-26, 1995.

PEREIRA, M.F.; NOVELLO, J.C.; CINTRA, A.C.O.; GIGLIO, J.R.; LANDUCCI, E.T.; OLIVEIRA, B.; MARANGONI, S. The amino acid sequence of Bothropstoxin-II, an Asp-49

myotoxin from *Bothrops jararacussu* (Jararacuçu) venom with low Phospholipase A₂ activity. **J. Protein Chem.**, v.17, n.4, p.381-386, 1998.

PETERS, A.R.; DEKKER, N.; BERG, L.V.D.; BOELEN, R.; KAPTEIN, R.; SLOTBOOM, A.; de HAAS, G.H. Conformational changes in phospholipase A₂ upon binding to micellar interfaces in the absence and presence of competitive inhibitors. A ¹H and ¹⁵N NMR study. **Biochemistry**, v.31, p.10024-10030, 1992.

POTTERTON, E.; BRIGGS, P.; TURKENBURG, M.; DODSON, E. A graphical user interface to the CCP4 program suite. **Acta Crystallogr. D**, v.59, p.1131-1137, 2003.

RAGE, J.C. Origin and Evolution of snakes. In: BAUCHOT R.(Ed.). **Snakes, a natural history**. New York: Sterling Publishing Co., Inc., 1994. p.26-33.

RENETSEDER, R.; BRUNIE, S.; DIJKSTRA, B.W.; DRENTH, J.; SIGLER, P.B. A comparison of the crystal structures of phospholipases A₂ from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. **J. Biol. Chem.**, v.260, p.11627-11636, 1985.

RENETSEDER, R.; DIJKSTRA, B.W.; HUIZUNGA, K.H.; KALK, K.H.; DRENTH, J. Crystal structure of bovine pancreatic phospholipase A₂ covalently inhibited by *p*-bromophenacyl-bromide **J. Mol. Biol.**, v.200, p.181-188, 1988.

RIGDEN, D.J.; HWA, L.W.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M.H.; POLIKKARPOV, I. The structure of the D49 phospholipase A₂ Piratoxin III from *Bothrops pirajai* reveals unprecedented structural displacement of the calcium-binding loop: possible relationship to cooperative substrate binding. **Acta Crystallogr. D**, v.59, p.255-262, 2003.

ROBERTS, M.F.; DEEMS, R.A.; MINCEY, T.C.; DENNIS, E.A. Chemical modification of the histidine residue in phospholipase A₂ (*Naja naja naja*). A case of half-site reactivity. **J. Biol. Chem.**, v.252, p.2405-2411, 1977.

ROSENBERG, P. Phospholipases. In: SHIER, W.T.; MEBS, D. (Eds.). **Handbook of toxinology**. New York: Marcel Dekker, 1990. p.67-277.

ROUAULT, M.; RASH, L.D.; ESCOUBAS, P.; BOILARD, E.; BOLLINGER, J.; LOMONTE, B.; MAURIN, T.; GUILLAUME, C.; CANAAN, S.; DEREGNAUCOURT, C.; SCHRÉVEL, J.; DOGLIO, A.; GUTIÉRREZ, J.M.; LAZDUNSKI, M.; GELB, M.H.; KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I.B.; NEI, M. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. **Bioinformatics**, v.17, p.1244-1245, 2001.

SÁ, J.M.; CHIOATO, L.; FERREIRA, T.L.; OLIVEIRA, A.H.C.; RULLER, R.; ROSA, R.C.; GRERRNE, L.J.; WARD, R.J. Topology of the substrate-binding site of a Lys49-phospholipase A₂ influences Ca²⁺-independent membrane-damaging activity. **Biochem. J.**, v.382, p.191-198, 2004.

dos SANTOS, J.I.; TAKEDA, A.A.S.; MARCHI-SALVADOR, D.P.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of two myotoxic Lys49-phospholipases A₂ complexed with alpha-tocopherol. **Protein Pept. Lett.**, v.12, n.8, p.819-822, 2005.

dos SANTOS, J.I.; MARCHI-SALVADOR, D.P. ; FERNANDES, C.A.H; SILVEIRA, L.B.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M. Preliminary X-ray crystallographic studies of a Lys49-phospholipase A₂ homologue from *Bothrops pirajai* venom complexed with *p*-bromophenacyl bromide and alpha-tocopherol inhibitors. **Protein Pept. Lett.**, v.14, p.698-701, 2007.

SCHALOSKE, R.H. & DENNIS E.A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1761, p.1246–1259, 2006.

SCOPES R.K. **Purification, principles and practice**. New York: Springer-Verlag, 1994. 380p.

SCOTT, D.L.; WHITE, S.P.; OTWINOWSKI, Z.; YUAN, W.; GELB, M.H.; SINGLER, P.B. Interfacial catalysis the mechanism of phospholipase A₂. **Science**, v.250, p.1541-1546, 1990.

SCOTT, D.L. Phospholipase A₂: structure and catalytic properties. In: Kini, R.M. (Ed.) **Venom phospholipase A₂ enzymes: structure, function and mechanism**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.; 1997. p 321-352.

SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; SOUZA, D.H.F. **Métodos em toxinologia: toxinas de serpentes**. São Carlos: EdUFCar, 2007. 258p.

SERRANO, S.M.T.; REICHL, A.P.; MENTELE, R.; AUERSWALD, E.A.; SANTORO, M.L.; SAMPAIO, C.A.M.; CAMARGO, A.C.M.; ASSAKURA, M.T. A novel phospholipase A₂, BJ-PLA₂, from the venom of the snake *Bothrops jararaca*: purification, primary structure analysis, and its characterization as a platelet-aggregation-inhibiting factor. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.367, p.26–32, 1999.

SIDDIQI, A.R.; SHAFQAT, J.; ZAIDI, Z.H.; JORNVALL, H. Characterization of a phospholipase A₂ from the venom of Horned viper (*Cerastes cerastes*). **Febs Lett.**, v.278, p.14-16, 1991.

da SILVA-GIOTTO, M.T.; GARRAT, R.C.; OLIVA, G.; MASCARENHAS, Y.P.; GIGLIO, J.R.; CINTRA, A.C.O.; de AZEVEDO JR., W.F.; ARNI, R.K.; WARD, R.J. Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: conformational changes in Bothropstoxin I, a dimeric Lys49-phospholipase A₂ homologue. **Proteins**, v.30, p.442-454, 1998.

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

SLOTTA, K.H.; FRAENKEL-CONRAT, H. Biological role of the two components of crotoxin **Ber. Dtsch. Chem. Ges.**, v.71, p.1076–1081, 1938.

SOARES, A.M. **Caracterização bioquímica parcial das miotoxinas básicas do veneno de *Bothrops moojeni*: seqüência aminoterminal, cristalográfica e estudo da transição dos estados nativo e desnovelado**. 1997. 91f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1997.

SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; TOYAMA, M.H.; LOMBARDI, F.R.; ARNI, R.K.; GIGLIO, J.R. A rapid procedure for the isolation of the Lys-49 myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. **Toxicon**, v.36, p.503-514, 1998.

SOARES, A.M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; ÂNGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M.H.; ARNI, R.K.; GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of Miotoxin I, a Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops moojeni* (Caissaca) snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.373, n.1, p. 7-15, 2000a.

SOARES, A.M.; GUERRA-SÁ, R.; BORJA-OLIVEIRA, C.R.; RODRIGUES, V.M.; SIMIONI-RODRIGUES, L.; RODRIGUES, V.; FONTES, M.R.M.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.378, n.2, p. 201-209, 2000b.

SOARES, A.M.; MANCIN, A.C.; CECCHINI, A.L.; ARANTES, E.C.; FRANÇA, S.C.; GUTIERREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Effects of chemical modifications of crotoxin B, the phospholipase A₂ subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on its enzymatic and pharmacological activities. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.33, p.877–888, 2001a.

SOARES, A.M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; BORTOLETO, R.K.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; ARNI, R.K.; WARD, R.J.; GUTIERREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Dissociation of enzymatic and pharmacological properties of Piratoxins-I and -III, two myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops pirajai* snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.387, n.2, p. 188-196, 2001b.

SOARES, A.M.; OSHIMA-FRANCO, Y.; VIEIRA, C.A.; LEITE, G.B.; FLETCHER, J.E.; JIANG, M.S.; CINTRA, A.C.O.; GIGLIO, J.R.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Mn²⁺ ions reduce the enzymatic and pharmacological activities of bothropstoxin-I, a myotoxic Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 34, p. 668–677, 2002.

SOARES, A.M.; GIGLIO, J.R. Chemical modifications of Phospholipases A₂ from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. **Toxicon**, v.42, p.855-868, 2003.

SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M.; GIGLIO, J. R. Phospholipase A₂ Myotoxins from *Bothrops* Snake Venoms: Structure-Function Relationship. **Curr. Org. Chem.**, v.8, n.17, p.1677-1690, 2004a.

SOARES, A.M.; SESTITO, W.P.; MARCUSSI, S.; STÁBELI, R.G.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; CUNHA, O.A.B.; VIEIRA, C.A.; GIGLIO, J.R. Alkylation of myotoxic phospholipases A₂ in *Bothrops moojeni* venom: a promising approach to an enhanced antivenom production. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.36, p.258-270, 2004b.

SOUZA, D.H.F.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; GARRATT, R.C. Determination of the tree-dimensional structure of toxins by protein crystallography. **Toxicon**, v.38, p.1307-1353, 2000.

TAKEDA, A.A.S. SANTOS, J.I. dos; MARCUSSI, S.; SILVEIRA, L.B.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of an acidic phospholipase A₂ complexed with *p*-bromophenacyl bromide and α -tocopherol inhibitors at 1.9Å and 1.45Å resolution. **Biochim. Biophys Acta**, v.1699, p.281–284, 2004.

TAKEDA, A.A.S. SANTOS, J.I. dos; MARCHI-SALVADOR, D.P.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of a myotoxic Lys49-phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* venom complexed with α -tocopherol inhibitor. **The open crystallographic Journal**, v.1, p.6–9, 2008.

TOYAMA, M.H.; SOARES, A.M.; VIEIRA, C.A.; NOVELLO, J.C; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J.R.; MARANGONI, S. Amino acid sequence of piratoxin-I, a myotoxin from *Bothrops pirajai* snake venom and its biological activity after alkylation with *p*-bromophenacyl bromide. **J. Protein Chem.**, v.17, p.713–718, 1998.

TSAI, I.-H.; LIU, H.C.; CHANG, T. Toxicity domain in presynaptically toxic phospholipase A₂ of snake venom. **Biochem. biophys. Acta**, v.916, p.94-99, 1987.

TANG, L.; ZHOU, Y.C.; LIN, Z.J. Structure of agkistrodotoxin in an orthorhombic crystal form with six molecules per asymmetric unit. **Acta Crystallogr. D**, v.55, p.1986-1996, 1999.

UHL, W.; NEVALAINEN, T.J.; BUCHLER, M.W. **Phospholipase A₂ basic and clinical aspects in inflammatory diseases**. Karger: Switzerland, 1997. v.24, 250p.

USHA, R.; JOHNSON, J.; MORAS, D.; THIERRY, J.; FOURME, R.; KAHN, R. Macromolecular crystallography with synchrotron radiation: collection and processing of data from crystals with a very large unit cell. **J. Appl. Cryst.**, v.17, p.147-153, 1984.

VALENTIN, E.; LAMBEAU, G. What can venom phospholipase A₂ tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipase A₂? **Biochimie**, v.82, p.815-831, 2000.

VALIENTE, C.; MORENO, E.; SITTENFELD, A.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M. An electrophoretic study on phospholipase A₂ isoenzymes in the venoms of Central American Crotalinae snakes. **Toxicon**, v.30, p.815-823, 1992.

VERLINDE, C.L.M.J.; HOL, W.G.J. Structure-based drug design: process, seats and challenges. **Structure**, v.2, p.577-587, 1994.

VITAL-BRAZIL, O.; EXCELL, B.J. Action of crotoxin and crotoactin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) on the frog neuromuscular junction. **J. Physiol. (Lond)**, v.212, p.34-35, 1971.

VOLWERK, J.J.; PIETERSON, W.A.; de HAAS, G.H. Histidine at the active site of phospholipase A₂. **Biochemistry**, v.13, p.1446–1454, 1974.

WALLACE, A.C.; LASKOWSKI, R.A.; THORNTON, J.M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **Protein Eng.**, n.8, p.127-134, 1995.

WAITE, M. The phospholipases. In: WAITE, M (Ed) **Handbook of lipid research**. New York: Plenum Press, 1997. p.155-241.

WARD, R.J.; NONESE, N.; ARNI, R.K.; LARSON, R.E.; PAÇO-LARSON, M.L. Sequence of a cDNA encoding bothropstoxin I, a myotoxin from the venom of *Bothrops jararacussu*. **Gene**, v.156, p. 305-306, 1995.

WARD, R.J.; de AZEVEDO JR., W.F.; ARNI R.K. At the interface: crystal structures of phospholipases A₂. **Toxicon**, v.36, p.1623-1633, 1998.

WARD, R.J.; CHIOATO, L.; de OLIVEIRA, A.H.C.; RULLER, R.; SÁ, J.M. Active-site mutagenesis of a Lys49-phospholipase A₂: biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis. **Biochem. J.**, v.362, p. 89-96, 2002.

WATANABE, L. **Cristalização e análise do modelo estrutural da enzima ribonuclease T1 de *Aspergillus oryzae* complexada com o análogo de substrato guanilil (3'-6')6'-deoxihomouridina (GpcU)**. 1998. 79f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual de São Paulo, São José do Rio Preto, 1998.

WATANABE, L. **Estudos da enantio-e estéreo-especificidade da SADH de *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E**: mutagênese, expressão, purificação, cristalização e estudos cristalográficos. 2003. 93f. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual de São Paulo, São José do Rio Preto, 2003.

WATANABE, L.; SOARES, A.M; WARD, R.J.; FONTES, M.R.M.; ARNI, R.K. Structural insights for fatty acid binding in a Lys49-phospholipase A₂: crystal structure of myotoxin II from *Bothrops moojeni* complexed with stearic acid. **Biochimie**, v. 87, p. 161–167, 2005.

YU, B.Z.; BERG, O. G.; JAIN, M. K. The divalent cation is obligatory for the binding of ligands to the catalytic site of secreted PLA₂. **Biochemistry**, v.32, p.6485-6492, 1993.

ZANOTTI, G. Protein crystallography. In: GIACOVAZZO, C. **Fundamentals of crystallography**. New York: Oxford University Press, Inc., 1992. cap.8, p.535-597.

ZHAO, H.; TANG, L.; WANG, X.; ZHOU, Y.; LIN, Z. Structure of a snake venom phospholipase A₂ modified by *p*-bromo-phenacyl-bromide. **Toxicon**, v.36, n.6 p.875-886, 1998.

APÊNDICE I

**Preliminary X-ray crystallographic studies of a tetrameric phospholipase
A₂ formed by two isoforms of crotoxin B from *Crotalus durissus terrificus*
venom.**

D. P. Marchi-Salvador,^a
L. C. Corrêa,^a
G. H. M. Salvador,^a A. J. Magro,^a
C. Z. Oliveira,^b J. Iulek,^c
A. M. Soares^b and
M. R. M. Fontes^{a*}

^aDepartamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, UNESP, CP 510, 18618-000 Botucatu-SP, Brazil, ^bDepartamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, FCFRP, USP, Ribeirão Preto-SP, Brazil, and ^cDepartamento de Química, UEPG, Ponta Grossa-PR, Brazil

Correspondence e-mail: fontes@ibb.unesp.br

Received 14 September 2007
Accepted 13 November 2007



© 2007 International Union of Crystallography
All rights reserved

Preliminary X-ray crystallographic studies of a tetrameric phospholipase A₂ formed by two isoforms of crotoxin B from *Crotalus durissus terrificus* venom

Crotoxin B is a basic phospholipase A₂ found in the venom of *Crotalus durissus terrificus* and is one of the subunits that constitute crotoxin. This heterodimeric toxin, which is the main component of *C. d. terrificus* venom, is completed by an acidic, nontoxic and non-enzymatic component (crotoxin A) and is involved in important envenomation effects, such as neurological disorders, myotoxicity and renal failure. Although crotoxin was first crystallized in 1938, no crystal structure is currently available for crotoxin, crotoxin A or crotoxin B. In this work, the crystallization, X-ray diffraction data collection to 2.28 Å resolution and molecular-replacement solution of a novel tetrameric complex formed by two dimers of crotoxin B isoforms (CB1 and CB2) is presented.

1. Introduction

Crotoxin, the main protein present in the venom of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*), was the first animal toxin to be purified and crystallized (Slotta & Fraenkel-Conrat, 1938; Faure & Bon, 1988), but no crystal structure has been made available to date. This toxin exerts its pathophysiological action by blocking neuromuscular transmission (Vital-Brazil & Excell, 1970), causing modification of neurotransmitter release from nerve termini (Hawgood & Smith, 1977).

Crotoxin is a heterodimeric complex composed of two subunits: a basic and toxic Asp49-phospholipase A₂ (crotoxin B, CB or basic Asp49-PLA₂; Hendon & Fraenkel-Conrat, 1971; Fraenkel-Conrat *et al.*, 1980; Aird *et al.*, 1986) and an acidic, nontoxic and non-enzymatic component (crotoxin A, CA or crotapotin; Aird *et al.*, 1985, 1990). Several isoforms of both subunits of crotoxin have been isolated from the venom of a single snake (Hendon *et al.*, 1970; Breithaupt *et al.*, 1974; Aird & Kaiser, 1985; Faure & Bon, 1987, 1988; Faure *et al.*, 1994). Several CA and CB isoforms present in a large batch of venom collected from numerous snakes were purified and some were sequenced (Faure & Bon, 1988; Faure *et al.*, 1994). The amino-acid composition of the purified basic Asp49-PLA₂ isoforms (CB1 and CB2) indicated that they differed at eight amino-acid residues (Faure *et al.*, 1994). These substitutions resulted in slight modifications in the enzymatic and pharmacological properties of the toxin: one of the crotoxin B isoforms has a low enzymatic activity and a high lethal potency, whereas the other CB isoform was less toxic but more active enzymatically (Faure & Bon, 1988; Faure *et al.*, 1994).

The biochemical mechanism of the crotoxin complex constitutes an example of molecular potentiation: the CA subunit hinders the formation of nonspecific interactions between the basic phospholipase A₂ and its substrates or other molecules. This complex can be separated only in the presence of 6 M urea or at a pH of below 2 (Faure & Bon, 1988; Faure *et al.*, 1994). In isolation, both subunits are reported to be pharmacologically inactive; CA is thought to act as a chaperone protein for CB, increasing the neurotoxic potency of this enzyme (Breithaupt, 1976; Habermann & Breithaupt, 1978). When crotoxin interacts with the specific receptors present in the presynaptic nerve endings and possibly in the sarcoplasm and other plasma membranes, the complex dissociates and the CB subunit induces potent neurotoxic, cytotoxic and myotoxic effects (Bon, 1997).

Despite the harmful effects of this toxin, the crotoxin complex has been successfully tested as an inhibitor of tumour growth and as an efficient analgesic substance (Corin *et al.*, 1993; Rudd *et al.*, 1994; Cura *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2006). This fact enhances interest not only in its mechanisms of action but also in the possible practical applications of this toxin as a drug or even as a model for the development of biotechnological products.

The isolation, biochemical/pharmacological characterization and amino-acid sequence of crotoxin B isoforms (CB1 and CB2) from *C. d. terrificus* have been reported (Hendon *et al.*, 1970; Faure & Bon, 1988; Faure *et al.*, 1994). Protein sequencing indicated that both CB isoforms are Asp49-PLA₂s and consist of 122 amino acids (molecular weights of 14 185 Da for CB1 and 14 245 Da for CB2; UniProtKB/Swiss-Prot data bank codes P62022 and P24027 for CB1 and CB2, respectively; Faure *et al.*, 1994).

In the present paper, we describe the crystallization, X-ray diffraction data collection and molecular-replacement solution of a tetrameric arrangement of two isoforms of crotoxin B (CB1 and CB2), a novel feature for Asp49-PLA₂s. This study may provide insights into the relationship between the myotoxic, cytotoxic and neurotoxic activities and the structural characteristics of this protein. These activities have largely been studied by biochemical techniques; however, there is little structural data available.

2. Materials and methods

2.1. Purification and amino-acid sequences

Crotoxin B (CB) was isolated from *C. d. terrificus* snake venom by ion-exchange chromatography on a CM-Sepharose column (2 × 20 cm) previously equilibrated with 0.05 M ammonium bicarbonate buffer pH 8.0 (Soares *et al.*, 1998). The dissociation of crotoxin and the isolation of subunits was performed according to Hendon & Fraenkel-Conrat (1971). The amino-acid sequences of the two CB isoforms (CB1 and CB2) which formed the asymmetric unit of the crystal used in the X-ray diffraction experiments were the same as those determined by Faure *et al.* (1994). The homogeneity of the toxin was analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) for basic proteins and SDS-PAGE according to Reisfeld *et al.* (1962) and Laemmli (1970), respectively.

2.2. Crystallization

A lyophilized sample of crotoxin B was dissolved in ultrapure water at a concentration of 10 mg ml⁻¹. The sparse-matrix method

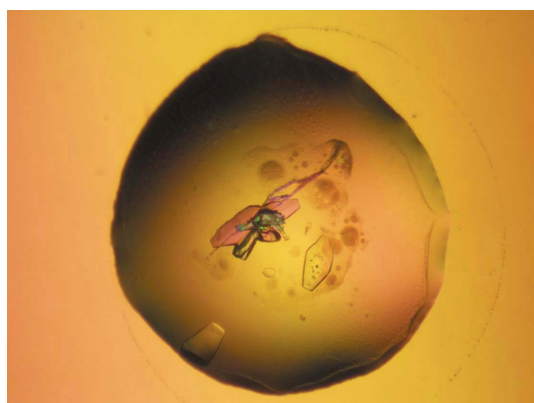


Figure 1
Crystal of crotoxin B from *C. d. terrificus*.

Table 1

X-ray diffraction data-collection and processing statistics.

Values in parentheses are for the highest resolution shell.

Unit-cell parameters (Å)	$a = 72.9, b = 81.2, c = 100.0$
Space group	$P2_12_12_1$
Resolution (Å)	40–2.28 (2.36–2.28)
Unique reflections	23669 (2423)
Completeness (%)	85.9 (90.0)
$R_{\text{merge}}^{\dagger}$ (%)	12.7 (54.7)
Radiation source	Synchrotron (MX1 Station, LNLS)
Data-collection temperature (K)	100
Average $I/\sigma(I)$	9.57 (2.04)
Redundancy	4.2 (4.2)
Matthews coefficient V_M (Å ³ Da ⁻¹)	2.6
Molecules in the ASU	4
Solvent content (%)	52.6

$\dagger R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \overline{I(hkl)}|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$, where $I_i(hkl)$ is the intensity of an individual measurement of the reflection with Miller indices hkl and $\overline{I(hkl)}$ is the mean intensity of that reflection. Calculated for $I > -3\sigma(I)$. Data were processed using the *HKL* suite (Otwinowski & Minor, 1997).

(Jancarik & Kim, 1991) was used to perform initial screening of the crystallization conditions. Crystals of CB were obtained by the conventional hanging-drop vapour-diffusion method (McPherson, 1982) using a 1 μl protein solution:1 μl precipitant ratio; the drop was equilibrated against a reservoir (500 μl) containing 11% (w/v) polyethylene glycol 8000 and 0.1 M Tris-HCl pH 9.0. Crystals measured approximately 0.20 × 0.25 × 0.05 mm after 20 d at 291 K (Fig. 1).

2.3. X-ray data collection and processing

X-ray diffraction data were collected from a single CB crystal at a wavelength of 1.427 Å (at 100 K) using a synchrotron-radiation source (MX1 Station, Laboratório Nacional de Luz Sincrotron, LNLS, Campinas, Brazil) and a MAR CCD imaging-plate detector (MAR Research). The crystal was mounted in a nylon loop and flash-cooled in a stream of nitrogen gas at 100 K using 20% (v/v) glycerol as a cryoprotectant. The crystal-to-detector distance was 85 mm and an

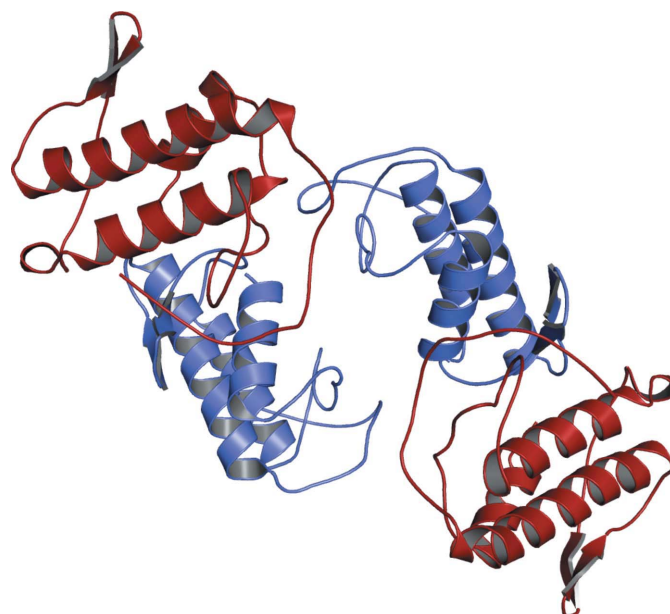


Figure 2
Tetrameric structure of crotoxin B from *C. durissus terrificus* shown as a ribbon diagram. The monomers of isoforms CB1 and CB2 are shown in red and blue, respectively. This figure was generated using *PyMOL* (DeLano, 2002).

oscillation range of 1° was used, resulting in the collection of a total of 103 images. Data processing was carried out using the programs *DENZO* and *SCALEPACK* (Otwinowski & Minor, 1997) at 2.28 Å resolution.

3. Results and discussion

The data-collection statistics are shown in Table 1. The data set is 90.0% complete at 2.28 Å resolution, with an R_{merge} of 12.7%. The crystals belong to the orthorhombic space group $P2_12_12_1$, with unit-cell parameters $a = 72.9$, $b = 81.2$, $c = 100.0$ Å.

Packing parameter calculations based on the protein molecular weight indicate the presence of four molecules in the asymmetric unit. This corresponds to a Matthews coefficient V_M of $2.60 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ with a calculated solvent content in the crystals of 52.61%; these values are within the expected range for typical protein crystals (assuming a value of $0.74 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ for the protein partial specific volume; Matthews, 1968).

The crystal structure of the basic PLA₂ formed by two isoforms of crotoxin B (two molecules of CB1 and two molecules of CB2) was determined using molecular-replacement techniques implemented in the program *AMoRe* (Navaza, 1994) using the coordinates of a monomer of native BthTX-I (da Silva-Giotto *et al.*, 1998), a Lys49-PLA₂ from *Bothrops jararacussu* snake venom (Fig. 2).

In conclusion, crotoxin B isolated from *C. durissus terrificus* venom was crystallized and X-ray diffraction data were collected to 2.28 Å. The structure presented a tetrameric arrangement formed by two heterodimers of the CB1 and CB2 isoforms. Initial analysis with *PISA* (Krissinel & Henrick, 2007) indicated that the tetrameric structure is stable in solution. Consequently, these data indicate that the tetramer is a feasible biological assembly, supporting the proposal that the interface contacts are not formed as a consequence of crystal packing. Detailed studies of this structure might provide insights into the toxicity mechanisms of crotoxin and other PLA₂s.

The authors gratefully acknowledge financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (FUNDU-NESP) and Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas-SP).

References

- Aird, S. D. & Kaiser, I. I. (1985). *Toxicon*, **23**, 361–374.
- Aird, S. D., Kaiser, I. I., Lewis, R. V. & Kruggel, W. G. (1985). *Biochemistry*, **24**, 7054–7058.
- Aird, S. D., Kaiser, I. I., Lewis, R. V. & Kruggel, W. G. (1986). *Arch. Biochem. Biophys.* **249**, 296–300.
- Aird, S. D., Yates, J. R., Martino, P. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. & Kaiser, I. I. (1990). *Biochim. Biophys. Acta*, **1040**, 217–224.
- Bon, C. (1997). *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism*, edited by R. M. Kini, pp. 269–285. Chichester: Wiley & Sons.
- Breithaupt, H. (1976). *Toxicon*, **14**, 221–233.
- Breithaupt, H., Rübtsamen, K. & Habermann, E. (1974). *Eur. J. Biochem.* **49**, 333–345.
- Corin, R. E., Viskatis, L. J., Vidal, J. C. & Etcheverry, M. A. (1993). *Invest. New Drugs*, **11**, 11–15.
- Cura, J. E., Blanzaco, D. P., Brisson, C., Cura, M. A., Cabrol, R., Larrateguy, L., Mendez, C., Sechi, J. C., Silveira, J. S., Theiller, E., de Roodt, A. R. & Vidal, J. C. (2002). *Clin. Cancer Res.* **8**, 1033–1041.
- da Silva Giotto, M. T., Garratt, R. C., Oliva, G., Mascarenhas, Y. P., Giglio, J. R., Cintra, A. C. O., de Azevedo, W. F. Jr, Arni, R. K. & Ward, R. J. (1998). *Proteins*, **30**, 442–454.
- DeLano, W. L. (2002). *The PyMOL Molecular Graphics System*. San Carlos: DeLano Scientific.
- Faure, G. & Bon, C. (1987). *Toxicon*, **25**, 229–234.
- Faure, G. & Bon, C. (1988). *Biochemistry*, **27**, 730–738.
- Faure, G., Choumet, V., Bouchier, C., Camoin, L., Guillaume, J.-L., Monegier, B., Vuilhorgne, M. & Bon, C. (1994). *Eur. J. Biochem.* **223**, 161–164.
- Fraenkel-Conrat, H., Jeng, T. W. & Hsiang, M. (1980). *Natural Toxins*, edited by D. Eaker & T. Wadström, pp. 561–567. Oxford: Pergamon.
- Habermann, E. & Breithaupt, H. (1978). *Toxicon*, **16**, 19–30.
- Hawgood, B. J. & Smith, J. W. (1977). *Br. J. Pharmacol.* **61**, 597–606.
- Hendon, R. A. & Fraenkel-Conrat, H. (1971). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **68**, 1560–1563.
- Hendon, R. A., Roy, D. & Fraenkel-Conrat, H. (1970). *Toxicon*, **8**, 135.
- Jancarik, J. & Kim, S.-H. (1991). *J. Appl. Cryst.* **24**, 409–411.
- Krissinel, E. & Henrick, K. (2007). *J. Mol. Biol.* **372**, 774–797.
- Laemmli, U. K. (1970). *Nature (London)*, **227**, 680–685.
- McPherson, A. (1982). *Preparation and Analysis of Protein Crystals*. New York: Wiley.
- Matthews, B. W. (1968). *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497.
- Navaza, J. (1994). *Acta Cryst. A* **50**, 157–163.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). *Methods Enzymol.* **276**, 307–326.
- Reisfeld, R. A., Lewis, J. & Williams, D. A. (1962). *Nature (London)*, **195**, 281–283.
- Rudd, C. L., Viskatis, L. J., Vidal, J. C. & Etcheverry, M. A. (1994). *Invest. New Drugs*, **12**, 183–184.
- Slotta, K. H. & Fraenkel-Conrat, H. (1938). *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **71**, 1076–1081.
- Soares, A. M., Rodrigues, V. M., Homs-Brandeburgo, M. I., Toyama, M. H., Lombardi, F. R., Arni, R. K. & Giglio, J. R. (1998). *Toxicon*, **36**, 503–514.
- Vital-Brazil, O. & Excell, B. J. (1970). *J. Physiol. (Lond.)*, **212**, 34–35.
- Zhang, H. L., Han, R., Chen, Z. X., Chen, B. W., Gu, Z. L., Reid, P. F., Raymond, L. N. & Oin, Z. H. (2006). *Toxicon*, **48**, 175–182.

APÊNDICE II

Insights into the role of oligomeric state on the biological activities of Crotoxin: crystal structure of a tetrameric phospholipase A₂ formed by two isoforms of Crotoxin B from *Crotalus durissus terrificus* venom.

Insights into the role of oligomeric state on the biological activities of crotoxin: crystal structure of a tetrameric phospholipase A₂ formed by two isoforms of crotoxin b from *Crotalus durissus terrificus* venom

Daniela P. Marchi-Salvador,¹ Luiz C. Corrêa,² Angelo J. Magro,¹ Clayton Z. Oliveira,² Andreimar M. Soares,² and Marcos R. M. Fontes^{1*}

¹ Departamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu/SP, Brazil

² Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, FCFRP, USP, Ribeirão Preto/SP, Brazil

ABSTRACT

Crotoxin B (CB or Cdt PLA₂) is a basic Asp49-PLA₂ found in the venom of Crotalus durissus terrificus and it is one of the subunits that constitute the crotoxin (Cro). This heterodimeric toxin, main component of the C. d. terrificus venom, is completed by an acidic, nontoxic, and nonenzymatic component (crotoxin A, CA or crotapotin), and it is related to important envenomation effects such as neurological disorders, myotoxicity, and renal failure. Although Cro has been crystallized since 1938, no crystal structure of this toxin or its subunits is currently available. In this work, the authors present the crystal structure of a novel tetrameric complex formed by two dimers of crotoxin B isoforms (CB1 and CB2). The results suggest that these assemblies are stable in solution and show that Ser1 and Glu92 of CB1 and CB2, respectively, play an important role in the oligomerization. The tetrameric and dimeric conformations resulting from the association of the isoforms may increase the neurotoxicity of the toxin CB by the creation of new binding sites, which could improve the affinity of the molecular complexes to the presynaptic membrane.

Proteins 2008; 00:000–000.
 © 2008 Wiley-Liss, Inc.

Key words: crotoxin B; Asp49-phospholipase A₂; oligomerization; neurotoxic activity; crystal structure; *Crotalus durissus terrificus* venom.

INTRODUCTION

Phospholipases A₂ (PLA₂; EC 3.1.1.4) are Ca²⁺-dependent enzymes which hydrolyse the sn-2 ester bond of phosphoglycerides. They are widely found in pancreatic secretions, inflammatory exudates, and in snake and arthropod venoms.¹ Snake venom PLA₂s are distributed in the groups I and II of the PLA₂ superfamily, according to their pattern of disulfide bonding and length of some loops; elapid PLA₂s are classified in the first group, whereas crotalid and bothropic PLA₂s are part of the second group.¹ In addition to their primary catalytic role, snake venom PLA₂s show other important toxic/pharmacological effects as myonecrosis, neurotoxicity, cardiotoxicity and haemolytic, haemorrhagic, hypotensive, anticoagulant, platelet-aggregation inhibition, and edema-inducing activities.^{2–4}

Crotoxin (Cro), the main protein present in the venom of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*), was the first animal toxin to be purified and crystallized^{5,6} but no crystal structure is available to this date. Cro is a heterodimeric molecular complex related to important envenomation effects, as neurological disorders, myotoxicity, and renal failure.^{7–9} The two subunits which compose this toxin are an acidic, nontoxic, and nonenzymatic component (crotoxin A, CA, or crotapotin)^{8,10} and the toxic molecule, a basic Asp49-PLA₂ (crotoxin B, CB, or Cdt PLA₂). The biochemical mechanism of Cro constitutes an example of molecular potentiation, since the acidic, nontoxic subunit CA hinders the formation of nonspecific interactions between the basic Asp49-PLA₂ and its substrates or other molecules. Consequently, Cro binds to specific receptors present in the presynaptic nerve endings and possibly in the sarcoplasm and other plasma membranes. After the binding between Cro and their molecular targets, the complex dissociates, inducing potent neurotoxic, cytotoxic, and myotoxic effects.⁸

Despite its harmful effects, Cro has been tested successfully as inhibitor of tumor growth and as an efficient analgesic substance.^{11–14} Indeed, the

Grant sponsors: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP), and Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas-SP).

*Correspondence to: Marcos R. M. Fontes; Departamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu/SP, Brazil. E-mail: fontes@ibb.unesp.br

Received 25 October 2007; Revised 18 December 2007; Accepted 31 December 2007

Published online 00 Month 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/prot.21980

biochemical characterization of several isoforms of this toxin isolated from individual and pooled *C. d. terrificus* venom samples showed the high diversity of the two Cro subunits.^{6,15,16} This fact enhances the interest not only about its mechanisms of action but also the possible practical applications of Cro as a drug or even as a model for the development of biotechnological products.

In this work, we describe the first crystallographic structure of CB, the basic and toxic subunit of Cro. The asymmetric unit of this model is constituted by a tetrameric arrangement of two CB isoforms (CB1 and CB2), a novel feature for Asp49-PLA₂s. Additionally, some interesting structural features of CB1/CB2 complex were analyzed in order to investigate the role played by the oligomerization in the biochemical and pharmacological activities of CB molecules. Indeed, the insights obtained in this study could be useful to reveal other structural/functional relationships not yet determined in other PLA₂s.

MATERIALS AND METHODS

Purification and biochemical characterization

Desiccated venom from *C. d. terrificus* (200–250 mg) was fractionated on a CM-Sepharose column (2 cm × 20 cm), which was earlier equilibrated with 0.05M ammonium bicarbonate buffer, pH 8.0.¹⁷ Elution was carried out with a continuous gradient up to a concentration of 0.5M ammonium bicarbonate.¹⁸ Absorbance of the eluent solution was recorded at 280 nm. Cro dissociation and isolation of subunits was performed according to Hendon and Fraenkel-Conrat.¹⁰

The purified CB sample was assayed by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) 12% under reduced and nonreduced conditions, as previously described.¹⁹ Intensity of optical density (IOD) of the electrophoresis gel was analyzed using Pharmacia Biotech ImageMaster[®] VDS software.

The amino acid sequences of the two CB isoforms (CB1 and CB2) which formed the asymmetric unit of the crystal used in the X-ray diffraction experiments were the same determined by Faure *et al.*,¹⁶ as checked by the inspection of the electronic densities of the model.

Dynamic light scattering

The dynamic light scattering (DLS) measurements were performed with two different CB concentrations (1.0 mg/mL and 6.0 mg/mL) at five different temperatures (277, 283, 291, 298, and 308 K) using the DLS system (DynaPro[®]—Molecular Sizing Instruments, Protein Solutions, Lakewood, NJ). The results were analyzed with

the software Dynamics V6. Sample solutions were prepared in PBS buffer (pH 7.5) made with ultra-pure water and manually injected into the flow cell (60 μL). The data were measured a hundred times.

Crystallization and data collection

Initially, a lyophilized sample of CB was dissolved in ultra-pure water at a concentration of 10.0 mg/mL. The crystallization experiments were performed using the sparse matrix method²⁰ and the hanging drop vapor diffusion technique.²¹ After a period of 20 days at 291 K, a crystal measuring 0.20 × 0.25 × 0.05 mm³ was formed under the following condition: 0.1M Tris HCl pH 9.0 and 11.0% (w/v) PEG 8000.²² Then, the crystal was conditioned in an appropriate nylon loop and flash-frozen at 100 K during the diffraction experiments. The diffraction data were collected at a wavelength of 1.427 Å using a synchrotron radiation source (LNLS, Campinas, Brazil—MX1 beam line) and a MAR CCD detector. Data were processed using the HKL suite²³ at 2.28 Å resolution. The data set collected was 90% complete at the highest resolution with $R_{\text{merge}} = 12.7\%$. Data-processing statistics are presented in Table I.

Structure determination and refinement

The crystal structure containing two isoforms (CB1 and CB2) of CB toxin was solved by the molecular replacement method using the program AMoRe²⁵ and the coordinates of native BthTX-I,²⁶ a Lys49-PLA₂ from *Bothrops jararacussu* venom, as the search model. After a cycle of simulated annealing refinement using the CNS

Table I

X-ray Diffraction Data Collection Statistics

Unit Cell (Å)	$a = 72.9$ $b = 81.2$ $c = 100.0$
Space Group	P2 ₁ 2 ₁
Resolution (Å)	40.00–2.28 (2.36–2.28) ^a
Unique reflections	23669 (2423) ^a
Completeness (%)	85.9 (90.0) ^a
Average $I/\sigma(I)$	9.57 (2.04) ^a
R_{merge}^b (%)	12.7 (54.7) ^a
Redundancy	4.2 (4.2) ^a
Matthews coefficient (Å ³ /Da) ^d	2.60
Solvent content (%) ^d	52.61

^aNumbers in parenthesis are for the highest resolution shell.

^b $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} (\sum_i (|I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle|))}{\sum_{hkl} \langle I_{hkl} \rangle}$, where $I_{hkl,i}$ is the intensity of an individual measurement of the reflection with Miller indices h , k , and l , and $\langle I_{hkl} \rangle$ is the mean intensity of that reflection. Calculated for $I > 3\sigma(I)$.

^cData processing using the HKL suite.²²

^dCalculated with the program CNS.²⁴

Table II
Refinement Statistics

Resolution (Å)	28.93–2.28 (2.42–2.28) ^a
Completeness (%)	85.6 (86.6) ^a
Unique reflections	23613 (3737) ^a
R_{cryst} ^b (%)	22.4 (28.6) ^a
R_{free} ^c (%)	24.8 (35.1) ^a
Number of nonhydrogens atoms	
Protein	3932
Heterogen atoms (ions Ca ²⁺)	2
Solvent atoms	379
Mean <i>B-factor</i> (Å ²) ^d	41.6
R.m.s. deviations from ideal values ^d	
Bond lengths (Å)	0.008
Bond angles (°)	1.4
Dihedral angles (°)	22.9
Improper angles (°)	0.88
Ramachandran plot ^a (%)	
Residues in most favored region (%)	90.3
Residues in additional allowed region (%)	9.2
Residues in generously region (%)	0.5
Residues in disallowed region (%)	0.0
Coordinate error (Å) ^d	
Luzzati plot (cross-validated Luzzati plot)	0.32 (0.40)
SIGMAA (cross-validated SIGMAA)	0.31 (0.37)

^aNumbers in parenthesis are for the highest resolution shell.^b $R_{cryst} = \sum_{hkl} (|F_{obs}| - |F_{calc}|) / \sum_{hkl} |F_{obs}|$, where $|F_{obs}|$ and $|F_{calc}|$ are the observed and calculated structure factor amplitudes.^c R_{free} is equivalent to R_{cryst} but calculated with reflections (5.0%) omitted from the refinement process.^dCalculated with the program CNS.²⁴^eCalculated with the program PROCHECK.²⁸

program,²⁴ the electron densities were inspected and the CB amino acid sequences, as obtained by Faure *et al.*,¹⁶ were inserted. The modeling process was performed by manually rebuilding with the O program.²⁷ Electron density $3|F_{obs}| - 2|F_{calc}|$ maps and simulated annealing omit maps calculated with analogous coefficients were generally used. The model was improved, as judged by the analysis of the free *R* factor,²⁴ through rounds of crystallographic refinement (positional and restrained isotropic individual *B-factor* refinement, with an overall anisotropic temperature factor and bulk solvent correction). Noncrystallographic symmetry was used in the beginning of the modeling process in order to improve the values of the *R* factors. Additionally, six mutations were introduced in three CB monomers because of the lack of electron density in some regions of the monomers (monomer A: Lys38 → Ala and Arg74 → Ala; monomer B: Trp31 → Gly and Pro74 → Ala; monomer C: Trp31 → Gly and Pro74 → Ala). Solvent molecules were added and refined also with the program CNS.²⁴ The refinement converged to *R* and R_{free} factors of 22.4% and 24.8%, respectively (see Table I for explanation of *R* factors). CB1/CB2 crystallographic model is constituted by 3944 nonhydrogen protein atoms, two Ca²⁺ ions and 379 water molecules. The refinement statistics are shown in Table II.

T2

Analysis of the CB1/CB2 crystallographic model assembly, C^α atom superpositions, and stereochemical quality

The analysis of CB1/CB2 crystallographic model quaternary assembly and contact interfaces were performed using the on-line interactive tool PISA (Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies),²⁹ available at the European Bioinformatics Institute server (http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html). All the C^α atom superpositions performed between monomers were executed with the program O.²⁷ The stereochemical quality of the final crystallographic model was checked with the PROCHECK program.²⁸ The coordinates have been deposited in the RCSB Protein Data Bank under the code 2QOG. All structural figures were generated using PyMol program.³⁰

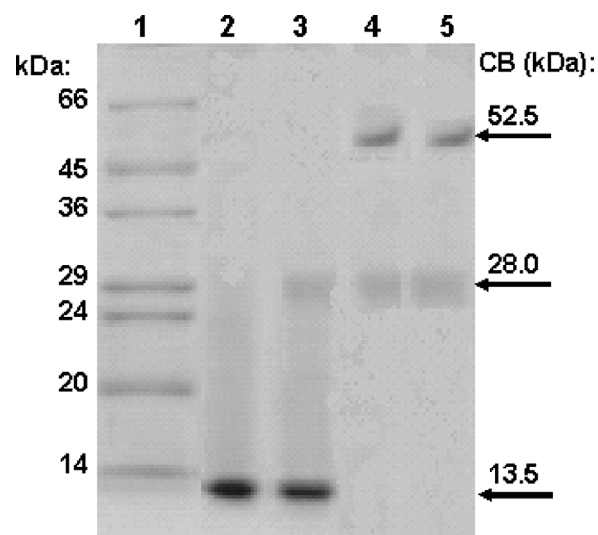
AQ2

RESULTS

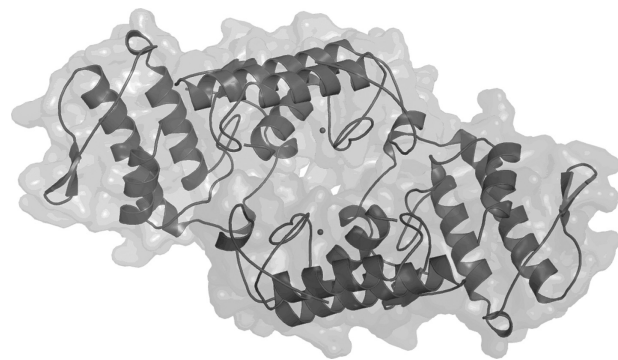
Electrophoresis analysis

The SDS-PAGE under reduced conditions showed a single band with a molecular weight of ~13.5 kDa (see Fig. 1). This value corresponds to the average molecular weight of other snake venom PLA₂ monomers, revealing the reduced CB toxin is monomeric. Under nonreduced conditions, the SDS-PAGE showed two bands of ~28 and ~53 kDa, respectively (see Fig. 1). This result indicates that the CB molecules may present a dimeric or tet-

F1

**Figure 1**

SDS-PAGE 12% analysis of CB toxin under reduced and nonreduced conditions (stained with Coomassie blue). SDS-PAGE under reduced conditions shows a single band of ~13.5 kDa (monomeric form) and two bands of ~28 and ~53 kDa (dimeric and tetrameric forms, respectively) under nonreduced conditions. Lanes: (1) molecular weight markers; (2) reduced CB (20 μg) + β-mercaptoethanol (20 mM); (3) reduced CB (20 μg) + β-mercaptoethanol (5 mM); (4) nonreduced CB (20 μg); and (5) nonreduced CB (20 μg).

**Figure 2**

Quaternary assembly of CB1/CB2 crystallographic model. The cartoon representations and surfaces of the dimers 1 and 2 are shown, respectively, in blue and red. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

rameric assembly when the toxin is not reduced. The IOD of the tetrameric bands (52.5 kDa) is ~30% superior to the same parameter of the dimeric ones (28.0 kDa) under nonreduced conditions (Fig. 1; lanes 4 and 5).

Molecular association

The results of DLS experiments at 291 K (crystallization temperature) indicated a mean hydrodynamic radius (R_H) of 2.7 and 3.2 nm at the CB concentrations of 1.0 mg/mL and 6.0 mg/mL, respectively. These R_H values (2.7 nm and 3.2 nm) correspond respectively to molecular associations with ~34 and 52 kDa. Since each peak presented a polydiversity value below 15% of the average radius, it is possible to deduce the CB molecules form dimeric ($R_H = 2.7$ nm) and tetrameric ($R_H = 3.2$ nm) associations in solution. The R_H and molecular weight obtained in the experiments performed under other temperatures (277, 283, 298, and 308 K) did not show significant variations.

Overall structure of CB1/CB2 crystallographic model

The crystal belongs to the orthorhombic space group $P2_12_12_1$ with unit cell dimensions of $a = 72.9$, $b = 81.2$, and $c = 100.0$ Å (Table I). According to the values of the Matthews coefficient (2.60 Å³/Da) and the solvent fraction (52.6%), the asymmetric unit of the crystal contains four CB monomers. Remarkably, these monomers show the same amino acid sequence of the isoforms CB1 (monomers B and C) and CB2 (monomers A and D) identified by Faure *et al.*¹⁶ The refinement of the whole model converged to a crystallographic residual of 22.4% ($R_{\text{free}} = 24.8\%$) for all data between 28.93 and 2.28 Å (Table II). The final structure showed a good stereochemical quality (no residues found in the disallowed

region of the Ramachandran plot³¹) and an excellent overall PROCHECK G-factor of 2.5.²⁸

Both CB isoforms possess seven disulfide bridges and present, like other group IIA PLA₂s, a N-terminal α -helix (h1), a Ca²⁺-binding loop, two antiparallel α -helices (h2 and h3), two short strands of antiparallel β -sheet (β -wing), and a C-terminal loop. In contrast, the “short helix” located between the helix h1 and the Ca²⁺-binding loop of other group IIA PLA₂s is not well characterized in the CB1 and CB2 models. The catalytic network for group IIA snake venom PLA₂s, formed by His48, Tyr52, Tyr73, and Asp99, is also fully conserved in the isoforms CB1 and CB2. In addition, despite their common structural features, only the monomers B and C (isoform CB1) showed a Ca²⁺ ion present in their Ca²⁺-binding loop.

Indeed, the analysis of the crystal structure showed that a tetramer with an oblong shape is present in the asymmetric unit. It is formed by the association of two dimers, which are a combination of CB1 and CB2 monomers (see Fig. 2). These dimers (dimer 1—monomers A (CB2) and C (CB1)); dimer 2—monomers B (CB1) and D (CB2)) are almost identical, since the superposition of their C α atoms displayed a slightly deviation (r.m.s.d. = 0.4 Å). According to the on-line program PISA,²⁹ there are four salt bridges, 11 hydrogen bonds, and 32 residues involved in hydrophobic interactions in the dimer 1 contact interface, whereas in the same region of the dimer 2 are found two salt bridges, six hydrogen bonds, and 36 hydrophobic interactions. Two of these salt bridges and four hydrogen bonds are present in both dimeric interfaces (Table III). On the other hand, the contacts between both dimers are constituted basically by hydrophobic interactions (54), with the exception of a hydrogen bond formed between the residues Trp70 and Tyr120 from monomers C and B, respectively.

The software PISA²⁹ pointed out the whole tetrameric structure is stable in solution, with a buried surface of 5370 Å², $\Delta G^{\text{int}} = -34.3$ kcal/mol and $\Delta G^{\text{diss}} = 8.8$ kcal/mol. No other alternative assembly was identified by the

Table III

Analogous Salt Bridges and Hydrogen Bonds Found in the Dimers 1 and 2 of CB1/CB2 Crystallographic Model

Salt bridges	
Glu92[OE1]:Ser1[N]	
Glu92[OE2]:Ser1[N]	
Hydrogen bonds	
Gln4[NE2]:Gly30[O]	
Gln4[NE2]:Gly30[O]	
Tyr75[OH]:Trp31[O]	
Tyr75[O]:Gly32[N]	
Hydrophobic interactions (residues involved)	
His1 Leu3 Asn6 Phe11 Asn17 Val19 Ala23 Phe24 Gly26 Tyr28 Cys29	
Gln34 Asp49 Tyr52 Lys69 Trp70 Ile72 Tyr73 Ser76 Leu77 Gly88 Thr89	
Phe119 Arg127 Ser130 Cys133	

Crystal Structure of the Crotoxin B



Figure 3

Sequence alignment between the isoforms CB1 and CB2. The sequences have been numbered according to Renetseder et al.³² Drawn using GeneDoc program.³³

program as a stable structure. Consequently, these data indicate the crystallographic model is a feasible biological assembly, showing the interface contacts were not formed because of the crystal packing.

Structural comparison between the monomers of CB1/CB2 crystallographic model

F3 Figure 3 shows the alignment of isoforms CB1 and CB2, highlighting the eight residues different between them. The C α atom superposition of the monomers showed a significant difference between the isoforms CB1 and CB2. While the r.m.s.d. values resulted from the A/D (isoform CB2) and B/C (isoform CB1) superpositions were, respectively, 0.20 Å and 0.41 Å, the superpositions between monomers of distinct isoforms presented r.m.s.d. values around 1.7 Å. The CB1/CB2 structural differences are mainly due to the Ca²⁺-binding loop (residues 27–34), the β -wing region and its two adjacent loops (residues 53–91), and the C-terminal region (residues 119–133). However, the most important C α atom deviations observed between the isoforms are located in the Ca²⁺-binding loop (0.82–0.97 Å) and in the region between the residues Gly53 and Cys91 (around 2.85 Å) (see Fig. 4). Both regions enclose the main residues located at the interfaces of the dimers 1 and 2: in the monomers B and C (isoform CB1) these contacts are sited at the β -wing and in the loop between the β -wing and h3 whereas in the monomers A and D (isoform CB2) they are at the Ca²⁺-binding loop.

F4 The Ca²⁺ coordination in the monomers B and C of CB1/CB2 crystallographic model is very similar to those presented by other PLA₂s^{34–36}; it displays a sevenfold bi-pyramidal arrangement supported by four residues (Tyr28, Gly30, Gly32, and Asp49) and two water molecules (W145 and W254 in the monomer B; W84 and

W221 in the monomer C) (see Fig. 5). In contrast, the Ca²⁺-binding loop architecture of the monomers A and D is not preserved. In both monomers, the residues Cys29, Gly30, Gly32 are flipped in relation to the same residues of the monomers B and C. Besides that, the residues Trp31(A) and Trp31(D) present an unusual ϕ/ψ conformation (71.3°/173.9° and 70.2°/171.3° in the monomers A and D, respectively) compared with the residues located at the same position in the other two monomers (–110.0°/39.8° and –48.8°/139.9° in B and C, respectively) (see Fig. 6).

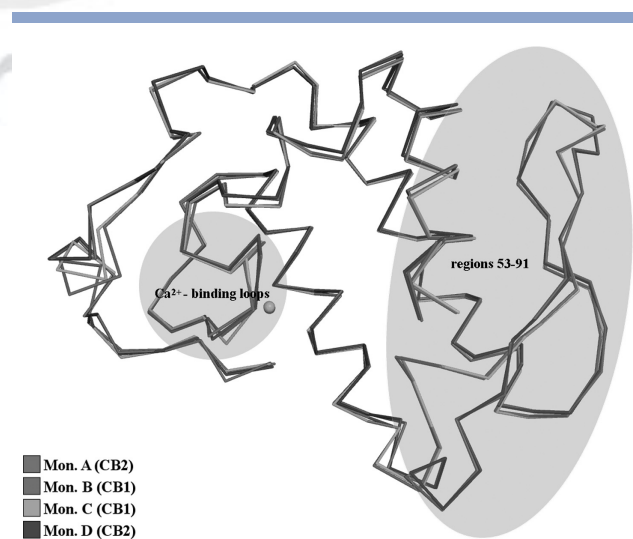
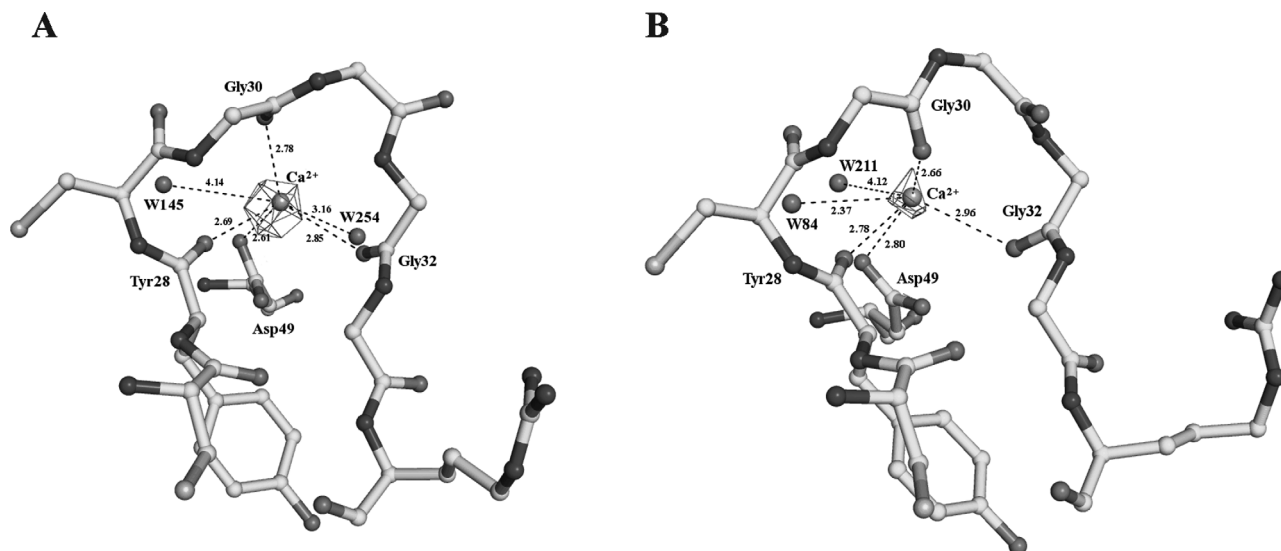


Figure 4

C α atom superposition of the monomers A, B, C, and D highlighting the most important structural deviations between the isoforms CB1 and CB2, located at the Ca²⁺-binding loops and regions 53–91. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

**Figure 5**

Ca^{2+} -binding loops of the isoforms CBI: (A) monomer B; (B) monomer C. The electronic densities around the Ca^{2+} ions were generated using a $3\text{IF}_{\text{obs}} - 2\text{IF}_{\text{calc}}$ map contoured at 3.0 standard deviation (the distances are in Å). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

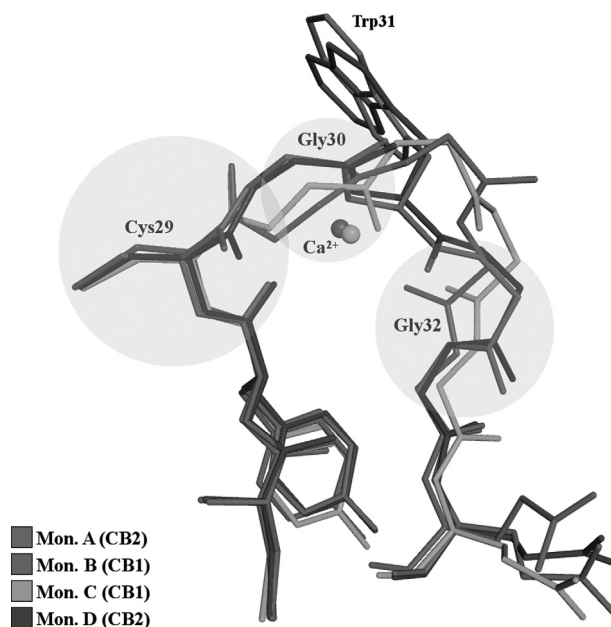
DISCUSSION

Structural conformation of CB1/CB2 crystallographic model

The oligomeric assembly is an important aspect associated to the structural and functional properties of many snake venom PLA_2 crystallographic models already solved.^{37–42} In the case of CB, the quaternary structure seems to be biologically significant because of three main reasons. (i) The SDS-PAGE results revealed the nonreduced toxin may be a dimer or tetramer in solution (see Fig. 1), however, this experiment suggests that the predominant quaternary assembly is the tetrameric form, according to the IOD values of the bands; (ii) The DLS assays confirmed the presence of these two molecular associations in solution and showed the tetrameric form is highly predominant at the protein concentration (6.0 mg/mL) and temperature (291 K) in which the crystal was obtained; (iii) The solvation and dissociation free energy variations calculated for the tetrameric crystallographic model show that this assembly is stable in solution.²⁹

The CB1/CB2 tetrameric structure is formed by the association of the C/A and B/D dimers. However, this does not occur with the agkistrodoxin from *Agkistrodon halys* Pallas (PDB code 1BJJ),⁴³ a hexameric neurotoxic Asp49- PLA_2 which is only stable in solution as a dimer, according to the program PISA.²⁹ In contrast to CB1/CB2 model, the quaternary assembly of the agkistrodoxin is apparently stabilized by Ca^{2+} ions located in the contact interfaces of the hexameric structure. Similarly, the crys-

tallographic model of PLA_2 from Indian cobra (*Naja naja sagittifera*) presents a Ca^{2+} ion in the dimeric interface, which is responsible for its dimerization.⁴² Remark-

**Figure 6**

C^α atom superposition between CB1 and CB2 Ca^{2+} -binding loops. Residue Trp31 of the isoforms CB2 presents an unusual ϕ/ψ conformation compared with the residues located at the same position in the other two monomers. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

Crystal Structure of the Crotoxin B

ably, this last model shares singular characteristics with CB1/CB2 crystallographic structure: both are heterodimeric (formed by two isoforms) and hold monomers with and without the presence of Ca^{2+} ions in their Ca^{2+} -binding loops. High Ca^{2+} concentrations induce the *N. n. sagittifera* PLA₂ dimerization through the formation of an intermolecular salt bridge between the residues Arg31 and Asp49. This electrostatic interaction hinders the link of the Asp49 side chain with the Ca^{2+} ion, causing its release from one monomer. Simultaneously, the contacts of Arg31 with several carbonyl oxygen atoms of the loop Cys27–Gly33 also make the Ca^{2+} -binding loop narrower in comparison to the same region of the other monomer, where the ion is found. In contrast, the dimerization of the CB1/CB2 complex cannot be attributed to the excess of Ca^{2+} , given that the crystal submitted to the X-ray diffraction experiments was obtained in a condition where this ion was not added. In fact, the displacement of the Ca^{2+} ion in the CB2 monomers A and D is apparently caused by the clash between the CB2 Ca^{2+} -binding loops and the CB1 Gly53–Cys91 regions of the dimers 1 and 2, which causes a modification in the angles φ/ψ of Trp31(A) and Trp31(D). These residues are placed in the generously allowed regions of the Ramachandran plot, presenting, respectively, φ/ψ values of $71.3^\circ/173.9^\circ$ and $70.2^\circ/171.3^\circ$ in the monomers A and D. In the monomers B and C, Trp31(A) and Trp31(D) were replaced by Gly residues in consequence of the lack of electronic density for the Trp side chains. In spite of this, the main chains of these Gly residues show an unambiguously orientation, with φ/ψ values of $-110.0^\circ/39.8^\circ$ and $-48.8^\circ/139.9^\circ$ in the monomers B and C, respectively (these angles are in the additionally allowed and most favored regions of the Ramachandran plot). Hence, these data reinforce the possible importance of the Trp31 stereochemical configuration for the establishment of an appropriated geometry of the Ca^{2+} -binding loop and the subsequent coordination of the Ca^{2+} ion.

Role of the isoforms in the quaternary structure and biological activities of CB

Another interesting feature is the role played by the residues Ser1 and Glu92—respectively found in CB2 (monomers A and D) and CB1 (monomers B and C) isoforms—in the CB1/CB2 quaternary assembling. These residues form two mutual salt bridges that are involved in the stabilization of the dimers 1 and 2 (see Fig. 7). Since CB1 and CB2 may be found in the venom of a single *C. d. terrificus* specimen,^{6,15,16} it is possible that, after the Cro dissociation at the neural synapse,⁸ the complexation of these isoforms occurs also *in vivo*. Thus, it is reasonable that the isoforms CB1 and CB2 operate as complementary parts of a functional molecular complex, whose tetrameric or even the dimeric configuration (when in lower concentrations, as suggested by the DLS

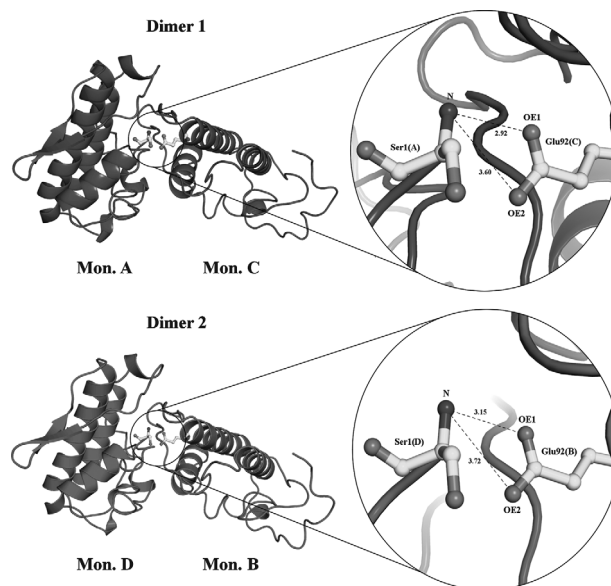
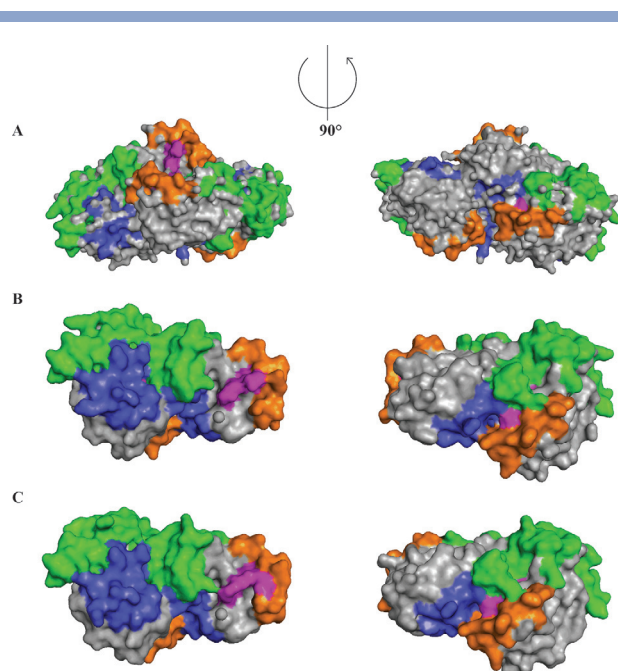


Figure 7

Salt bridges formed between the residues Ser1 (CB2 isoforms—monomers A and D) and Glu92 (CB1 isoforms—monomers B and C) (the distances are in Å). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

data) is essential to the biological activities performed by CB, especially for the neurotoxic activity. It is known the subunit CB binds to a large number of receptors at the presynaptic membrane of several organisms, inhibiting the release of acetylcholine and, consequently, promoting a neuro-muscular blockade.⁴⁴ Nevertheless, the exact location of the neurotoxic sites at the snake venom PLA₂s with this pharmacological activity is yet a speculative subject. On the basis of the amino acid sequences of three ammodytoxins (single chain PLA₂ neurotoxins), Krizaj *et al.*,⁴⁵ identified the C-terminal of these enzymes as the neurotoxic site. In another study, Carredano *et al.*⁴⁶ showed that some group I neurotoxic snake venom PLA₂s present invariant residues in the region 70–100, which comprises the β -sheet and its vicinity, in comparison with similar non-neurotoxic toxins. Using a theoretical model of ammodytoxin A from *Vipera ammodytes ammodytes*, Chioato and Ward,⁴⁷ concluded the presynaptic neurotoxic PLA₂s possess a more extensive biologically active surface which also includes the C-terminal segment, the Ca^{2+} -binding loop, a short helical turn, and another positions in the N-terminal helix and β -wing. In contrast to the previous studies cited, Rouault *et al.*⁴⁸ attributed to the N-terminal portion the main contribution to the neurotoxic activity performed by a PLA₂ from *Oxyuranus scutellatus scutellatus*, thus minimizing the role played by the C-terminal loop and other regions. All of these regions (N and C-terminal regions, Ca^{2+} -binding loop and β -wing) are exposed on the sur-

F7

**Figure 8**

N-termini (blue), Ca^{2+} -binding loops (magenta), β -wings (green) and *C*-termini (orange) portions exposed on the surface of the quaternary assemblies: (A) Tetramer; (B) Dimer 1 (monomers A (CB2) and C (CB1)); (C) Dimer 2 (monomers B (CB1) and D (CB2)).

F8

face of the tetramer and dimers 1 and 2, indicating the assemblies present a favorable arrangement to hold the neurotoxic activity of the subunit CB (see Fig. 8). Indeed, the quaternary conformations resulted from the association of the isoforms may even enhance the neurotoxicity of the toxin CB by the creation of new binding sites, which are not found in the isolated monomers. These possible additional binding sites could increase the affinity of the complexes formed by the isoforms to the presynaptic membrane.

In fact, the structural study of CB1/CB2 crystallographic model showed the possible occurrence of an interesting process of molecular evolution: the isoforms CB1 and CB2 probably evolved to form a molecular complex in order to support or maximizing a main activity (neurotoxicity) in detriment of the catalytic activity, which is certainly affected by the displacement of the Ca^{2+} -binding of one monomer in each dimer caused by the oligomerization.

CONCLUSIONS

CB1/CB2 crystallographic model analysis brought to the light some insights into the possible role played by the different CB isoforms and their oligomeric states in the biological activities of Cro and its subunits. The tetrameric crystallographic model is the most likely biologi-

cal unit as also demonstrated by the SDS-PAGE, dynamic light scattering (DLS), free energy variations, and buried surface calculations. Furthermore, the sites most probable related to the neurotoxic activity (N and C-terminal regions, Ca^{2+} -binding loops and β -wings) are exposed on the surface of the tetramer and its isolated constituent dimers. This fact shows that tetrameric and even dimeric assemblies may be important to the biological activities performed by CB. Thus, the quaternary conformations resulted from the association of the isoforms may increase the neurotoxicity of the toxin CB by the creation of new binding sites not found in the isolated monomers. These possible additional binding sites could improve the affinity of the complexes formed by the isoforms to the presynaptic membrane.

Finally, on the basis of the crystallographic evidences, it was also possible to recognize an interesting process of molecular evolution, in which the isoforms CB1 and CB2 possibly evolved to form a molecular complex in order to support or maximizing a main activity (neurotoxicity) in detriment of the catalytic activity.

Further molecular evolution, spectroscopical and site-directed mutagenesis studies could be useful to confirm the hypothesis here presented and unveil other important information about the influence of the oligomerization in the biochemical and pharmacological activities of the PLA₂ in general.

REFERENCES

- Schaloske RH, Dennis EA. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta* 2006;1761:1246–1259.
- Gutiérrez JM, Lomonte B. Phospholipase A₂ myotoxins from Bothrops snake venoms. In: Kini RM, editor. *Venom phospholipase A₂ enzymes: structure, function and mechanism*. Chichester: Wiley; 1997. pp 321–352.
- Owby CL. Structure, function and biophysical aspects of the myotoxins from snake venoms. *J Toxicol Toxin Rev* 1998;17:1003–1009.
- Valentin E, Lambeau G. What can venom phospholipase A₂ tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipase A₂? *Biochimie* 2000;82:815–831.
- Slotta KH, Fraenkel-Conrat HL. Schlangengifte. III. Mitteilung: Reinigung und Kristallisation des Klapperschlangengiftes. *Ber Dtsch Chem Ges B* 1938;71:1076–1081.
- Faure G, Bon C. Crotoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*: purification of several isoforms and comparison of their molecular structure and of their biological activities. *Biochemistry* 1988;27:730–738.
- Gopalakrishnakone P, Dempster DW, Hawgood BJ, Elder HY. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A₂ complex. *Toxicon* 1984;22:85–98.
- Bon C. Multicomponent neurotoxic phospholipases A₂. In: Kini RM, editor. *Venom phospholipase A₂ enzymes: structure, function and mechanism*. Chichester: Wiley; 1997. pp 269–285.
- Monteiro HSA, da Silva IMSC, Martins AMC, Fonteles MC. Effects of *Crotalus durissus terrificus* venom and crotoxin on the isolated rat kidney. *Braz J Med Biol Res* 2001;34:1347–1352.
- Hendon RA, Fraenkel-Conrat H. Biological role of the two components of Cro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971;68:1560–1563.

Crystal Structure of the Crotoxin B

11. Corin RE, Viskatis LJ, Vidal JC, Etcheverry MA. Cytotoxicity of Cro on murine erythroleukemia cells in vitro. *Invest New Drugs* 1993;11:11–15.
12. Rudd CJ, Viskatis LJ, Vidal JC, Etcheverry MA. In vitro comparison of cytotoxic effects of Cro against three human tumors and normal human epidermal keratinocyte cell line. *Invest New Drugs* 1994;12:183–184.
13. Cura JE, Blanzaco DP, Brisson C, Cura MA, Cabrol R, Larrateguy L, Mendez C, Mendez C, Sechi JC, Siveira JS, Theiller E, de Roodt AR, Vidal JC. Phase I and pharmacokinetics study of Cro (cytotoxin PLA₂, NSC-624244) in patient with advanced cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:1033–1041.
14. Zhang HL, Han R, Chen ZX, Chen BW, Gu ZL, Reid PF, Raymond LN, Qin ZH. Opiate and acetylcholine-independent analgesic actions of crotoxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon* 2006;48:175–182.
15. Faure G, Bon C. Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon* 1987;25:229–234.
16. Faure G, Choumet V, Bouchier C, Camoin L, Guillaume JL, Monegier B, Vuilhorgne M, Bon C. The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Eur J Biochem* 1994;223:161–164.
17. Soares AM, Rodrigues VM, Homsí-Brandeburgo MI, Toyama MH, Lombardi FR, Arni RK, Giglio JR. A rapid procedure for the isolation of the Lys-49 myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activities. *Toxicon* 1998;36:503–514.
18. Soares AM, Mancin AC, Cecchini AL, Arantes EC, França SC, Gutiérrez JM, Giglio JR. Effects of chemical modifications of crotoxin B, the phospholipase A₂ subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on its enzymatic and pharmacological activities. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33:877–888.
19. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–685.
20. Jancarik J, Kim SH. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J Appl Cryst* 1991;24:409–411.
21. Ducruix A, Giegé R. Crystallization of nucleic acids and proteins (a practical approach). New York: Oxford University Press; 1992. 464 p.
22. Marchi-Salvador DP, Corrêa LC, Salvador GHM, Magro AJ, Oliveira CZ, Iulek J, Soares AM, Fontes MRM. Preliminary X-ray crystallographic studies of a tetrameric phospholipase A₂ formed by two isoforms of crotoxin B from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Acta Crystallogr F* 2007;63:1067–1069.
23. Otwinowski Z, Minor W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol* 1997;276:307–326.
24. Brünger AT, Adams PD, Clore GM, DeLano WL, Gros P, Grosse-Kunstleve RW, Jiang JS, Kuszewski J, Nilges M, Pannu NS, Read RJ, Rice LM, Simonson T, Warren GL. Crystallography and NMR system (CNS): a new software system for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D* 1998;54:905–921.
25. Navaza J. AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Crystallogr. A* 1994;50:157–163.
26. da Silva-Giotto MT, Garrat RC, Oliva G, Mascarenhas YP, Giglio JR, Cintra ACO, de Azevedo WF, Jr, Arni RK, Ward RJ. Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: conformational changes in bothropstoxin I, a dimeric Lys49-phospholipase A₂ homologue. *Proteins: Struct Funct Genet* 1998;30:442–454.
27. Jones TA, Bergdoll M, Kjeldgaard M. O: a macromolecule modeling environment. In: Bugg CE, Ealick SE, editors. *Crystallographic and modeling methods in molecular design*. New York: Springer-Verlag; 1990. pp 189–195.
28. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallogr* 1993;26:283–291.
29. Krissinel E, Henrick K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol* 2007;372:774–797.
30. DeLano WL. The PyMOL molecular graphics system. San Carlos, CA: Delano Scientific LLC; 2002. Available at <http://www.pymol.org>.
31. Ramachandran GN, Sasisekharan V. Conformation of polypeptides and proteins. *Adv Protein Chem* 1968;23:283–438.
32. Renetseder R, Brunie S, Dijkstra BW, Drenth J, Sigler PB. A comparison of the crystal structures of phospholipases A₂ from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. *J Biol Chem* 1985;260:11627–11636.
33. Nicholas KB, Nicholas HB, Jr, Deerfield DW, II. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *EMBNETNEWS* 1997;4:1–4.
34. Scott DL. Phospholipase A₂: structure and catalytic properties. In: Kini RM, editor. *Venom phospholipase A₂ enzymes: structure, function and mechanism*. Chichester: Wiley; 1997. pp 321–352.
35. Steiner RA, Rozeboom HJ, de Vries A, Kalk KH, Murshudov GN, Wilson KS, Dijkstra BW. X-ray structure of bovine pancreatic phospholipase A₂ at atomic resolution. *Acta Crystallogr D* 2001;57:516–526.
36. Jasti J, Paramasivam M, Srinivasan A, Singh TP. Structure of an acidic phospholipase A₂ from Indian saw-scaled viper (*Echis carinatus*) at 2.6 Å resolution reveals a novel intermolecular interaction. *Acta Crystallogr D* 2004;60:66–72.
37. Pan YH, Epstein TM, Jain MK, Bahnson BJ. Five coplanar anion binding sites on one face of phospholipase A₂: relationship to interface binding. *Biochemistry* 2001;40:609–617.
38. Sanchez SA, Chen Y, Muller JD, Gratton E, Hazlett TL. Solution and interface aggregation states of *Crotalus atrox* venom phospholipase A₂ by two-photon excitation fluorescence correlation spectroscopy. *Biochemistry* 2001;40:6903–6911.
39. Chandra V, Jasti J, Kaur P, Betzel Ch, Srinivasan A, Singh TP. First structural evidence of a specific inhibition of phospholipase A₂ by α -tocopherol (vitamin E) and its implications in inflammation: crystal structure of the complex formed between phospholipase A₂ and α -tocopherol at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol* 2002;320:215–222.
40. Magro AJ, Murakami MT, Marcussi S, Soares AM, Arni RK, Fontes MRM. Crystal structure of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A₂ in the monomeric and dimeric states: insights into its oligomeric state. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;323:24–31.
41. Magro AJ, Takeda AAS, Soares AM, Fontes MRM. Structure of BthA-I complexed with *p*-bromophenacyl bromide: possible correlations with lack of pharmacological activity. *Acta Crystallogr D* 2005;61:1670–1677.
42. Jabeen T, Sharma S, Singh N, Singh RK, Kaur P, Perbandt M, Betzel Ch, Srinivasan A, Singh TP. Crystal structure of a calcium-induced dimer of two isoforms of cobra phospholipase A₂ at 1.6 Å resolution. *Proteins: Struct Funct Bioinform* 2005;59:856–863.
43. Tang L, Zhou YC, Lin ZJ. Structure of agkistrodotoxin in an orthorhombic crystal form with six molecules per asymmetric unit. *Acta Crystallogr D* 1999;55:1986–1996.
44. Kini RM. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. *Toxicon* 2003;42:827–840.
45. Krizaj I, Turk D, Ritonja A, Gubensek F. Primary structure of ammodytoxin C further reveals the toxic site of ammodytoxin. *Biochim Biophys Acta* 1989;999:198–202.
46. Carredano E, Westerlund B, Persson B, Saarinen M, Ramaswamy S, Eaker D, Eklund H. The three-dimensional structures of two toxins from snake venom throw light on the anticoagulant and neurotoxic sites of phospholipase A₂. *Toxicon* 1998;36:75–92.
47. Chioato L, Ward RJ. Mapping structural determinants of biological activities in snake venom phospholipases A₂ by sequence analysis and site directed mutagenesis. *Toxicon* 2003;42:869–883.
48. Rouault M, Rash LD, Escoubas P, Boilard E, Bollinger J, Lomonte B, Maurin T, Guillaume C, Canaan S, Deregnacourt C, Schrével J, Doglio A, Gutiérrez JM, Lazdunski M, Gelb MH, Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 2001;17:1244–1245.

APÊNDICE III

Preliminary X-ray crystallographic studies of a Lys49-phospholipase A₂ homologue from *Bothrops pirajai* venom complexed with p-bromophenacyl bromide and alpha-tocopherol inhibitors.

Preliminary X-Ray Crystallographic Studies of a Lys49-Phospholipase A₂ Homologue from *Bothrops pirajai* Venom Complexed with *p*-Bromophenacyl Bromide and α -Tocopherol Inhibitors

Juliana I. dos Santos¹, Daniela P. Marchi-Salvador¹, Carlos A.H. Fernandes¹, Lucas B. Silveira², Andreimar M. Soares² and Marcos R.M. Fontes^{1,*}

¹Departamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, UNESP, C. P. 510, CEP 18618-000, Botucatu-SP, Brazil;

²Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, FCFRP, USP, Ribeirão Preto/SP – Brazil

Abstract: PrTX-I, a non-catalytic and myotoxic Lys49-PLA₂ from *Bothrops pirajai* venom has been crystallized alone and in complex with bromophenacyl bromide (BPB), α -tocopherol and α -tocopherol acetate inhibitors. These crystals have shown to diffract X-rays between 2.34 and 1.65 Å resolution. All complexes crystals are isomorphous and belong to the space group P2₁ whereas native PrTX-I crystals belong to the P3₁21.

Keywords: Crystallization, X-ray crystallography, Lys49-phospholipase A₂, *Bothrops pirajai* venom, myotoxicity, *p*-bromophenacyl bromide, *p*-BPB, α -tocopherol, vitamin E.

INTRODUCTION

Phospholipases A₂ (PLA₂s, EC 3.1.1.4) are enzymes encountered in a variety of biological fluids, particularly pancreatic secretions, inflammatory exudates, and reptile and arthropod venoms [1]. PLA₂s have high medical-scientific interest due to their involvement in several inflammatory human diseases and envenomation by snake and bee venoms. In Latin America venomous snakes, those of the genus *Bothrops* are responsible for approximately 85% of ophidian accidents [2,3]. These envenomations are characterized by prominent local tissue damage due to myonecrosis, hemorrhage, and edema [1]. PLA₂s are the main components of these venoms and, in addition to their catalytic role, they show a broad spectrum of pharmacological activities, such as neurotoxicity, myotoxicity and cardiotoxicity. They also affect coagulation cascade, platelet aggregation and the inflammatory response [4,5]. Some of these activities are correlated to the enzymatic activity and other are completely independent [6,7]. PLA₂s with skeletal muscle-damaging (myotoxicity) activity are widely distributed among venomous snakes and they can be subdivided into, at least, three subclasses: (a) the Asp49 enzymes with high catalytic activity, (b) the Ser49 enzymes with lower catalytic activity and (c) the Lys49 enzymes with very limited or not measurable catalytic activity [8,9]. The most abundant protein in many bothropic venoms is a natural mutant where the Asp49 was changed to Lys (subclass c). This natural mutation prevents calcium binding and the protein lacks catalytic activity. However, this Lys49-PLA₂s are capable of destabilizing the integrity of membranes and provoke release from liposomes [10].

PLA₂s are also one of the enzymes involved in the production of eicosanoids. These molecules have physiological effects at very low concentrations; however an increase in their concentration can lead to the inflammatory state [11]. Then, the study of specific PLA₂s inhibitors can be important in the production of structure-based anti-inflammatory agents. The α -tocopherol (vitamin E) is involved in the regulation of the production of eicosanoids by inhibition of both PLA₂ [12] and cyclooxygenase activities [13]. Vitamin E has been used to slow the progression of Alzheimer's and Parkinson's diseases [14, 15]. It has been considered that vitamin E acts by inhibiting PLA₂ activity and stabilizing neural membranes and synapses. Then, it is very important to know the exact way the interaction of this inhibitor with PLA₂s occurs. The first attempt with this goal was the structural study of the complex formed by a dimeric PLA₂ from *D.r. pulchella* and α -tocopherol [16]. In this structure it was observed α -tocopherol bound to the catalytic site for only one monomer while the other was inaccessible due the conformation of Trp31 residue. Kinetics and inhibition studies showed to be in agreement with the crystallographic results [16]. Recently, we performed studies with the PrTX-I in the presence of α -tocopherol and observed myotoxic activity was also reduced to approximately 50 % (data not shown).

The effect of chemical modifications on the pharmacological properties of PrTX-I from *B. pirajai* and other Lys49-PLA₂s has been studied [17]. Alkylation of His48 of PrTX-I residue with *p*-bromophenacyl bromide (BPB) reduced 46%, 92% and 16% of its myotoxic, cytotoxic and edema inducing activity, respectively, with no significant change on its liposome-disrupting activity. Similar results were obtained for other Lys49-PLA₂s [17,18]. This same inference may be drawn regarding the almost complete abolishment of the PLA₂ and pharmacological activities for both Asp49 BthTX-II and BthA-I treated with BPB [17,19]. The crystal structure of bovine PLA₂ complexed to BPB, demonstrated that this

*Address correspondence to this author at the Departamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, UNESP, C. P. 510, CEP 18618-000, Botucatu-SP, Brazil; Tel: +55.14.38156254; Fax: +55.14.38153744; E-mail: fontes@ibb.unesp.br

enzyme was structurally modified by the ligand [20]. Similarly, Magro *et al.* [21] solved the structure of BthA-I, an acidic catalytic PLA₂, chemically modified with BPB and showed important tertiary and quaternary structural changes in this enzyme. The abolition of pharmacological activities (including anticoagulant, hypotensive effect and platelet aggregation inhibition) after the ligand interaction may be related to the oligomeric structural changes.

In the past few years several crystal structures of myotoxic Lys49-PLA₂s from *Bothrops* genus have been solved [22-30]. However, the structural bases of toxicological effects seem to be impossible to interpret just by analysis of native Lys49-PLA₂s structures. Recently, MjTX-II has been co-crystallized with stearic acid and the crystal structure was solved demonstrating that the Lys122 is fundamental to keep the fatty acid in the active site [28]. It has been observed by site-direct mutagenesis in the Lys49-PLA₂ BthTX-I that the Lys122→Ala mutation alters both myotoxic and Ca⁺ independent membrane damage activities [31]. Therefore, detailed studies with other Lys49-PLA₂s and different ligands seems to be fundamental for understanding the role of C-terminal region, particularly involving the Lys122 residue.

The crystal structure of native PrTX-I has been solved at 2.8 Å resolution [23]. However, the coordinates are not available in the RCSB Protein Data Bank or with the authors in order to perform structural comparative studies with different complexes.

In the present paper, we describe the crystallization and X-ray diffraction data collection of PrTX-I from *Bothrops pirajai* venom in the native form, chemically modified with *p*-bromophenacyl bromide (BPB), complexed to α -tocopherol and to α -tocopherol acetate. This study can add insights into the myotoxic, cytotoxic and other pharmacological activities related to the structural changes of this protein, particularly involving the C-terminal and "active site" regions.

MATERIAL AND METHODS

Isolation and Chemical Modification

PrTX-I was isolated from *Bothrops pirajai* snake venom as previously described [32]. Modification of His48 with *p*-bromophenacyl bromide (BPB) was carried out as previously described [33]. Briefly, approximately 3 mg of the PrTX-I were dissolved in 1 mL of 0.1 M ammonium bicarbonate pH 8.0, and 150 μ L of BPB at 0.8 mg/mL ethanol was added. The mixture was incubated for 24 hr and, the excess reagent was removed by ultrafiltration, followed by lyophilization.

Crystallization

The lyophilized sample of PrTX-I was dissolved in ultra-pure water at a concentration of 12 mg/ml. The sparse matrix method [34] was used to perform initial screening of the crystallization conditions (Crystal Screens I and II, Hampton Research). All crystals were obtained by the conventional hanging drop vapor diffusion method [35] where 1 μ l of protein and 1 μ l reservoir drop were mixed and equilibrated against 500 μ l of the same precipitant solution. Additionally, for PrTX-I- α T and PrTX-I- α T acetate complexes, 2 μ l of α -tocopherol or α -tocopherol acetate was added to the pro-

tein/reservoir drop. PrTX-I, PrTX-I- α T and PrTX-I- α T acetate were crystallized using the same condition: 0.2 M Lithium sulfate, 30% (w/v) polyethylene glycol 4000 and 0.1 M Tris-HCl pH 7.8 at 298 K after two months. PrTX-I/BPB complex was crystallized using a solution containing 20% (v/v) isopropanol, 23% (w/v) polyethylene glycol 4000 and 0.1M sodium citrate pH 5.8 at 291 K after two months.

X-Ray Data Collection and Processing

X-ray diffraction data of all crystals were collected at a wavelength of 1.421 Å (at 100 K) using a Synchrotron Radiation Source (MX1 station - Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, LNLS, Campinas, Brazil) and a MAR CCD imaging-plate detector (MAR Research). The crystals were mounted in nylon loop and flash-cooled in a stream of nitrogen at 100 K using no cryoprotectant. The data were processed using HKL program package [36].

RESULTS AND DISCUSSION

The data collection statistics are shown in Table 1. The data set are 94.9% to 98.9% complete at 2.34 to 1.65 Å resolution. All complexes crystals are isomorphous and belong to the space group P2₁, while native PrTX-I crystals belong to the P3₁21.

Packing parameter calculations based on a protein molecular weight indicate the presence of a dimer in the asymmetric unit for all crystals. This corresponds to a Matthews's coefficient [37] of 1.94 to 2.15 Å³/Da within the expected range for typical protein crystals (assuming a value of 0.74 cm³/g for the protein partial specific volume). The crystal structures were determined by molecular replacement techniques implemented in the program AMoRe [38] using the coordinates of a monomer of native PrTX-II. A well-ordered electron density for BPB molecule bound to His48 was observed for both monomers of PrTX-I-BPB complex (Fig. 1A) and for α -tocopherol molecule in the hydrophobic substrate channel for both monomers of PrTX-I- α T and PrTX-I- α T acetate complexes (Fig. 1B). The chroman ring from α -tocopherol molecules are in the "active site" of PrTX-I- α T and PrTX-I- α T acetate complexes (Fig. 1B).

In conclusion, PrTX-I, a Lys49-PLA₂s from *Bothrops pirajai* was crystallized and X-ray diffraction data were collected at 1.65 Å. PrTX-I chemically modified with *p*-bromophenacyl bromide was crystallized and the toxin was also co-crystallized with α -tocopherol and α -tocopherol acetate inhibitors. X-ray diffraction data were collected for the complexes crystals (2.34-1.87 Å range), and electron density calculations showed that the BPB ligand binds covalently to the His48 residue of PrTX-I/BPB complex, while both α -tocopherol and α -tocopherol acetate are in hydrophobic substrate-binding channel. All complexes crystals are isomorphous and belong to the space group P2₁ while native PrTX-I crystals belong to the P3₁21. This suggests the inhibitors binding led to changes in the quaternary structure resulting in an alternative conformation for the protein. It has been shown the BPB ligand binds covalently to the His48 residue of catalytic sites of PLA₂s [20,21]. Intriguingly, the myotoxic and cytotoxic activities of non-catalytic PrTX-I decrease dramatically after the ligand binding [17]. Possible explanations for this fact are that the BPB or α -tocopherol

Table 1. X-Ray Diffraction Data Collection and Processing Statistics

	PrTX-I	PrTX-I/BPB	PrTX-I/ α T	PrTX-I/ α T acetate
Unit Cell (Å)	a = b = 55.9 c = 127.9	a=38.6 b=70.0 c=43.8 β =102.6°	a = 38.9 b = 71.4 c = 44.3 β = 102.3°	a = 38.7 b = 70.5 c = 43.7 β = 102.0°
Space Group	P3 ₁ 21	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁
Resolution (Å)	40-1.65 (1.71-1.65) ^a	40-2.34 (2.42-2.34) ^a	40-1.87 (1.94-1.87) ^a	40-2.13 (2.21-2.13) ^a
Unique reflections	27251 (2648) ^a	9854 (916) ^a	19407 (1927) ^a	12848 (1209) ^a
Completeness (%)	94.9 (94.0) ^a	98.6 (94.0) ^a	98.9 (98.2) ^a	98.5 (93.1) ^a
R _{merge} ^b (%)	8.4 (52.5) ^a	10.6 (38.3) ^a	6.0 (20.6) ^a	10.1 (30.1) ^a
Radiation source	Synchrotron (LNLS – MX1)			
Data collection temperature (K)	100			
Sigma cutoff (I) for data processing ^c	-3			
I/ σ (I)	12.0 (2.0) ^a	9.4 (2.0) ^a	19.3 (3.9) ^a	13.7 (3.9) ^a
Matthews coefficient V _M (Å ³ /Dalton)	2.06	1.94	2.15	2.09
Molecules in the asymmetric unit	2			
Solvent content (%)	40.3	39.6	42.7	41.1

^aNumbers in parenthesis are for the highest resolution shell. ^bR_{merge} = $\sum_{hkl}(\sum_i(I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle)) / \sum_{hkl,i} \langle I_{hkl,i} \rangle$, where $I_{hkl,i}$ is the intensity of an individual measurement of the reflection with Miller indices h, k and l, and $\langle I_{hkl} \rangle$ is the mean intensity of that reflection. Calculated for $I > -3\sigma(I)$. ^cData processing using the HKL suite [36].

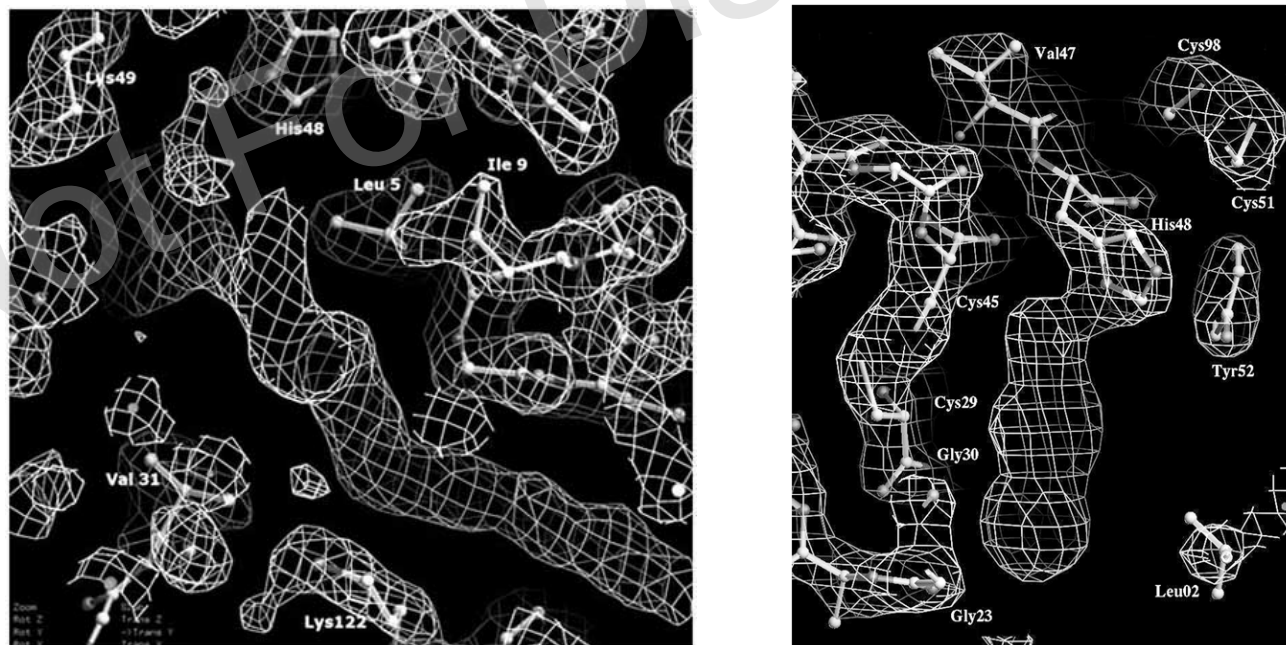


Figure 1. $|F_{obs}| - |F_c|$ electron density map contoured at 1.2 standard deviations in the “active site” region of monomer A of (A) PrTX-I/BPB complex showing the His48 residue covalently bound with BPB, (B) PrTX-I/ α -tocopherol complex in the hydrophobic substrate channel region. Figure generated using “O” program [39].

binding may result in conformational changes of C-terminal residues (e.g. Lys122) which may be indirectly interacting with the “active site” affecting the toxic mechanisms. Then,

detailed studies with these complexes might add insights into the myotoxic and cytotoxic mechanisms of Lys49-PLA₂s and, eventually, clarify the role of C-terminal region.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP) and Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas-SP).

ABBREVIATIONS

- PLA₂ = Phospholipase A₂
 PrTX-I = Piratoxin-I
 PrTX-I-BPB = Complex PrTX-I and *p*-bromophenacyl bromide
 PrTX-I- α T = Complex PrTX-I and α -tocopherol

REFERENCES

- [1] Rosenberg, P. (1990), in *Handbook of Toxinology* (W. Shier, D. Mebs Eds.), pp. 67-277. Marcel Dekker, New York.
- [2] Ferreira, M.L. Moura-da-Silva, A.M. França, F.O.S. Cardoso, J.L. and Mota, I. (1992) *Toxicon* 30, 1603-1608.
- [3] Ribeiro, L.A., Albuquerque, M.J. and Pires de Campos, V.A.F. (1998) *Rev. Ass. Med. Brasil* 44, 312-318.
- [4] Kini, R.M. (1997), in *Phospholipase A₂: a complex multifunctional protein puzzle: Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism* (R.M. Kini Ed.), pp. 1-28, Wiley, Chichester.
- [5] Andrião-Escarso, S.H., Soares, A.M., Fontes, M.R.M., Fuly, A.L., Corrêa, F.M.A., Rosa, J.C., Greene, L.J. and Giglio, J.R. (2002) *Biochem. Pharmacol.* 64 723-732.
- [6] Kini, R.M. and Evans, H.J. (1989) *Toxicon* 27, 613-635.
- [7] Soares, A.M. and Giglio, J.R. (2004) *Toxicon* 42, 855-868.
- [8] Shimohigashi, Y., Tani, A., Matsumoto, H., Nakashima, K. and Yamaguchi, Y. (1995) *J. Biochem.* 118, 1037-1044.
- [9] Ownby, C.L.H., Selistre de Araujo, S., White, S.P. and Fletcher, J.E. (1999) *Toxicon* 37, 411-445.
- [10] Rufini, S., Cesaroni, P., Desideri, R.F., Gubensek, F., Gutiérrez, J.M., Luly, P., Maassoud, R., Morero, R. and Pedersen, J.Z. (1992) *Biochemistry* 31, 12424-12430.
- [11] Needleman, P., Turk, J., Jakschik, B.A., Morrison, A.R. and Lefkowitz, J.B. (1986) *Annu. Rev. Biochem.* 55, 69-102.
- [12] Pentland, A.P. Morrison, A.R. Jacobs, S.C. Hruza, L.L. Hebert, J.S. and Packer, L. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 1603-1608.
- [13] Abate, A., Yang, G., Dennery, P.A., Oberle, S. and Schroder, H. (2000) *Free Radic. Biol. Med.* 29, 1135-1142.
- [14] Ebadi, M., Srinivasan, S.K. and Baxi, M.D. (1996) *Prog. Neurobiol.* 48, 1-19.
- [15] Sano, M., Ernesto, C., Thomas, R.G., Klauber, M.R., Schafer, K., Grundman, M., Woodbury, P., Growdon, T., Cotman, C.W., Pfeiffer, E., Schneider, L.S. and Thal, L.J. (1997) *N. Engl. J. Med.* 336, 1216-1222.
- [16] Chandra, V. Jast, J. Kaur, P. Betzel, C. Srinivasan, A. and Singh, T.P. (2002) *J. Mol. Biol.* 320, 215-222.
- [17] Soares, A. M. and Giglio, J. R. (2003) *Toxicon*, 42, 855-868.
- [18] Soares, A.M., Guerra-Sá, R., Borja-Oliveira, C. R., Rodrigues, V.M., Rodrigues-Simioni, L., Rodrigues, V., Fontes, M.R.M., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M. and Giglio, J. R. (2000). *Arch. Biochem. Biophys.*, 378, 201-209.
- [19] Andrião-Escarso, S. H., Soares, A.M., Fontes, M.R.M., Fuly, A.L., Corrêa, F.M.A., Rosa, J. C., Greene, L. J. and Giglio, J. R. (2002) *Biochem. Pharmacol.* 64, 723-732.
- [20] Reneseder, R., Dijkstra, B.W., Huizunga, K.H., Kalk, K.H. and Drenth, J. (1988) *J. Mol. Biol.* 200, 181-188.
- [21] Magro, A.J., Takeda, A.A.S., Soares, A.M. and Fontes, M.R.M. (2005) *Acta Cryst. D61*, 1670-1677.
- [22] Arni, R.K., Ward, R.J. and Gutiérrez, J.M. (1995) *Acta Crystallogr. D51*, 311-317.
- [23] de Azevedo Jr., W.F., Ward, R.J., Canduri, F., Soares, A.M., Giglio, J.R. and Arni, R.K. (1998) *Toxicon*, 36, 1395-1406.
- [24] da Silva-Giotto, M.T., Garrat, R.C., Oliva, G., Mascarenhas, Y.P., Giglio, J.R., Cintra, A.C.O., de Azevedo Jr., W.F., Arni, R.K. and Ward, R.J. (1998) *Prot. Struc. Func. Gen.* 30, 442-454.
- [25] Arni, R.K., Fontes, M.R.M., Barberato, C., Gutiérrez, J.M., Díaz-Oreiro, C., Ward, R.J. (1999) *Arch. Biochem. Biophys.* 366, 177-182.
- [26] Lee, W.H., da Silva-Giotto, M.T., Marangoni, S., Toyama, M.H., Polikarpov, I. and Garratt, R.C. (2001) *Biochemistry* 40, 28-36.
- [27] Magro, A.J., Soares, A.M., Giglio, J.R. and Fontes, M.R.M. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311, 713-720.
- [28] Watanabe, L., Soares, A.M., Ward, R.J., Fontes, M.R.M. and Arni, R.K. (2005) *Biochimie* 87, 161-167.
- [29] Marchi-Salvador, D. P., Silveira, L. B., Soares, A.M. and Fontes, M.R.M. (2005) *Acta Cryst. F61*, 882-884.
- [30] Marchi-Salvador, D. P., Fernandes, C. A. H., Amui, S. F., Soares, A. M. and Fontes, M.R.M. (2006) *Acta Cryst. F62*, 600-603.
- [31] Chioato, L., Oliveira, de A.H., Ruller, R., Sá, J.M. and Ward, R.J. (2002) *Biochem J.* 366, 971-976.
- [32] Mancuso, L.C., Correa, M.M., Vieira, C.A., Cunha, O.A.B., Lachat, J.J., Selistre de Araújo, H.S., Ownby, C.L. and Giglio, J.R. (1995) *Toxicon* 33, 615-626.
- [33] Díaz-Oreiro, C. and Gutiérrez, J.M. (1997) *Toxicon* 35, 241-252.
- [34] Jancarik, J. and Kim, S. -H. (1991) *J. Appl. Cryst.* 24, 409-411.
- [35] MacPherson, A. (1982) Wiley, New York.
- [36] Otwinowski, Z. and Minor, W. (1997) *Meth. Enzymol.* 276, 307-326.
- [37] Matthews, B.W. (1968) *J. Mol. Biol.* 33, 491-497.
- [38] Navaza, J. (1994) *Acta Cryst. A50*, 157-163.
- [39] Jones, T.A., Bergdoll, M. and Kjeldgaard, M. (1990). *Crystallographic and Modeling Methods in Molecular Design*, edited by C. E. Bugg & S. E. Ealick, pp. 189-195. New York: Springer-Verlag.

APÊNDICE IV

**Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a myotoxic
Lys49-PLA₂ from *Bothrops jararacussu* venom complexed with *p*-
bromophenacyl bromide.**

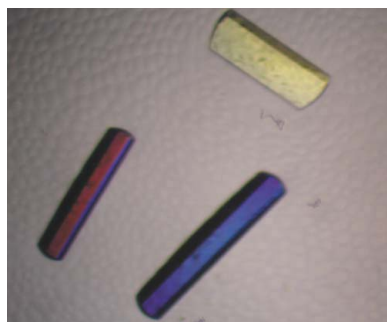
D. P. Marchi-Salvador,^a
C. A. H. Fernandes,^a S. F. Amui,^b
A. M. Soares^b and
M. R. M. Fontes^{a*}

^aDepartamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, UNESP, CP 510, CEP 18618-000, Botucatu-SP, Brazil, and ^bDepartamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, FCFRP, USP, Ribeirão Preto/SP, Brazil

Correspondence e-mail: fontes@ibb.unesp.br

Received 21 March 2006

Accepted 15 May 2006



© 2006 International Union of Crystallography
All rights reserved

Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a myotoxic Lys49-PLA₂ from *Bothrops jararacussu* venom complexed with *p*-bromophenacyl bromide

For the first time, a non-catalytic and myotoxic Lys49-PLA₂ (BthTX-I from *Bothrops jararacussu* venom) has been crystallized with BPB inhibitor. X-ray diffraction data were collected and electron-density calculations showed that the ligand is bound to the His48 residue. BthTX-I with His48 chemically modified by BPB shows strongly reduced myotoxic and cytotoxic activities. This suggests a biological correlation between the modification of His48, which is associated with catalytic activity of PLA₂s, and other toxicological activities of Lys49-PLA₂s.

1. Introduction

Ophidian accidents involving snakes of the genus *Bothrops* are characterized by prominent local tissue damage owing to myonecrosis, haemorrhage and oedema (Rosenberg, 1990). Phospholipases A₂ (PLA₂s; EC 3.1.1.4) are the main components of these venoms and, in addition to their catalytic role, they show a broad spectrum of pharmacological effects such as neurotoxicity, myotoxicity and cardiotoxicity. They also affect anticoagulation, hypotension, platelet aggregation and inflammatory response (Gutiérrez & Lomonte, 1997; Ownby, 1998; Andrião-Escarso *et al.*, 2002). Some of these activities are apparently correlated with the enzymatic activity, while others are completely independent (Kini & Evans, 1989; Soares *et al.*, 2004).

PLA₂s catalyze the hydrolysis of the *sn*-2 ester bonds of phospholipids, releasing fatty acids and lysophospholipids, and are abundant in a variety of biological fluids, particularly pancreatic secretions, inflammatory exudates, and reptile and arthropod venoms (Rosenberg, 1990). PLA₂s with skeletal muscle-damaging (myotoxicity) activity are widely distributed among venomous snakes and can be subdivided into at least three subclasses: (i) the Asp49 enzymes with high catalytic activity, (ii) the Ser49 enzymes with lower catalytic activity and (iii) the Lys49 enzymes with very limited or unmeasurable catalytic activity (Shimohigashi *et al.*, 1995; Ownby *et al.*, 1999). The most abundant protein in many bothropic venoms is a natural mutant in which the Asp49 is changed to Lys (subclass iii). This Asp49-to-Lys mutation prevents calcium binding and the protein lacks catalytic activity. However, these Lys49-PLA₂s are capable of destroying the integrity of membranes and provoking release from liposomes (Rufini *et al.*, 1992). This process occurs in the absence of calcium ions without detectable lipid hydrolysis.

The effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *B. jararacussu* have been studied (Andrião-Escarso *et al.*, 2000). They showed that alkylation of His48 with *p*-bromophenacyl bromide (BPB) reduced its myotoxic, cytotoxic and oedema-inducing activity by 45, 85 and 15%, respectively, with no significant change in its liposome-disrupting activity. Similarly, BPB treatment of myotoxin II and BnSP-7, Lys49 myotoxins from *B. asper* and *B. neuwiedi*, respectively, reduced their myotoxic activity by 40–55%, but the liposome-disrupting effect was less affected (Soares *et al.*, 2000; Díaz *et al.*, 1993). Treatment with BPB caused the almost complete abolishment of the PLA₂ and pharmacological activities of both Asp49 BthTX-II and BthA-I (Andrião-Escarso *et al.*, 2000, 2002).

The crystal structure of bovine PLA₂ complexed with BPB (*p*-bromophenacyl bromide), a known inhibitor of the catalytic activity of PLA₂, demonstrated that this enzyme was structurally modified by the ligand (Renetseder *et al.*, 1988). By contrast, Zhao *et al.* (1998) noted that the structure of an acidic PLA₂ from the *Agkistrodon halys* Pallas (currently known as *Gloydius halys*) venom remained remarkably similar to the native structure after chemical modification by BPB. Recently, Magro *et al.* (2005) solved the structure of BthA-I, an acidic catalytic PLA₂, chemically modified with BPB and showed important tertiary and quaternary structural changes in this enzyme. This new conformation is more energetically and conformationally stable when compared with the native structure and the abolition of pharmacological activities (including anti-coagulant and hypotensive effects and platelet-aggregation inhibition) by the ligand may be related to the oligomeric structural changes.

In the past few years, several crystal structures of myotoxic Lys49-PLA₂s from the genus *Bothrops* have been solved (Arni *et al.*, 1995, 1999; de Azevedo *et al.*, 1997, 1999; da Silva-Giotto *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2001; Magro *et al.*, 2003, 2005; Watanabe *et al.*, 2005; Marchi-Salvador *et al.*, 2005). However, new insights into the quaternary-structure changes and the lack of phospholipase activity have recently been reported (Lee *et al.*, 2001; Magro *et al.*, 2003; Watanabe *et al.*, 2005; Soares *et al.*, 2004). The lack of catalytic activity of myotoxic Lys49-PLA₂s, which was first related to the fact that Lys49 occupies the position of the calcium ion in the catalytically active site of Asp49 PLA₂s, has also been attributed to Lys122, which interacts with the carbonyl of Cys29, hyperpolarizing the peptide bond between Cys29 and Gly30 (Lee *et al.*, 2001; Soares *et al.*, 2004). Lee *et al.* (2001) identified the residue Lys122 as fundamental for the fatty-acid stabilization in the PrTX-II structure, acting as an auxiliary electrophile in substrate hydrolysis. Recently, MjTX-II has been cocrystallized with stearic acid and the crystal structure has been solved, demonstrating that Lys122 is also fundamental for stearic acid stabilization (Watanabe *et al.*, 2005).

The C-terminal region (115–129) has been extensively studied using various strategies. Synthetic peptides studies and interaction with neutralizing molecules indicate that the C-terminus is related to the myotoxic and cytotoxic mechanisms of Lys49-PLA₂s (Lomonte *et al.*, 2003). Lomonte and coworkers also proposed a model to explain the action of Lys49-PLA₂s which is based in the interaction of the C-terminal positively charged residues with membrane anionic phospholipids. Additionally, it has been observed by site-directed

mutagenesis of the C-terminal region of BthTX-I that there are two distinct regions (at the C-terminus) related to myotoxic and Ca²⁺-independent membrane-damage activities (Chioato *et al.*, 2002). The substitution of Arg and Lys residues with Ala in the region 117–122 resulted in a significant reduction of myotoxic activity and the substitutions of residues 115, 116 and 122 with Ala resulted in reduced membrane-damage activity. However, the substitution of Lys122 with Ala alters both activities (Chioato *et al.*, 2002). Recently, crystal structures of *A. contortrix laticinctus* Lys49-PLA₂ obtained under various crystallization conditions added insight into the conformational changes of the C-terminal region related to the Lys122 residue of the Lys49-PLA₂ 'active site' (corresponding to the catalytically active site of Asp49-PLA₂s; Ambrosio *et al.*, 2005).

The structure of BthTX-I has been solved by X-ray crystallography in two conformations ('open' and 'closed'); these conformations have also been demonstrated in solution using fluorescence emission experiments (da Silva-Giotto *et al.*, 1998). These different conformations mainly arise from the β -wing region, which functions as a molecular hinge. However, Magro *et al.* (2003) observed that there are not just two conformations ('open' and 'closed') but at least six different conformations and Lys49-PLA₂ monomers are probably very flexible or adopt many states in solution, leading to different conformations in the crystals according to the best crystal packing of each protein.

In the present paper, we describe the crystallization and X-ray diffraction data collection of BthTX-I (bothropstoxin-I) from *B. jararacussu* venom chemically modified with *p*-bromophenacyl bromide, aiming to solve this structure and compare it with that of native BthTX-I. This study should provide insights into the myotoxic, cytotoxic and other pharmacological activities related to the structural changes of this protein, particularly involving the C-terminal and 'active-site' regions.

2. Experimental procedures

2.1. Isolation and chemical modification

BthTX-I was isolated from *B. jararacussu* snake venom by ion-exchange chromatography on CM-Sepharose (Homsí-Brandenburg *et al.*, 1988). Modification of His48 with 4-bromophenacyl bromide (BPB) was carried out as previously described (Díaz-Oreiro & Gutiérrez, 1997). Briefly, about 3 mg of the BthTX-I PLA₂ were dissolved in 1 ml 0.1 M ammonium bicarbonate pH 8.0 and 150 μ l BPB at 0.8 mg ml⁻¹ in ethanol was added. The mixture was incubated for 24 h and excess reagent was removed by ultrafiltration followed by lyophilization.

2.2. Crystallization

The lyophilized sample of BthTX-I was dissolved in ultrapure water at a concentration of 12 mg ml⁻¹. The sparse-matrix method (Jancarik & Kim, 1991) was used to perform initial screening of the crystallization conditions (Crystal Screens I and II, Hampton Research). Crystals of the complex of BthTX-I and BPB (BthTX-I–BPB) were obtained by the conventional hanging-drop vapour-diffusion method (McPherson, 1982) in which 1 μ l protein–BPB complex and 1 μ l reservoir solution were mixed and equilibrated against 500 μ l of the same precipitant solution. BthTX-I–BPB was crystallized using a solution containing 0.1 M sodium citrate pH 6.0, 20% (v/v) 2-propanol and 20% (w/v) polyethylene glycol 4000. The best crystals measured approximately 0.3 \times 0.2 \times 0.1 mm after 2–3 weeks at 291 K (Fig. 1).

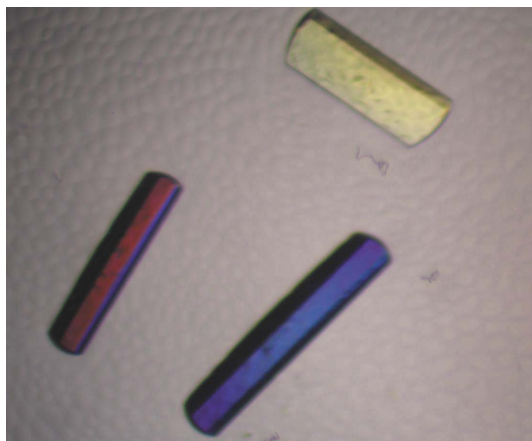


Figure 1
Crystals of the BthTX-I–BPB complex.

Table 1

X-ray diffraction data-collection and processing statistics.

Values in parentheses are for the highest resolution shell.

Unit-cell parameters (Å)	$a = 49.2, b = 65.8, c = 85.4$
Space group	$P2_12_12_1$
Resolution (Å)	40–2.28 (2.36–2.28)
Unique reflections	12419 (1202)
$R_{\text{merge}}^{\dagger}$ (%)	4.7 (23.5)
Completeness (%)	93.3 (94.0)
Radiation source	Synchrotron (LNLS-MX1)
Data-collection temperature (K)	100
$I/\sigma(I)$ cutoff for data processing‡	–3
Average $I/\sigma(I)$	26.3 (4.8)
Redundancy	4.2 (4.1)
Matthews coefficient V_M (Å ³ Da ^{–1})	2.7
Molecules in the ASU	2
Solvent content (%)	55.2

[†] $R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} [\sum_i (I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle)] / \sum_{hkl,i} I_{hkl,i}$, where $I_{hkl,i}$ is the intensity of an individual measurement of the reflection with Miller indices hkl and $\langle I_{hkl} \rangle$ is the mean intensity of that reflection. Calculated for $I > -3\sigma(I)$. ‡ Data processing used the *HKL* suite (Otwinowski & Minor, 1997).

2.3. X-ray data collection and processing

X-ray diffraction data were collected from BthTX-I–BPB crystals at a wavelength of 1.421 Å (at 100 K) using a synchrotron-radiation source (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, LNLS, Campinas, Brazil) and a MAR CCD imaging-plate detector (MAR Research). A crystal was mounted in a nylon loop and flash-frozen in a stream of nitrogen at 100 K using no cryoprotectant. The crystal-to-detector distance was 110 mm and an oscillation range of 1° was used; 111 images were collected. The data were processed to 2.28 Å resolution using the *HKL* program package (Otwinowski & Minor, 1997).

3. Results and discussion

The data-collection statistics are shown in Table 1. The data set is 93.3% complete at 2.28 Å resolution, with an R_{merge} of 4.7%. The crystals belong to space group $P2_12_12_1$, with unit-cell parameters $a = 49.2, b = 65.8, c = 85.4$ Å.

Packing-parameter calculations indicate the presence of a dimer in the asymmetric unit. This corresponds to a Matthews coefficient (Matthews, 1968) of 2.7 Å³ Da^{–1} and a calculated solvent content of 55.2%, which are within the expected range for typical protein crystals (assuming a value of 0.74 cm³ g^{–1} for the protein partial specific volume).

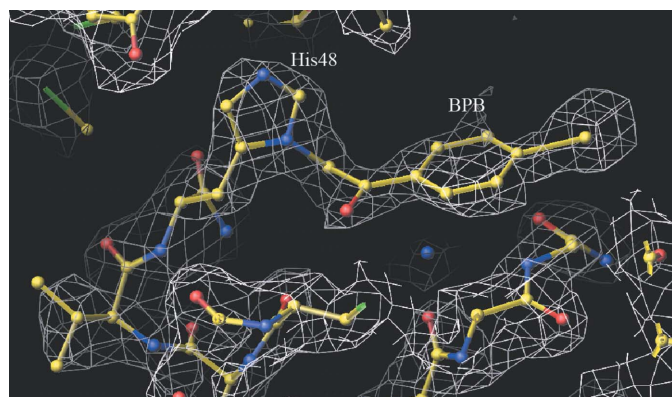


Figure 2

$3|F_{\text{obs}}| - 2|F_{\text{cat}}|$ electron-density OMIT map in the ‘active-site’ region of monomer A of the BthA-I–BPB complex, showing the His48 residue covalently bound with BPB contoured at 1.2 standard deviations. The figure was generated using *O* (Jones *et al.*, 1990).

The crystal structure was determined by molecular-replacement techniques as implemented in the program *AMoRe* (Navaza, 1994) using the coordinates of a monomer of native BthTX-I as a model. A remarkable electron density for a BPB molecule bound to His48 was observed for both monomers of the BthTX-I–BPB complex (Fig. 2).

In conclusion, a Lys49-PLA₂s chemically modified with BPB was crystallized and X-ray diffraction data were collected to 2.28 Å. The BthTX-I–BPB crystals are not isomorphous with those of the native protein in either oligomeric conformation (open or closed). This suggests inhibitor binding has led to changes in the quaternary structure and an alternative conformation for the protein may have been obtained. The BPB ligand binds covalently to the His48 residue of the catalytic site of PLA₂s. However, the myotoxic and cytotoxic activities of non-catalytic BthTX-I decrease dramatically after the ligand binding. Possible explanations for this fact are that the BPB binding may result in conformational changes and/or C-terminal residues (e.g. Lys122) may be indirectly interacting with the ‘active site’, affecting the toxic mechanisms. Detailed studies with this complex might add insights into the myotoxic and cytotoxic mechanisms of Lys49-PLA₂s and, eventually, into the role of the C-terminal region.

The authors gratefully acknowledge the financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (FUNDU-NESE) and Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas-SP).

References

- Ambrosio, A. L. B., Nonato, M. C., de Araújo, H. S. S., Arni, R., Ward, R. J., Ownby C. L., de Souza, D. H. F. & Garratt, R. C. (2005). *J. Biol. Chem.* **280**, 7326–7335.
- Andrião-Escarso, S. H., Soares, A. M., Fontes, M. R. M., Fuly, A. L., Corrêa, F. M. A., Rosa, J. C., Greene, L. J. & Giglio, J. R. (2002). *Biochem. Pharmacol.* **64**, 723–732.
- Andrião-Escarso, S. H., Soares, A. M., Rodrigues, V. M., Angulo, Y., Díaz, C., Lomonte, B., Gutiérrez, J. M. & Giglio, J. R. (2000). *Biochimie*, **82**, 755–763.
- Arni, R. K., Fontes, M. R. M., Barberato, C., Gutiérrez, J. M., Díaz-Oreiro, C. & Ward, R. J. (1999). *Arch. Biochem. Biophys.* **366**, 177–182.
- Arni, R. K., Ward, R. J. & Gutiérrez, J. M. (1995). *Acta Cryst.* **D51**, 311–317.
- Azevedo, W. F. de Jr, Ward, R. J., Gutiérrez, J. M. & Arni, R. K. (1999). *Toxicon*, **37**, 371–384.
- Azevedo, W. F. de Jr, Ward, R. J., Lombardi, F. R., Giglio, J. R., Soares, A. M., Fontes, M. R. M. & Arni, R. K. (1997). *Protein Pept. Lett.* **4**, 329–334.
- Chioato, L., Oliveira, A. H., Ruller, R., Sá, J. M. & Ward, R. J. (2002). *Biochem. J.* **366**, 971–976.
- da Silva-Giotto, M. T., Garratt, R. C., Oliva, G., Mascarenhas, Y. P., Giglio, J. R., Cintra, A. C. O., de Azevedo, W. F. Jr, Arni, R. K. & Ward, R. J. (1998). *Proteins*, **30**, 442–454.
- Díaz, C., Gutiérrez, J. M., Lomonte, B. & Nunez, J. (1993). *Toxicon*, **31**, 1202–1206.
- Díaz-Oreiro, C. & Gutiérrez, J. M. (1997). *Toxicon*, **35**, 241–252.
- Gutiérrez, J. M. & Lomonte, B. (1997). *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism*, edited by R. M. Kini, pp. 321–352. Chichester: Wiley & Sons.
- Homsí-Brandenburg, M. I., Queiroz, L. S., Santo-Neto, H., Rodrigues-Simioni, L. & Giglio, J. R. (1988). *Toxicon*, **26**, 615–627.
- Jancarik, J. & Kim, S.-H. (1991). *J. Appl. Cryst.* **24**, 409–411.
- Jones, T. A., Bergdoll, M. & Kjeldgaard, M. (1990). *Crystallographic and Modeling Methods in Molecular Design*, edited by C. E. Bugg & S. E. Ealick, pp. 189–195. New York: Springer-Verlag.
- Kini, R. M. & Evans, H. J. (1989). *Toxicon*, **27**, 613–635.
- Lee, W. H., da Silva-Giotto, M. T., Marangoni, S., Toyama, M. H., Polikarpov, I. & Garratt, R. C. (2001). *Biochemistry*, **40**, 28–36.
- Lomonte, B., Angulo, Y. & Calderón, L. (2003). *Toxicon*, **42**, 885–901.

- McPherson, A. (1982). *Preparation and Analysis of Protein Crystals*. New York: Wiley.
- Magro, A. J., Soares, A. M., Giglio, J. R. & Fontes, M. R. M. (2003). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311**, 713–720.
- Magro, A. J., Takeda, A. A. S., Soares, A. M. & Fontes, M. R. M. (2005). *Acta Cryst.* **D61**, 1670–1677.
- Marchi-Salvador, D. P., Silveira, L. B., Soares, A. M. & Fontes, M. R. M. (2005). *Acta Cryst.* **F61**, 882–884.
- Matthews, B. W. (1968). *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497.
- Navaza, J. (1994). *Acta Cryst.* **A50**, 157–163.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). *Methods Enzymol.* **276**, 307–326.
- Ownby, C. L. (1998). *J. Toxicol. Toxin. Rev.* **17**, 1003–1009.
- Ownby, C. L. H., Selistre de Araujo, S., White, S. P. & Flether, J. E. (1999). *Toxicon*, **37**, 411–445.
- Renetseder, R., Dijkstra, B. W., Huizunga, K. H., Kalk, K. H. & Drenth, J. (1988). *J. Mol. Biol.* **200**, 181–188.
- Rosenberg, P. (1990). *Handbook of Toxicology*, edited by W. Shier & D. Mebs, pp. 67–277. New York: Marcel Dekker.
- Rufini, S., Cesaroni, P., Desideri, R. F., Gubensek, F., Gutiérrez, J. M., Luly, P., Maassoud, R., Morero, R. & Pedersen, J. Z. (1992). *Biochemistry*, **31**, 12424–12430.
- Shimohigashi, Y., Tani, A., Matsumoto, H., Nakashima, K. & Yamaguchi, Y. (1995). *J. Biochem.* **118**, 1037–1044.
- Soares, A. M., Fontes, M. R. M. & Giglio, J. R. (2004). *Curr. Org. Chem.* **8**, 1677–1690.
- Soares, A. M., Guerra-Sá, R., Borja-Oliveira, C. R., Rodrigues, V. M., Rodrigues-Simioni, L., Rodrigues, V., Fontes, M. R. M., Lomonte, B., Gutiérrez, J. M. & Giglio, J. R. (2000). *Arch. Biochem. Biophys.* **378**, 201–209.
- Watanabe, L., Soares, A. M., Ward, R. J., Fontes, M. R. M. & Arni, R. K. (2005). *Biochimie*, **87**, 161–167.
- Zhao, H., Liang, T., Xiaoqiang, W., Yuancong, Z. & Zhengjiong, L. (1998). *Toxicon*, **36**, 875–886.

APÊNDICE V

Preliminary X-ray crystallographic studies of BthTX-II, a myotoxic Asp49-phospholipase A₂ with low catalytic activity from *Bothrops jararacussu* venom.

L. C. Corrêa,^a D. P. Marchi-Salvador,^a A. C. O. Cintra,^b A. M. Soares^b and M. R. M. Fontes^{a*}

^aDepartamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, UNESP, CP 510, CEP 18618-000, Botucatu-SP, Brazil, and ^bDepartamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, FCFRP, USP, Ribeirão Preto/SP, Brazil

Correspondence e-mail: fontes@ibb.unesp.br

Received 17 May 2006
Accepted 29 June 2006

Preliminary X-ray crystallographic studies of BthTX-II, a myotoxic Asp49-phospholipase A₂ with low catalytic activity from *Bothrops jararacussu* venom

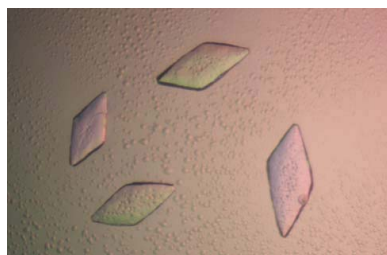
For the first time, a complete X-ray diffraction data set has been collected from a myotoxic Asp49-phospholipase A₂ (Asp49-PLA₂) with low catalytic activity (BthTX-II from *Bothrops jararacussu* venom) and a molecular-replacement solution has been obtained with a dimer in the asymmetric unit. The quaternary structure of BthTX-II resembles the myotoxin Asp49-PLA₂ PrTX-III (piratoxin III from *B. pirajai* venom) and all non-catalytic and myotoxic dimeric Lys49-PLA₂s. In contrast, the oligomeric structure of BthTX-II is different from the highly catalytic and non-myotoxic BthA-I (acidic PLA₂ from *B. jararacussu*). Thus, comparison between these structures should add insight into the catalytic and myotoxic activities of bothropic PLA₂s.

1. Introduction

Phospholipases A₂ (PLA₂s; EC 3.1.1.4) belong to a superfamily of proteins which hydrolyze the *sn*-2 acyl groups of membrane phospholipids to release fatty acids, arachidonic acid and lysophospholipids (van Deenen & de Haas, 1963). The coordination of the Ca²⁺ ion in the PLA₂ calcium-binding loop includes an Asp at position 49 which plays a crucial role in the stabilization of the tetrahedral transition-state intermediate in catalytically active PLA₂s (Scott *et al.*, 1992). In the genus *Bothrops*, PLA₂s are the main components of the venoms produced by species classified into this animal group. In addition to their primary catalytic role, snake-venom PLA₂s show other important toxic/pharmacological effects, including myonecrosis, neurotoxicity, cardiotoxicity and haemolytic, haemorrhagic, hypotensive, anticoagulant, platelet-aggregation inhibition and oedema-inducing activities (Gutiérrez & Lomonte, 1997; Ownby, 1998; Andrião-Escarso *et al.*, 2002). Some of these activities are correlated with the enzymatic activity, but others are completely independent (Kini & Evans, 1989; Soares & Giglio, 2004). It has been suggested that some specific sites of these molecules have biochemical properties that are responsible for the pharmacological and toxic actions, including the anticoagulant and platelet-inhibition activities (Kini & Evans, 1989). PLA₂s are also one of the enzymes involved in the production of eicosanoids. These molecules have physiological effects at very low concentrations; however, increases in their concentration can lead to inflammation (Needleman *et al.*, 1986). Thus, the study of specific PLA₂ inhibitors is important in the production of structure-based anti-inflammatory agents.

Many non-catalytic homologous PLA₂s (Lys49-PLA₂s) have been purified from *Bothrops* snake venoms and have been structurally and functionally characterized (Marchi-Salvador *et al.*, 2005, 2006; Watanabe *et al.*, 2005; Soares *et al.*, 2004; Magro *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2001; Arni *et al.*, 1995, 1999; da Silva-Giotto *et al.*, 1998). However, little is known about the bothropic catalytic PLA₂s (Asp49-PLA₂s; Magro *et al.*, 2004, 2005; Rigden *et al.*, 2003; Serrano *et al.*, 1999; Pereira *et al.*, 1998; Daniele *et al.*, 1995; Homs-Brandeburgo *et al.*, 1988).

Despite the structures of a large number of PLA₂s having been solved by crystallography to date, many questions still need to be clarified. For example, there are PLA₂s with high, moderate and no catalytic activity (Magro *et al.*, 2004; Rigden *et al.*, 2003; da Silva-Giotto *et al.*, 1998). However, for all these 'classes' of PLA₂s the



© 2006 International Union of Crystallography
All rights reserved

majority of residues of the catalytic machinery are conserved. Similarly, toxic (e.g. myotoxicity, cytotoxicity) and pharmacological effects (e.g. anticoagulant, hypotensive and platelet-aggregation activities) are far from being completely understood.

An acidic catalytic PLA₂ (BthA-I) has been isolated from *B. jararacussu* venom and characterized (Andrião-Escarso *et al.*, 2002; Roberto *et al.*, 2004). BthA-I is three to four times more catalytically active than BthTX-II (bothropstoxin-II from *B. jararacussu*) and other basic Asp49-PLA₂s from *Bothrops* venoms, but is not myotoxic, cytotoxic or lethal (Andrião-Escarso *et al.*, 2002). Other activities demonstrated by this enzyme are time-independent oedema induction, hypotensive response in rats and platelet-aggregation inhibition (Andrião-Escarso *et al.*, 2002). The crystal structure of BthA-I has been recently described in two conformational states: monomeric and dimeric (Magro *et al.*, 2004). Additionally, Magro *et al.* (2005) solved the structure of BthA-I chemically modified with BPB (*p*-bromophenacyl bromide) and showed important tertiary and quaternary structural changes in this enzyme. This novel oligomeric structure is more energetically and conformationally stable than the native structure and the abolition of pharmacological activities (including anticoagulant, hypotensive effect and platelet-aggregation inhibition) by the ligand may be related to the oligomeric structural changes.

The isolation, biochemical/pharmacological characterization and amino-acid sequence of bothropstoxin II from *B. jararacussu* (BthTX-II) have been reported (Homs-Brandeburgo *et al.*, 1988; Gutiérrez *et al.*, 1991; Pereira *et al.*, 1998). Protein sequencing indicated that BthTX-II is an Asp49-PLA₂ and consists of 120 amino acids (MW = 13 976 Da). The protein shows myotoxic, oedematogenic and haemolytic effects and low phospholipase activity (Homs-Brandeburgo *et al.*, 1988; Gutiérrez *et al.*, 1991). Recently, it has been shown that BthTX-II induces platelet aggregation and secretion through multiple signal transduction pathways (Fuly *et al.*, 2004). Despite BthTX-II having been crystallized more than ten years ago (Bortoleto *et al.*, 1996), the structure has not been solved to date, probably owing to the low completeness of the data set (50–60% completeness). The crystals belonged to the tetragonal crystal system and preliminary analysis indicated the presence of three molecules in the asymmetric unit (Bortoleto *et al.*, 1996). However, a careful analysis of the Matthews coefficient indicated that a tetrameric conformation is also possible ($V_M = 2.4 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$), which also occurs in the Lys49-PLA₂ M₃TX-I (myotoxin I from *B. moojeni* venom) structure formed of two Lys49-PLA₂ dimers (Marchi-Salvador *et al.*, 2005; personal communication).

In the present paper, we describe the crystallization of BthTX-II (bothropstoxin-II) from *B. jararacussu* venom in the monoclinic system, the collection of a complete X-ray diffraction data set and molecular-replacement solution. This study should improve the understanding of the relation of the myotoxic and low catalytic activity mechanisms to the structural features of this protein when compared with BthTX-I (Lys49-PLA₂ from *B. jararacussu* venom) and BthA-I, which possess no and high catalytic activity, respectively.

2. Experimental procedures

2.1. Purification

BthTX-II was isolated from *B. jararacussu* snake venom by gel-filtration and ion-exchange chromatography as previously described (Homs-Brandeburgo *et al.*, 1988).

2.2. Crystallization

A lyophilized sample of BthTX-II was dissolved in ultrapure water at a concentration of 12 mg ml⁻¹. The sparse-matrix method (Jancarik & Kim, 1991) was used to perform initial screening of the crystallization conditions (Crystal Screens I and II; Hampton Research). Large crystals of BthTX-II were obtained by the conventional hanging-drop vapour-diffusion method (MacPherson, 1982), in which 1 µl protein solution and 1 µl reservoir solution were mixed and equilibrated against 500 µl of the same precipitant solution. The BthTX-II was crystallized using a solution containing 20% (v/v) 2-propanol, 13% (w/v) polyethylene glycol 4000 and 0.1 M sodium citrate pH 5.6. The best crystals measured approximately 0.4 × 0.2 × 0.1 mm after two months at 291 K (Fig. 1).

2.3. X-ray data collection and processing

X-ray diffraction data from BthTX-II crystals were collected using a wavelength of 1.427 Å at a synchrotron-radiation source (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, LNLS, Campinas, Brazil) with a MAR CCD imaging-plate detector (MAR Research). A crystal was mounted in a nylon loop and flash-cooled in a stream of nitrogen at 100 K using no cryoprotectant. The crystal-to-detector distance was 100 mm and an oscillation range of 1° was used; 149 images were collected. The data were processed to 2.13 Å resolution using the HKL program package (Otwinowski & Minor, 1997).

3. Results and discussion

The data-collection statistics are shown in Table 1. The data set is 96.1% complete at 2.13 Å resolution, with $R_{\text{merge}} = 9.1\%$. The crystals belong to space group *C*2, with unit-cell parameters $a = 58.9$, $b = 98.5$, $c = 46.7$ Å, $\beta = 125.9^\circ$.

Packing parameter calculations based on the protein molecular weight indicate the presence of a dimer in the asymmetric unit. This corresponds to a Matthews coefficient (Matthews, 1968) of $2.0 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ with a calculated solvent content of 37.4%, which are within the expected range for typical protein crystals (assuming a value of $0.74 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ for the protein partial specific volume).

The crystal structure was determined by molecular-replacement techniques implemented in the program *AMoRe* (Navaza, 1994) using the coordinates of a monomer of PrTX-III (PDB code 1gmz). The quaternary structure of BthTX-II is very similar to those of PrTX-III and all dimeric bothropic Lys49-PLA₂s (Rigden *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2004) and totally different from those of native dimeric

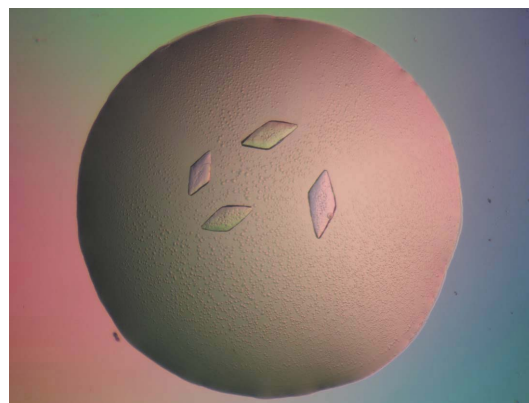


Figure 1
Crystals of BthTX-II from *B. jararacussu* venom

Table 1

X-ray diffraction data-collection and processing statistics.

Values in parentheses are for the highest resolution shell.

Unit-cell parameters (\AA , °)	$a = 58.9$, $b = 98.5$, $c = 46.7$, $\beta = 125.9$
Space group	C2
Resolution (\AA)	40–2.13 (2.21–2.13)
Unique reflections	11560 (1127)
$R_{\text{merge}}^{\dagger}$ (%)	9.1 (26.4)
Completeness (%)	96.1 (94.2)
Radiation source	Synchrotron (LNLS-MX1)
Data-collection temperature (K)	100
$\sigma(I)$ cutoff for data processing \ddagger	–3
Average $I/\sigma(I)$	10.6 (3.7)
Redundancy	3.0 (2.9)
Matthews coefficient V_M ($\text{\AA}^3 \text{Da}^{-1}$)	2.0
Molecules in the ASU	2
Solvent content (%)	37.4

$\dagger R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} (\sum_i (I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle)) / \sum_{hkl,i} I_{hkl,i}$, where $I_{hkl,i}$ is the intensity of an individual measurement of the reflection with Miller indices hkl and $\langle I_{hkl} \rangle$ is the mean intensity of that reflection. Calculated for $I > -3\sigma(I)$. \ddagger Data processing used the *HKL* suite (Otwinowski & Minor, 1997).

BthA-I and BthA-I-bromophenacyl bromide and BthA-I- α -tocopherol complexes (Magro *et al.*, 2004, 2005; Takeda *et al.*, 2004).

In conclusion, a complete X-ray diffraction data set has been collected from a low catalytic activity Asp49-PLA₂ for the first time (to 2.13 \AA) and a molecular-replacement structure solution has been obtained. The quaternary structure of BthTX-II resembles those of the myotoxin PrTX-III (which does not bind Ca²⁺ ions) and all non-catalytic and myotoxic dimeric Lys49-PLA₂s (Rigden *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2004). In contrast, the oligomeric structure of BthTX-II is different from that of the high catalytic activity and non-myotoxic BthA-I (Magro *et al.*, 2004). Thus, comparison between these structures should add insight into the catalytic and myotoxic activities of bothropic PLA₂s.

The authors gratefully acknowledge financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (FUNDU-NEP) and Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas-SP).

References

- Andrião-Escarso, S. H., Soares, A. M., Fontes, M. R. M., Fuly, A. L., Corrêa, F. M. A., Rosa, J. C., Greene, L. J. & Giglio, J. R. (2002). *Biochem. Pharmacol.* **64**, 723–732.
- Arni, R. K., Fontes, M. R. M., Barberato, C., Gutiérrez, J. M., Díaz-Oreiro, C. & Ward, R. J. (1999). *Arch. Biochem. Biophys.* **366**, 177–182.
- Arni, R. K., Ward, R. J. & Gutiérrez, J. M. (1995). *Acta Cryst.* **D51**, 311–317.
- Bortoleto, R. K., Ward, R. J., Giglio, J. R., Cintra, A. C. O. & Arni, R. K. (1996). *Toxicon*, **34**, 614–617.
- Deenen, L. L. M. van & de Haas, G. H. (1963). *Biochem. Biophys. Acta*, **70**, 538–553.
- Daniele, J. J., Bianco, I. D. & Fidelio, G. D. (1995). *Arch. Biochem. Biophys.* **318**, 65–70.
- da Silva-Giotto, M. T., Garratt, R. C., Oliva, G., Mascarenhas, Y. P., Giglio, J. R., Cintra, A. C. O., de Azevedo, W. F. Jr, Arni, R. K. & Ward, R. J. (1998). *Proteins*, **30**, 442–454.
- Fuly, A. L., Soares, A. M., Marcussi, S., Giglio, J. R. & Guimarães, J. A. (2004). *Biochimie*, **86**, 731–739.
- Gutiérrez, J. M. & Lomonte, B. (1997). *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism*, edited by R. M. Kini, pp. 321–352. Chichester: Wiley & Sons.
- Gutiérrez, J. M., Nunez, J., Diaz, C., Cintra, A. C. O., Homsí-Brandeburgo, M. I. & Giglio, J. R. (1991). *Exp. Mol. Pathol.* **55**, 217–229.
- Homsí-Brandeburgo, M. I., Queiroz, L. S., Santo-Neto, H., Rodrigues-Simioni, L. & Giglio, J. R. (1988). *Toxicon*, **26**, 615–627.
- Jancarik, J. & Kim, S.-H. (1991). *J. Appl. Cryst.* **24**, 409–411.
- Kini, R. M. & Evans, H. J. (1989). *Toxicon*, **27**, 613–635.
- Lee, W. H., da Silva-Giotto, M. T., Marangoni, S., Toyama, M. H., Polikarpov, I. & Garratt, R. C. (2001). *Biochemistry*, **40**, 28–36.
- MacPherson, A. (1982). *Preparation and Analysis of Protein Crystals*. New York: Wiley.
- Magro, A. J., Soares, A. M., Giglio, J. R. & Fontes, M. R. M. (2003). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311**, 713–720.
- Magro, A. J., Murakami, M. T., Marcussi, S., Soares, A. M., Arni, R. K. & Fontes, M. R. M. (2004). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **323**, 24–31.
- Magro, A. J., Takeda, A. A. S., Soares, A. M. & Fontes, M. R. M. (2005). *Acta Cryst.* **D61**, 1670–1677.
- Marchi-Salvador, D. P., Fernandes, C. A. H., Amui, S. F., Soares, A. M. & Fontes, M. R. M. (2006). *Acta Cryst.* **F62**, 600–603.
- Marchi-Salvador, D. P., Silveira, L. B., Soares, A. M. & Fontes, M. R. M. (2005). *Acta Cryst.* **F61**, 882–884.
- Matthews, B. W. (1968). *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497.
- Navaza, J. (1994). *Acta Cryst.* **A50**, 157–163.
- Needleman, P., Turk, J., Jakschik, B. A., Morrison, A. R. & Lefkowitz, J. B. (1986). *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 69–102.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). *Methods Enzymol.* **276**, 307–326.
- Ownby, C. L. (1998). *J. Toxicol. Toxin Rev.* **17**, 1003–1009.
- Pereira, M. F., Novello, J. C., Cintra, A. C. O., Giglio, J. R., Landucci, E. T., Oliveira, B. & Marangoni, S. (1998). *J. Protein Chem.* **17**, 381–386.
- Rigden, D. J., Hwa, L. W., Marangoni, S., Toyama, M. H. & Polikarpov, I. (2003). *Acta Cryst.* **D59**, 255–262.
- Roberto, P. G., Kashima, S., Marcussi, S., Pereira, J. O., Astolfi-Filho, S., Nomizo, A., Giglio, J. R., Fontes, M. R. M., Soares, A. M. & França, S. C. (2004). *Protein J.* **23**, 273–285.
- Scott, D. L., Achari, A., Vidal, J. C. & Sigler, P. B. (1992). *J. Biol. Chem.* **267**, 22645–22657.
- Serrano, S. M. T., Reichl, A. P., Mentele, R., Auerswald, E. A., Santoro, M. L., Sampaio, C. A. M., Camargo, A. C. M. & Assakura, M. T. (1999). *Arch. Biochem. Biophys.* **367**, 26–32.
- Soares, A. M., Fontes, M. R. M. & Giglio, J. R. (2004). *Curr. Org. Chem.* **8**, 1677–1690.
- Soares, A. M. & Giglio, J. R. (2004). *Toxicon*, **42**, 855–868.
- Takeda, A. A. S., dos Santos, J. I., Marcussi, S., Silveira, L. B., Soares, A. M. & Fontes, M. R. M. (2004). *Biochim. Biophys. Acta*, **1699**, 281–284.
- Watanabe, L., Soares, A. M., Ward, R. J., Fontes, M. R. M. & Arni, R. K. (2005). *Biochimie*, **87**, 161–167.

APÊNDICE VI

Crystal structure of a myotoxic Asp49-phospholipase A₂ with low catalytic activity: insights into Ca²⁺ independent catalytic mechanism.

Available online at www.sciencedirect.com

Biochimica et Biophysica Acta xx (2008) xxx–xxx

www.elsevier.com/locate/bbapap

Crystal structure of a myotoxic Asp49-phospholipase A₂ with low catalytic activity: Insights into Ca²⁺-independent catalytic mechanism

Luiz C. Corrêa^a, Daniela P. Marchi-Salvador^a, Adélia C.O. Cintra^b, Suely V. Sampaio^b,
Andreimar M. Soares^b, Marcos R.M. Fontes^{a,*}

^a Departamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu-SP, Brazil

^b Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, FCFRP, USP, Ribeirão Preto/SP, Brazil

Received 18 August 2007; received in revised form 5 December 2007; accepted 3 January 2008

Abstract

A myotoxic Asp49-phospholipase A₂ (Asp49-PLA₂) with low catalytic activity (BthTX-II from *Bothrops jararacussu* venom) was crystallized and the molecular-replacement solution has been obtained with a dimer in the asymmetric unit. The quaternary structure of BthTX-II resembles the myotoxic Asp49-PLA₂ PrTX-III (piratoxin III from *B. pirajai* venom) and all non-catalytic and myotoxic dimeric Lys49-PLA₂s. Despite of this, BthTX-II is different from the highly catalytic and non-myotoxic BthA-I (acidic PLA₂ from *B. jararacussu*) and other Asp49-PLA₂s. BthTX-II structure showed a severe distortion of calcium-binding loop leading to displacement of the C-terminal region. Tyr28 side chain, present in this region, is in an opposite position in relation to the same residue in the catalytic activity Asp49-PLA₂s, making a hydrogen bond with the atom Oδ2 of the catalytically active Asp49, which should coordinate the calcium. This high distortion may also be confirmed by the inability of BthTX-II to bind Na⁺ ions at the Ca²⁺-binding loop, despite of the crystallization to have occurred in the presence of this ion. In contrast, other Asp49-PLA₂s which are able to bind Ca²⁺ ions are also able to bind Na⁺ ions at this loop. The comparison with other catalytic, non-catalytic and inhibited PLA₂s indicates that the BthTX-II is not able to bind calcium ions; consequently, we suggest that its low catalytic function is based on an alternative way compared with other PLA₂s.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Phospholipase A₂; *Bothrops jararacussu* venom; Myotoxic; Ca²⁺-independent enzymatic activity; X-ray crystallography

1. Introduction

Phospholipases A₂ (PLA₂s; EC 3.1.1.4) belong to a superfamily of proteins which hydrolyze the sn-2 bond in membrane phospholipids to release fatty acids, arachidonic acid and lysophospholipids [1]. The coordination of the Ca²⁺ ion in the PLA₂ calcium-binding loop includes an Asp at position 49 which plays a crucial role in the stabilization of the tetrahedral transition-state intermediate in catalytically active PLA₂s [2]. In the genus *Bothrops*, PLA₂s are the main components of the venoms produced by species classified into this animal group. In addition to their primary catalytic role, snake-venom PLA₂s show other important toxic/pharmacological effects, includ-

ing myonecrosis, neurotoxicity, cardiotoxicity and haemolytic, haemorrhagic, hypotensive, anticoagulant, platelet-aggregation inhibition and oedema inducing activities [3–5]. Some of these activities are correlated with the enzymatic activity, but others are completely independent [6,7]. It has been suggested that some specific sites of these molecules have biochemical properties that are responsible for the pharmacological and toxic actions, including the anticoagulant and platelet-inhibition activities [6]. PLA₂s are also one of the enzymes involved in the production of eicosanoids. These molecules have physiological effects at very low concentrations; however, increases in their concentration can lead to inflammation [8]. Thus, the study of specific PLA₂ inhibitors is important in the production of structure based anti-inflammatory agents. Many non-catalytic homologous PLA₂s (Lys49-PLA₂s) have been purified from *Bothrops* snake venoms and have been structurally and

* Corresponding author. Tel.: +55 14 38116254; fax: +55 14 38153744.

E-mail address: fontes@ibb.unesp.br (M.R.M. Fontes).

functionally characterized [9–18]. However, little is known about the bothropic catalytic Asp49-PLA₂s [19–25]. Despite the structures of a large number of PLA₂s having been solved by crystallography to date, many questions still need to be clarified. For example, there are PLA₂s with high, moderate and no catalytic activity [18,19,21]. However, for all these ‘classes’ of PLA₂s the majority of residues of the catalytic machinery are conserved. Similarly, toxic (e.g. myotoxicity, cytotoxicity) and pharmacological effects (e.g. anticoagulant, hypotensive and platelet-aggregation activities) are far from being completely understood. An acidic catalytic PLA₂ (BthA-I) has been isolated from *B. jararacussu* venom and characterized [5,26]. BthA-I is three to four times more catalytically active than BthTX-II (bothropstoxin-II from *B. jararacussu*) and other basic Asp49-PLA₂s from *Bothrops* venoms, but is not myotoxic, cytotoxic or lethal [5]. Other activities demonstrated by this enzyme are time-independent oedema induction, hypotensive response in rats and platelet-aggregation inhibition [5]. The crystal structure of BthA-I has been recently described in monomeric and dimeric conformational states [19]. Additionally, Magro et al. [20] solved the structure of BthA-I chemically modified with BPB (*p*-bromophenacyl bromide) and showed important tertiary and quaternary structural changes in this enzyme. This novel oligomeric structure is probably related to the abolition of its pharmacological activities (including anticoagulant, hypotensive effect and platelet-aggregation inhibition). The isolation, biochemical/pharmacological characterization and amino-acid sequence of bothropstoxin-II from *B. jararacussu* (BthTX-II) have been reported [23,25,27]. Protein sequencing indicated that BthTX-II is an Asp49-PLA₂ and consists of 122 amino acids (MW=13,976 Da). The protein shows myotoxic, oedematogenic and haemolytic effects and low phospholipase activity [25,27]. Recently, it has been shown that BthTX-II induces platelet aggregation and secretion through multiple signal transduction pathways [28].

In the present paper, we describe crystal structure of BthTX-II isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*, a basic Asp49-PLA₂ from group IIA of PLA₂s, and a comparative analysis with other Asp49 and Lys49 phospholipases A₂ from snake venoms. This study provides new insights into the understanding of structural basis of low catalytic and high myotoxic activities of this protein.

2. Materials and methods

2.1. Purification

BthTX-II was isolated from *B. jararacussu* snake venom by gel filtration and ion-exchange chromatography as previously described [25].

2.2. Crystallization

A lyophilized sample of BthTX-II was dissolved in ultra pure water at a concentration of 12 mg ml⁻¹. Crystals of BthTX-II were obtained by the conventional hanging-drop vapor-diffusion method [29] using Crystal Screens I (Hampton Research) with the sparse-matrix method [30]. Better crystals were obtained using a solution containing 20% (v/v) 2-propanol, 13% (w/v) polyethylene glycol 4000 and 0.1 M sodium citrate pH 5.6 [31] in which 1 µl protein solution and 1 µl reservoir solution were mixed and equilibrated against 500 µl of the same

precipitant solution. The crystals measured approximately 0.4×0.2×0.1 mm after 2 months at 291 K.

2.3. X-ray data collection and processing

X-ray diffraction data from BthTX-II crystals were collected using a wavelength of 1.427 Å at a synchrotron-radiation source (Laboratório Nacional de Luz Sincrotron, LNLS, Campinas, Brazil) with a MAR CCD imaging-plate detector (MAR Research). A crystal was mounted in a nylon loop and flash-cooled in a stream of nitrogen at 100 K using no cryoprotectant. The crystal-to-detector distance was 100 mm and an oscillation range of 1° was used; 149 images were collected. The data were processed to 2.19 Å of resolution [31], using the HKL program package [32].

2.4. Structure determination and refinement

The crystal structure of BthTX-II was solved by the molecular-replacement method using the program AMoRe [33] and coordinates of PrTX-III [21]. The model choice was based on the best results of correlation and R-factor from the AMoRe program. After a cycle of simulated annealing refinement using the CNS program [34], the electron densities were inspected and the amino-acid sequence as obtained from the cDNA of BthTX-II [35] was inserted. The modeling process was always performed by manually rebuilding with the program ‘O’ [36].

Table 1
X-ray data collection and refinement statistics

Unit cell (Å)	$a=58.912;$	$b=98.458;$	$c=46.720$
	$\beta=125.89^\circ$		
Space group	C2		
Resolution (Å)	30.01–2.19 (2.33–2.19) ^a		
Unique reflections	10,687 (1619) ^a		
Completeness (%)	95.9 (92.9) ^a		
R_{merge}^b (%)	9.1 (26.4) ^a		
I/s (I)	10.6 (3.7) ^a		
Redundancy	3.0 (2.9) ^a		
R_{cryst}^c (%)	20.7 (35.9) ^a		
R_{free}^d (%)	22.7 (40.4) ^a		
Number of non-hydrogen atoms			
Protein	1891		
Water	231		
Mean B-factor (Å ²) ^e			
Overall	35.1		
R.m.s deviations from ideal values ^e			
Bond lengths (Å)	0.023		
Bond angles (°)	2.3		
Ramachandran plot ^f (%)			
Residues in most favored region	88.9		
Residues in additional allowed region	11.1		
Coordinate error (Å) ^e			
Luzzati plot (cross-validated)	0.27 (0.31) ^a		
Luzzati plot			
SIGMAA (cross-validated)	0.34 (0.35) ^a		
SIGMAA)			

^a Numbers in parenthesis are for the highest resolution shell.

^b $R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} (\sum_i |I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle|) / \sum_{hkl} \langle I_{hkl} \rangle$, where $I_{hkl,i}$ is the intensity of an individual measurement of the reflection with Miller indices h , k and l , and $\langle I_{hkl} \rangle$ is the mean intensity of that reflection. Calculated for $I > 3\sigma$ (I).

^c $R_{\text{cryst}} = \sum_{hkl} (|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|) / \sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|$, where $|F_{\text{obs}}|$ and $|F_{\text{calc}}|$ are the observed and calculated structure factor amplitudes.

^d R_{free} is equivalent to R_{cryst} but calculated with reflections (5%) omitted from the refinement process.

^e Calculated with the program CNS [34].

^f Calculated with the program PROCHECK [37].

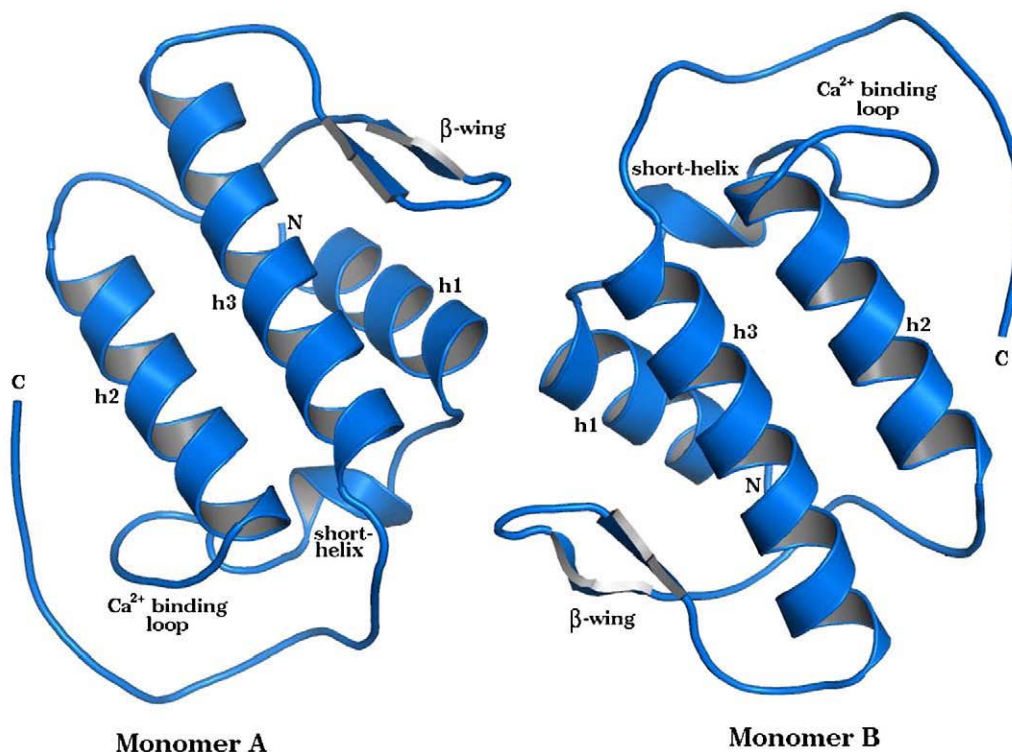


Fig. 1. Dimeric structure of BthTX-II showed as a ribbon diagram. The figure was drawn using *Pymol* [40].

Electron density maps calculated with coefficients $3|F_{obs}| - 2|F_{calc}|$ and simulated annealing omit maps calculated with analogous coefficients were generally used. The model was improved, as judged by the free R-factor [34], through rounds of crystallographic refinement (positional and restrained

isotropic individual B-factor refinement, with an overall anisotropic temperature factor and bulk solvent correction) using the CNS program [34], and manual rebuilding with the program "O" [36]. Solvent molecules were added and refined also with the program CNS [34]. The refinement converged to R_{free} and R_{cryst} of

	10	20	30	40	50	60	Identity
BthTX-II	DLWQFGQMI-LKETGKLPFPYYTYG	CVCGWGGQGQPKDATDR	CCFVHDC	CCYG	---	KLTNCK	100%
PrTX-III	DLWQFGKMI-LKETGKLPFPYYVTYG	CVCGVGRGGRPKDATDR	CCFVHDC	CCYG	---	KLTSCK	80%
Basic-Ag	HLLQFRKMI-KKMTGKEPVVSYAFYGC	CVCGSGGRGKPKDATDR	CCFVHDC	CCYE	---	KVTGCD	67%
PrTX-II	SLFELGKMI-LQETGKNPAKSYGAYG	CNCGVLRGKPKDATDR	CCYVHK	CCYK	---	KLTCGN	59%
Acidic-Ag	SLIQFETLI-MKVAKSGMFWYSNYG	CVCGWGGQGRPODATDR	CCFVHDC	CCYG	---	KVTGCD	58%
BthA-I	SLWQFGKMI-NYVMGESGLVQYLSYGC	CVCGGLGGQGPQDATDR	CCFVHDC	CCYG	---	KVTGCD	57%
BthTX-I	SLFELGKMI-LQETGKNPAKSHGAYG	CNCGVLRGKPKDATDR	CCYVHK	CCYK	---	KLTCGN	56%
	-----h1-----		-----Ca ²⁺ loop-----		-----h2-----		
	70	80	90	100	110	120	130
BthTX-II	KTDRYSYSRENGVII	CG-EGTPCEKQI	CECDKAAAVCFRENLR	TYK-KRYMAYPDVL	CKKP-AEKC		100%
PrTX-III	KTDRYSYSRKDGTIV	CG-ENDPCRKEI	CECDKAAAVCFRENLD	TYN-KKYMSYLKSL	CKKX-ADDC		80%
Basic-Ag	KWDDYTSYKNGTIV	CG-GDDPCKKEV	CECDKAAAI	CFRDNLKTYK-KRYMAYPDIL	CSK-SEKC		67%
PrTX-II	KKDRYSYSWKDKTIV	CG-ENNPCLKEL	CECDKAVAI	CLRENLTYN-KKYRYHLKPF	CKKA--DKC		59%
Acidic-Ag	KMDVYSFSENGDIV	CG-GDDPCKKEI	CECDRAAAI	CFRDNLTLNDK	KYWAFGAKNCPQESEPC		58%
BthA-I	KIDSYSYKNGDVV	CG-GDDPCKKQI	CECDRVATT	CFRDNKD	TYD-IKYWYFGAKN	CQEK-SEPC	57%
BthTX-I	KKDRYSYSWKDKTIV	CG-ENNPCLKEL	CECDKAVAI	CLRENLTYN-KKYRYHLKPF	CKKA--DAC		56%
	-----β-wing-----		-----h3-----		-----C-terminal-----		

Fig. 2. Amino-acid sequence alignments of Asp49 and Lys49-PLA₂s: BthTX-I, BthTX-II and BthA-I (from *B. jararacussu*); PrTX-II and PrTX-III (from *B. pirajai*); basic-Ag and acidic-Ag (basic and acidic Asp49-PLA₂ from *A. h. pallas*) [15,19,21,35,41–43]. The alignment numbering scheme follows that of Renetseder et al. [44]. Black boxes denote conserved Cys residues. Grey shaded amino acids denote residues that are conserved in all sequences. Produced by ClustalW program [39].

22.7% and 20.7% respectively. The final models comprise 1891 protein atoms and 231 water molecules. The refinement statistics are shown in Table 1. The quality of the model was checked with the program Procheck [37]. The contacts were analyzed with the program DIMPLOT [38] and the buried surface areas were calculated using the program CNS [34]. The coordinates have been deposited in the RCSB Protein Data Bank with ID code 2OQD.

2.5. Comparative analyses

For molecular comparisons of the Asp49-PLA₂ and Lys49-PLA₂ structures, the program “O” [36] was used with only the C^α coordinates. The comparative analysis of PLA₂s has been performed with BthTX-II, BthTX-I and BthA-I (from *B. jararacussu*), PrTX-II and PrTX-III (from *B. pirajai*), apart of a basic

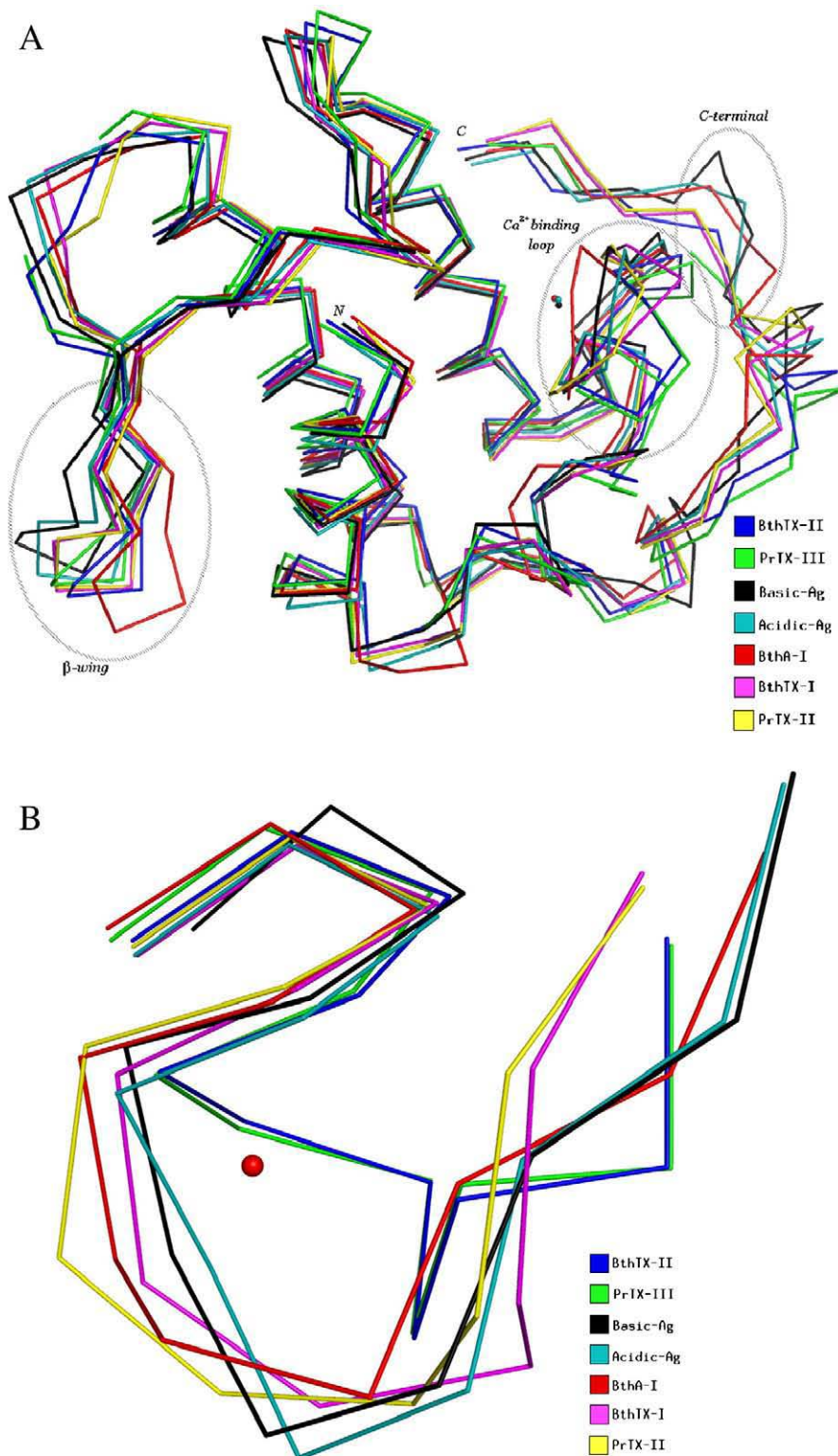


Fig. 3. Superposition between C^α of BthTX-II, BthTX-I and BthA-I (*B. jararacussu*); PrTX-II and PrTX-III (*B. pirajai*); basic Asp49-PLA₂ and acidic Asp49-PLA₂ (*A. h. pallas*) [15,18,21,45-47]. (A) Monomers A; (B) Calcium-binding loop. Drawn using Pymol [40].

and an acid Asp49-PLA₂s (from *A. h. pallas*). An alignment of the class IIA Asp49 and Lys49 PLA₂s from different species (*B. jararacussu*, *B. pirajai* and *Agkistrodon halys pallas*) was produced using only the secondary structure residues using ClustalW program [39].

3. Results

3.1. Overall structure of the BthTX-II

The crystals of BthTX-II diffract to 2.19 Å and belong to the space group C2 with unit-cell constants of $a=58.9$, $b=98.5$, $c=46.7$ Å and $\beta=125.9^\circ$. The refinement converged to a final R value of 20.7% ($R_{\text{free}}=22.7\%$) for all data between 30.0 Å and 2.19 Å (Table 1).

The structure shows excellent overall stereochemistry with no residues found in the disallowed or generously allowed regions of the Ramachandran plot. The overall Procheck G-factor is -0.1 [37].

BthTX-II is a dimeric structure with seven disulfide bridges in each monomer and like other group II PLA₂s, has the following structural features: (i) an N-terminal α -helix; (ii) a “short” helix; (iii) a Ca²⁺-binding loop; (iv) two anti-parallel α -helices (2 and 3); (v) two short strands of anti-parallel β -sheet (β -wing); and (vi) a C-terminal loop (Fig. 1). The catalytic network for class II PLA₂s, formed by His48, Tyr52, Tyr73 and Asp99, is fully conserved.

The monomers of BthTX-II are related by an approximate two-fold axis perpendicular to the β -wing (Fig. 1). Hydrophobic contacts and two intermolecular hydrogen bonds contribute to the stabilization of the dimer. The majority of contacts involve residues of h1 α -helix (residues 10–14), β -wing (residues 78–80) and Leu110 from C-terminus. An alternative dimeric conformation has been observed while analyzing the unit-cell packing of the BthTX-II protein (see Discussion section). The monomers are very similar, where the r.m.s. deviation of C $^\alpha$ atoms is 0.73 Å after the superposition between them.

The C-terminal regions of both monomers and β -wing region of monomer B have high B-factors values and are the more flexible regions of protein. The B-factors in C-termini are 41 Å² and 46 Å² for the monomers A and B, respectively, while these values are 31 Å² and 44 Å² in the β -wing regions for the

monomers A and B, respectively (B-factor for the entire structure is 35.1 Å). In contrast, the three main helices (h1, h2 and h3) in the core region of protein are very stable. The Ca²⁺-binding loop of both monomers, despite their unusual conformation compared to other PLA₂s, have B-factors values comparable to entire structure (32 Å² and 34 Å², respectively for monomers A and B).

3.2. Comparison between PLA₂s

Fig. 2 shows the alignment of the class IIA Asp49 and Lys49-PLA₂s from different species: *Bothrops jararacussu* [19,35,41], *Bothrops pirajai* [15,21] and *Agkistrodon halys pallas* [42,43] produced using only the secondary structure residues. The sequence identity related to BthTX-II varies from 80% (basic Asp49-PLA₂-PrTX-III) to 56% (Lys49-PLA₂-BthTX-I) and 57% (acidic Asp49-PLA₂-BthA-I).

Superposition between C $^\alpha$ atoms of the BthTX-II monomers resulted in an r.m.s. deviation of 0.73 Å while the same superposition between native BthA-I monomers resulted in a value of 0.54 Å [19]. These results are similar to those obtained for other dimeric PLA₂s [14].

The comparison of the monomer A from BthTX-II with monomers from other PLA₂s (BthA-I [45] and BthTX-I from *B. jararacussu* [18]; acidic and basic Asp49-PLA₂ from *A. h. pallas* [46,47]; Lys49-PLA₂ PrTX-II from *B. pirajai* [15]) resulted in r.m.s. deviations of C $^\alpha$ atoms higher than 1.5 Å. By contrast, the monomers of BthTX-II with the low catalytic basic Asp49-PLA₂ PrTX-III are very similar, with an r.m.s. deviation of 0.5 Å.

Fig. 3A shows the superposition between the three main helices (h1, h2, and h3) of the monomers A of the BthTX-II, BthTX-I, BthA-I, acidic and basic Asp49-PLA₂s from *Agkistrodon halys pallas*, PrTX-II and PrTX-III. This comparison indicates that there are two main regions with significant structural differences of the BthTX-II in comparison with other PLA₂s: the Ca²⁺-binding loop and the C-terminal region. Both structural differences seem to be generated by an extreme distortion of Ca²⁺-binding loop (Fig. 3B) which starts in the different configuration adopted by Tyr28 side chain, and mainly by important diversion taken by the main chain dihedral angles of Cys29. The Gly30, Trp31 and Gly32 backbones

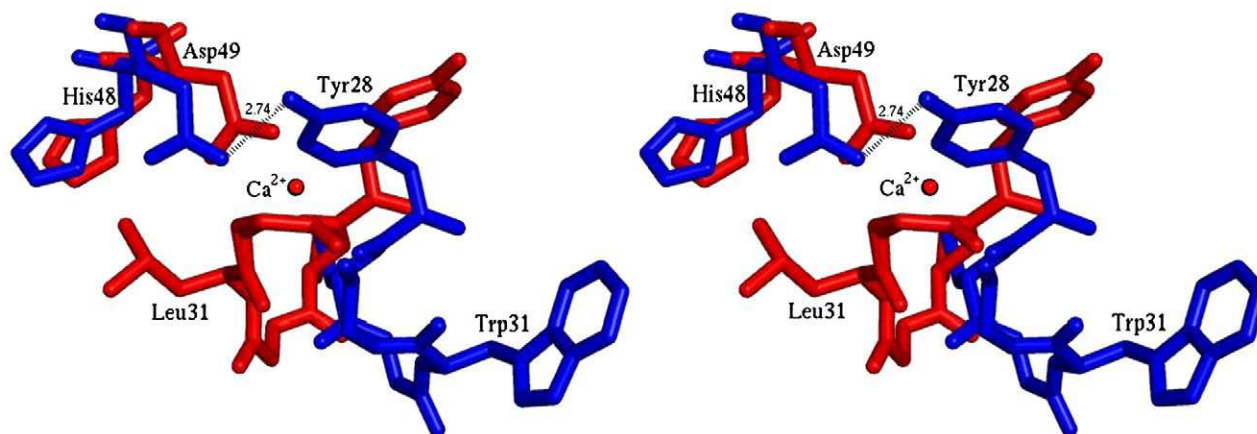


Fig. 4. Stereoview comparison of Ca²⁺-binding loop region between BthTX-II (blue) and BthA-I (red). Red sphere represents a Ca²⁺ ion present in the BthA-I structure [45]. Drawn using Pymol [40]. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

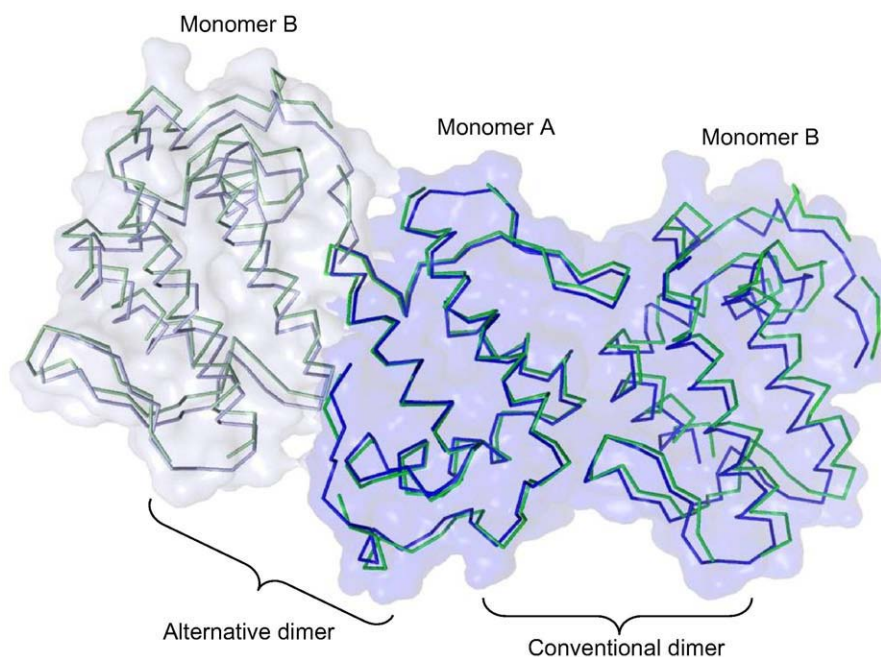


Fig. 5. Superposition of C^{α} atoms of monomer A from PrTX-III (green) and BthTX-II (blue) structures and the relative disposition of the other monomers. An alternative dimeric conformation found in the unit-cell for both proteins is also represented. Drawn using Pymol [40]. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

are approximately perpendicular to all other PLA₂s, with exception of PrTX-III, which adopts very similar conformation. In the present structure, the catalytic residue Asp49, which is in a similar position than other PLA₂s, is hydrogen bound to the Tyr28, residue from Ca²⁺-binding loop (Fig. 4). The Trp31 side chain adopts a conformation totally opposite to the Leu31 in the BthA-I, pointing to the C-terminal region.

This significant distortion of Ca²⁺-binding loop of the BthTX-II and PrTX-III (Fig. 3B) may be confirmed by the large difference r.m.s. deviations of C^{α} atoms of these proteins compared with other PLA₂s. The comparison of the Ca²⁺-binding loop of the BthTX-II with Ca²⁺-binding loop from other PLA₂s (BthA-I [45] and BthTX-I from *B. jararacussu* [18]; acidic and basic Asp49-PLA₂ from *A. h. pallas* [46,47]; Lys49-PLA₂ PrTX-II from *B. pirajai* [15]) resulted in r.m.s. deviations higher than 2.0 Å. In contrast, Ca²⁺-binding loops of BthTX-II and PrTX-III are very similar, with an r.m.s. deviation of 0.2 Å.

The quaternary structure of BthTX-II resembles the Lys49-PLA₂s [13] and one of the two possible dimers of PrTX-III [21] — these authors found two possible biological dimers for PrTX-III structures. Fig. 5 shows the superposition of the monomers A from BthTX-II and PrTX-III (C^{α} atoms of α -helices h1, h2 and h3 were used in the superposition) indicating similar quaternary structure. Furthermore, it also showed the “alternative dimer” found in the unit-cell for both proteins.

4. Discussion

4.1. Quaternary structure

BthTX-II and PrTX-III are unique proteins among class I/II PLA₂s studied to this date. They have actions of both Asp49

and Lys49-PLA₂s, being myotoxic and cytotoxic as Lys49-PLA₂s and having catalytic activity as Asp49-PLA₂s (low catalytic activity compared to BthA-I). BthTX-II also is able to induce platelet aggregation in a concentration-dependent manner [28], in contrast with BthA-I which caused a hypotensive response in rats and inhibited platelet aggregation [5].

The oligomeric state is an important and enigmatic issue for many of phospholipase A₂ structures solved to this date [14,48–52]. It has been shown that the majority of Lys49-PLA₂s are dimeric in solution using electrophoretic and spectroscopic techniques [17,18,53], however GodMT-II has a monomeric conformation [17]. This is likely to be due to physicochemical conditions used in the crystallization experiments (low pH value) and the dimeric state should be found in vivo [17]. It has been shown that oligomeric conformation is essential for myotoxic, cytotoxic and Ca²⁺-independent membrane damaging effects [48,54,55]. These authors also showed that this oligomeric conformation is pH dependent, which confirms the hypothesis that GodMT-II is monomeric just because it was crystallized at low pH. Recent site-directed mutagenesis associated with spectroscopic experiments also demonstrated the importance of dimeric conformation of Lys49-PLA₂s in its biological function [54].

For the acidic PLA₂s from *B. jararacussu* (BthA-I), in contrast with the Lys49-PLA₂s, there is no consensus regarding its oligomeric conformation. BthA-I native structure was solved both in monomeric and dimeric conformations [19]. Furthermore, BthA-I complexed with *p*-bromophenacyl bromide inhibitor was solved in another dimeric and more stable conformation compared to native BthA-I [20]. BthTX-II structure resembles those of Lys49-PLA₂s, however an alternative crystal lattice can be observed for BthTX-II. In this assembly, the dimeric conformation is kept only by one hydrogen bond and a few hydrophobic

interactions from C-terminal and short helix regions. Similar conformations were also found for PrTX-III structure (Fig. 5) [21].

We suggest that dimeric Lys49-PLA₂ assembly is the conformation for the BthTX-II based on three main reasons. (i) This conformation is stabilized by a larger number of hydrophobic contacts (seven interactions) and two intermolecular hydrogen bonds. In contrast, the alternative conformation is stabilized by six hydrophobic contacts and one intermolecular hydrogen bond. (ii) The higher *B*-factors values are found in the C-terminus which is in the outer part of structure, while for the alternative assembly, this region is in the interface of the monomers. In contrast, the β -wing *B*-factors, which are 31 and 44 Å² in the subunits *A* and *B*, respectively, are close to the overall *B*-factor of 35.1 Å² and should stay in the inner part of structure. The β -wing of the monomeric Lys49-PLA₂, GodMT-II [17] has higher *B*-factors when compared to the other sections of this molecule. (iii) The Lys49-PLA₂ conformation is found in more than ten crystallographic structures which have at least five different space groups suggesting no influence of crystal packing of molecules.

Recently, it has been solved that the crystal structure of Lys49-PLA₂ Basp-II complexed to suramin [11] in which one suramin molecule binds to both monomers of protein, such arrangement is only permitted for a non-conventional dimer for Lys49-PLA₂s. However, this “non-conventional dimer” found for the Basp-II/suramin structure is not the same alternative assembly described here for BthTX-II.

4.2. The distorted Ca²⁺-binding loop — possible relation with low catalytic activity

BthTX-II and PrTX-III structures that revealed Ca²⁺-binding loops are extremely distorted. The binding of Ca²⁺, required for phospholipase activity in Asp49-PLA₂s [56], involves the residues Asp49 and Tyr28. In the BtTX-II structure Asp49 is hydrogen bound to the Tyr28 (Fig. 4). The BthA-I, acidic and basic Asp49-PLA₂ from *A. h. pallas* present Ca²⁺ ions at the distances from the atom O δ 1 of Asp49 in the range of 2.8 to 2.6 Å. In contrast, by the superposition of BthA-I with the monomer A of BthTX-II put a putative Ca²⁺ ion in this structure at the distance of 4.6 Å from O δ 1 atom of Asp49. This value shows clearly, a distortion of the Ca²⁺-binding loop in the present structure beyond that expected from the simple absence of Ca²⁺ ion.

Asp49-PLA₂s have been solved in the native form and in the presence of Na⁺ or Ca²⁺ ions. The crystal structure of native BthA-I was described in two conformational states: monomeric (m-BthA-I — in the presence of Na⁺ ions) and dimeric (d-BthA-I) [19]. Subsequently, high resolution structures of m-BthA-I have been described, both in the *apo* form and in the presence of Ca²⁺ ions [45]. Remarkably, for all these BthA-I structures (five monomers in the total) the Ca²⁺-binding loops have approximately the same conformation. The Na⁺ and Ca²⁺ ions or a water molecule, for native protein, is in the same position in the Ca²⁺-binding loop for all structures. Consequently, we can conclude that Ca²⁺-binding loop does not suffer substantial conformational alterations for Asp49-PLA₂s solved in the presence or in the absence of Ca²⁺ ions.

BthTX-II was unable despite of the crystallization to have occurred in the presence of this ion. In contrast, other Asp49-PLA₂s which are able to bind Ca²⁺ ions are also able to bind Na⁺ ions at approximately the same position in the Ca²⁺-binding loop [57].

Magro et al. [20] solved the structure of BthA-I chemically modified with BPB (*p*-bromophenacyl bromide) and showed important tertiary and quaternary structural changes in this enzyme. The comparison between the BPB inhibited and native BthA-I leads to the observation of three main regions with significant structural differences: the Ca²⁺-binding loop, the C-terminus, and the β -wing. The presence of the inhibitor in the active site displaces the Ca²⁺-binding loop which interacts with C-terminal region, also displacing it. Residues Gly30, Leu31, and Leu32 are displaced by BPB group, yielding a different conformation in the Ca²⁺-binding loop [20]. Additionally, it has been suggested that divalent cations like Ca²⁺ protect PLA₂ against inactivation by BPB and that Ca²⁺ does not bind to the inactivated PLA₂ [58]. Similarly, acidic PLA₂ from *A. h. pallas* in the presence of Ca²⁺ prevents BPB modification [59]. This fact is probable due to the absence of a water molecule that coordinates the Ca²⁺ ion generated by distorted geometry of Ca²⁺-binding loop [60,61]. These examples of PLA₂/ligands complexes show that distorted Ca²⁺-binding loops cannot bind bivalent ions.

Then, these facts above denote that PLA₂s, which bind Ca²⁺ ions, do not show significant changes in the Ca²⁺-binding loops in the presence or absence of Ca²⁺ ions, in contrast, PLA₂s with distorted Ca²⁺-binding loops cannot bind Ca²⁺ ions. Consequently, we hypothesize that BthTX-II cannot bind Ca²⁺ and its low catalytic function is based in an alternative way compared with other Asp49-PLA₂s.

In conclusion, we showed that BthTX-II is not able to bind Ca²⁺, consequently, we suggest that its low catalytic function is based in an alternative mechanism compared with other phospholipases. Additional functional, biochemical and co-crystallization with inhibitor studies on this protein may elucidate the complete catalytic and pharmacological behavior of this protein.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP), and Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas-SP).

References

- [1] L.L.M. van Deenen, G.H. de Haas, The substrate specificity of phospholipase A, *Biochem. Biophys. Acta* 70 (1963) 538–553.
- [2] D.L. Scott, A. Achari, J.C. Vidal, P.B. Sigler, Crystallographic and biochemical studies of the (inactive) Lys-49 phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 22645–22657.
- [3] J.M. Gutiérrez, B. Lomonte, in: R.M. Kini (Ed.), *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism*, Wiley, Chichester, 1997, pp. 321–352.

- [4] C.L. Ownby, Structure, function and biophysical aspects of the myotoxins from snake venoms, *J. Toxicol., Toxin Rev.* 17 (1998) 1003–1009.
- [5] S.H. Andrião-Escarso, A.M. Soares, M.R.M. Fontes, A.L. Fuly, F.M.A. Corrêa, J.C. Rosa, L.J. Greene, J.R. Giglio, Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* snake venom, *Biochem. Pharmacol.* 64 (2002) 723–732.
- [6] R.M. Kini, H.J. Evans, A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂, *Toxicon* 27 (1989) 613–635.
- [7] A.M. Soares, J.R. Giglio, Chemical modifications on phospholipases A₂ from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties, *Review, Toxicon* 42 (2004) 855–868.
- [8] P. Needleman, J. Turk, B.A. Jakschik, A.R. Morrison, J.B. Lefkowitz, Arachidonic acid metabolism, *Annu. Rev. Biochem.* 55 (1986) 69–102.
- [9] D.P. Marchi-Salvador, C.A.H. Fernandes, S.F. Amui, A.M. Soares, M.R.M. Fontes, Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a myotoxic Lys49-PLA₂ from *Bothrops jararacussu* venom complexed with *p*-bromophenacyl bromide, *Acta Crystallogr. F* 62 (2006) 600–603.
- [10] D.P. Marchi-Salvador, L.B. Silveira, A.M. Soares, M.R.M. Fontes, Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of myotoxin I, a Lys49-phospholipase A₂ from *Bothrops moojeni*, *Acta Crystallogr. F* 61 (2005) 882–884.
- [11] M.T. Murakami, E.Z. Arruda, P.A. Melo, A.B. Martinez, S.C. Eliás, M.A. Tomaz, B. Lomonte, J.M. Gutiérrez, R.K. Arni, Inhibition of myotoxic activity of *Bothrops asper* myotoxin II by the anti-trypanosomal drug suramin, *J. Mol. Biol.* 350 (2005) 416–426.
- [12] L. Watanabe, A.M. Soares, R.J. Ward, M.R.M. Fontes, R.K. Arni, Structural insights for fatty acid binding in a Lys49 phospholipase A₂: crystal structure of myotoxin II from *Bothrops moojeni* complexed with stearic acid, *Biochimie* 87 (2005) 161–167.
- [13] A.M. Soares, M.R.M. Fontes, J.R. Giglio, Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms: structure–function relationship, *Curr. Org. Chem.* 8 (2004) 1677–1690.
- [14] A.J. Magro, A.M. Soares, J.R. Giglio, M.R.M. Fontes, Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A₂: quaternary structure and inhibition mechanism insights, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311 (2003) 713–720.
- [15] W.H. Lee, M.T. da Silva-Giotto, S. Marangoni, M.H. Toyama, I. Polikarpov, R.C. Garratt, Structural basis for low catalytic activity in Lys49-phospholipase A₂ — a hypothesis: the crystal structure of piratoxin II complexed to fatty acid, *Biochemistry* 40 (2001) 28–36.
- [16] R.K. Arni, R.J. Ward, J.M. Gutiérrez, A. Tulinsky, Structure of a calcium-independent phospholipase-like myotoxic protein from *Bothrops asper*, *Acta Crystallogr., D Biol. Crystallogr.* 51 (1995) 311–317.
- [17] R.K. Arni, M.R.M. Fontes, C. Barberato, J.M. Gutiérrez, C. Diaz-Oreiro, R.J. Ward, Crystal structure of myotoxin II, a monomeric Lys49-phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of *Cerrophidion (Bothrops) godmani*, *Arch. Biochem. Biophys.* 366 (1999) 177–182.
- [18] M.T. da Silva-Giotto, R.C. Garrat, G. Oliva, Y.P. Mascarenhas, J.R. Giglio, A.C.O. Cintra, W.F. de Azevedo Jr., R.K. Arni, R.J. Ward, Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: conformational changes in bothropstoxin I, a dimeric Lys49-phospholipase A₂ homologue, *Protein Struct.-Funct. Gen.* 30 (1998) 442–454.
- [19] A.J. Magro, M.T. Murakami, S. Marcussi, A.M. Soares, R.K. Arni, M.R.M. Fontes, Crystal structure of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A₂ in the monomeric and dimeric states: insights into its oligomeric state, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323 (2004) 24–31.
- [20] A.J. Magro, A.A.S. Takeda, A.M. Soares, M.R.M. Fontes, Crystal structure of BthA-I complexed with *p*-bromophenacyl bromide: possible correlations with lack of pharmacological activities, *Acta Crystallogr. D* 61 (2005) 1670–1677.
- [21] D.J. Rigden, L.W. Hwa, S. Marangoni, M.H. Toyama, I. Polikarpov, The structure of the D49 phospholipase A₂ piratoxin III from *Bothrops pirajai* reveals unprecedented structural displacement of the calcium-binding loop: possible relationship to cooperative substrate binding, *Acta Crystallogr. D* 59 (2003) 255–262.
- [22] S.M.T. Serrano, A.P. Reichl, R. Mentele, E.A. Auerswald, M.L. Santoro, C.A.M. Sampaio, A.C.M. Camargo, M.T. Assakura, A novel phospholipase A₂, BJ-PLA₂, from the venom of the snake *Bothrops jararaca*: purification, primary structure analysis, and its characterization as a platelet-aggregation-inhibiting factor, *Arch. Biochem. Biophys.* 367 (1999) 26–32.
- [23] M.F. Pereira, J.C. Novello, A.C.O. Cintra, J.R. Giglio, E.C.T. Landucci, B. Oliveira, S. Marangoni, The amino acid sequence of bothropstoxin-II, an Asp-49 myotoxin from *Bothrops jararacussu* (jararacussu) venom with low phospholipase A₂ activity, *J. Protein Chem.* 17 (1998) 381–386.
- [24] J.J. Daniele, I.D. Bianco, G.D. Fidelio, Kinetic and pharmacological characterization of phospholipases A₂ from *Bothrops neuwiedii* venom, *Arch. Biochem. Biophys.* 318 (1995) 65–70.
- [25] M.I. Homsí-Brandeburgo, L.S. Queiroz, H. Santo-Neto, L. Rodrigues-Simioni, J.R. Giglio, Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin, *Toxicon* 26 (1988) 615–627.
- [26] P.G. Roberto, S. Kashima, S. Marcussi, J.O. Pereira, S. Astolfi-Filho, A. Nomizo, J.R. Giglio, M.R.M. Fontes, A.M. Soares, S.C. França, Cloning and identification of a complete cDNA coding for a bactericidal and antitumoral venom, *Protein J.* 23 (2004) 273–285.
- [27] J.M. Gutiérrez, J. Nunez, C. Diaz, A.C.O. Cintra, M.I. Homsí-Brandeburgo, J.R. Giglio, Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin-II, phospholipase A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*, *Exp. Mol. Pathol.* 55 (1991) 217–229.
- [28] A.L. Fuly, A.M. Soares, S. Marcussi, J.R. Giglio, J.A. Guimaraes, Signal transduction pathways involved in the platelet aggregation induced by a D-49 phospholipase A₂ isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom, *Biochimie* 86 (2004) 731–739.
- [29] A. MacPherson, *Preparation and Analysis of Protein Crystals*, Wiley, New York, 1982.
- [30] J. Jancarik, S.H. Kim, Sparse matrix sampling: a screen method for crystallization of proteins, *J. Appl. Crystallogr.* 24 (1991) 409–411.
- [31] L.C. Corrêa, D.P. Marchi-Salvador, A.C.O. Cintra, A.M. Soares, M.R.M. Fontes, Preliminary X-ray crystallographic studies of BthTX-II, a myotoxic Asp49-phospholipase A₂ with low catalytic activity from *Bothrops jararacussu* venom, *Acta Crystallogr. F* 62 (2006) 765–767.
- [32] Z. Otwinowski, W. Minor, Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode, *Methods Enzymol.* 276 (1997) 307–326.
- [33] J. Navaza, AMoRe: an automated package for molecular replacement, *Acta Crystallogr. A* 50 (1994) 157–163.
- [34] A.T. Brünger, P.D. Adams, G.M. Clore, W.L. DeLano, P. Gros, R.W. Grosse-Kunstleve, J.-S. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N.S. Pannu, R.J. Read, L.M. Rice, T. Simonson, G.L. Warren, *Crystallography & NMR System: a new software suite for macromolecular structure determination*, *Acta Crystallogr., D Biol. Crystallogr.* 54 (1998) 905–921.
- [35] S. Kashima, P.G. Roberto, A.M. Soares, S. Astolfi-Filho, J.O. Pereira, S. Giulietti, M.J. Faria, M.A. Xavier, M.R.M. Fontes, J.R. Giglio, S.C. França, Analysis of *Bothrops jararacussu* venomous gland transcriptome focusing on structural and functional aspects: l-gene expression profile of highly expressed phospholipases A₂, *Biochimie* 86 (2004) 211–219.
- [36] T.A. Jones, M. Bergdoll, M. Kjeldgaard, O. a macromolecule modeling environment, in: C.E. Bugg, S.E. Ealick (Eds.), *Crystallographic and Modeling Methods in Molecular Design*, Springer-Verlag, New York, 1990, pp. 189–195.
- [37] R.A. Laskowski, M.W. Macarthur, D.S. Moss, J.M. Thornton, Procheck — a program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Crystallogr.* 26 (1993) 283–291.
- [38] A.C. Wallace, R.A. Laskowski, J.M. Thornton, A program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions, *Prot. Eng.* 8 (1995) 127–134.
- [39] D. Higgins, J. Thompson, T. Gibson, J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 4673–4680.
- [40] W.L. DeLano, The PyMOL molecular graphics system, *Proteins* 30 (2002) 442–454.
- [41] A.C.O. Cintra, S. Marangoni, B. Oliveira, J.R. Giglio, Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function, *J. Protein Chem.* 12 (1993) 57–64.

- [42] K. Zhao, S. Song, Z. Lin, Y. Zhou, Preliminary crystallographic studies of a basic phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon halys pallas*, *Shengwu Huaxue Zazhi* 13 (1997) 765.
- [43] Y.C. Chen, J.M. Maraganore, I. Reardon, R.L. Heinrikson, Characterization of the structure and function of three phospholipases A₂ from the venom of *Agkistrodon halys pallas*, *Toxicon* 25 (1987) 401–409.
- [44] R. Renetseder, S. Brunie, B.W. Dijkstra, J. Drenth, P.B. Sigler, A comparison of the crystal structures of phospholipases A₂ from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 11627–11636.
- [45] M.T. Murakami, A. Gabdoulkhakov, N. Genov, A.C.O. Cintra, C. Betzel, R.K. Arni, Insights into metal ion binding in phospholipases A₂: ultra high-resolution crystal structures of an acidic phospholipase A₂ in the Ca²⁺ free and bound states, *Biochimie* 88 (2006) 543–549.
- [46] X.Q. Wang, J. Yang, L.L. Gui, Z.J. Lin, Y.C. Chen, Y.C. Zhou, Crystal structure of an acidic phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon halys pallas* at 2.0 Å resolution, *J. Mol. Biol.* 255 (1996) 669–676.
- [47] K. Zhao, S. Song, Z. Lin, Y. Zhou, Structure of a basic phospholipase A₂ from *Agkistrodon halys pallas* at 2.13 Å resolution, *Acta Crystallogr. D* 54 (1998) 510–521.
- [48] Y.H. Pan, T.M. Epstein, M.K. Jain, B.J. Bahnson, Five coplanar anion binding sites on one face of phospholipase A₂: relationship to interface binding, *Biochemistry* 40 (2001) 609–617.
- [49] A.H. de Oliveira, J.R. Giglio, S.H. Andrião-Escarso, A.S. Ito, R.J. Ward, A pH-induced dissociation of the dimeric form of a lysine 49-phospholipase A₂ abolishes Ca²⁺-independent membrane damaging activity, *Biochemistry* 40 (2001) 6912–6920.
- [50] N. Dekker, Outer-membrane phospholipase A: known structure, unknown biological function, *Mol. Microbiol.* 35 (2000) 711–717.
- [51] S.A. Sanchez, Y. Chen, J.D. Muller, E. Gratton, T.L. Hazlett, Solution and interface aggregation states of *C. atrox* venom phospholipase A₂ by 2-photon excitation fluorescence correlation spectroscopy, *Biochemistry* 40 (2001) 6903–6911.
- [52] H.J. Snijder, I. Ubarretxena-Belandia, M. Blaauw, K.H. Kalk, H.M. Verheij, M.R. Egmond, N. Dekker, B.W. Dijkstra, Structural evidence for dimerization-regulated activation of an integral membrane phospholipase, *Nature* 401 (1999) 717–721.
- [53] A.M. Soares, R. Guerra-Sá, C.R. Borja-Oliveira, V.M. Rodrigues, L. Rodrigues-Simioni, V. Rodrigues, M.R.M. Fontes, B. Lomonte, J.M. Gutiérrez, J.R. Giglio, Structural and function characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Bothrops neuwiedi* venom, *Arch. Biochem. Biophys.* 378 (2000) 210–219.
- [54] R. Ruller, E.A. Aragão, L. Chioato, T.L. Ferreira, A.H.C. Oliveira, J.M. Sá, R. Ward, A predominant role for hydrogen bonding in the stability of the homodimer of bothropstoxin-I, a lysine 49-phospholipase A₂, *Biochimie* 87 (2005) 993–1003.
- [55] D.L. Scott, P.B. Sigler, Structure and catalytic mechanism of secretory phospholipases A₂, *Adv. Protein Chem.* 45 (1994) 53–88.
- [56] Y. Angulo, B. Lomonte, A.M. Soares, J.M. Gutiérrez, W.H. Cho, Myotoxic and cytolytic activities of dimeric Lys49 phospholipase A₂ homologues are reduced, but not abolished, by a pH-induced dissociation, *Toxicon* 46 (2005) 291–296.
- [57] G. Singh, S. Gourinath, S. Sharma, M. Paramasivam, A. Srinivasan, T.P. Singh, Sequence and crystal structure determination of a basic phospholipase A₂ from common krait at 2.4 Å resolution: identification and characterization of its pharmacological sites, *J. Mol. Biol.* 307 (2001) 1049–1059.
- [58] J.J. Volwerk, W.A. Pieterse, G.H. de Haas, Histidine at the active site of phospholipase A₂, *Biochemistry* 13 (1974) 1446–1454.
- [59] X. Zhang, L. Zheng, N.Q. Lin, K.C. Ruan, Y.C. Zhou, Effect of calcium ion on the structure and function of phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon halys pallas* (1994), *Chinese Biochemical Journal* 10 (1994) 330–334.
- [60] R. Renetseder, B.W. Dijkstra, K. Huizinga, K.H. Kalk, J. Drenth, Crystal structure of bovine pancreatic phospholipase A₂ covalently inhibited by *p*-bromo-phenacyl-bromide, *J. Biol. Chem.* 200 (1988) 181–188.
- [61] H. Zhao, T. Liang, W. Xiaoqiang, Z. Yuancong, L. Zhengjiong, Structure of a snake venom phospholipase A₂ modified by *p*-bromo-phenacyl-bromide, *Toxicon* 36 (1998) 875–886.

APÊNDICE VII

**Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of myotoxin I, a
Lys49-phospholipase A₂ from *Bothrops moojeni*.**

D. P. Marchi-Salvador,^a
L. B. Silveira,^b A. M. Soares^b and
M. R. M. Fontes^{a*}

^aDepartamento de Física e Biofísica-IB, UNESP,
CP 510, CEP 18618-000, Botucatu-SP, Brazil,
and ^bDepartamento de Biotecnologia, UNAERP,
Ribeirão Preto/SP, Brazil

Correspondence e-mail: fontes@ibb.unesp.br

Received 1 April 2005
Accepted 26 August 2005
Online 13 September 2005

Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of myotoxin I, a Lys49-phospholipase A₂ from *Bothrops moojeni*

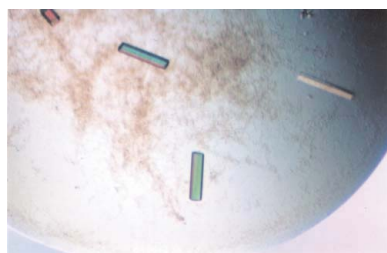
A new myotoxic Lys49-phospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom has been crystallized. The crystals diffracted to 2.18 Å resolution using a synchrotron-radiation source and belong to space group C2. The unit-cell parameters are $a = 56.8$, $b = 125.0$, $c = 64.7$ Å, $\beta = 105.5^\circ$. Preliminary analysis indicates the presence of four molecules in the asymmetric unit. This may suggest a new quaternary structure for this Lys49-phospholipase A₂ in contrast to the dimeric and monomeric structures solved so far for this class of proteins.

1. Introduction

Bothrops moojeni is a snake found in southeastern Brazil that causes an important number of ophidian accidents (Ribeiro *et al.*, 1998). The acute muscle damage induced by bothropic venoms is mainly caused by one or two basic myotoxic phospholipases A₂ (PLA₂s; Gutiérrez & Lomonte, 1995) and may lead to permanent tissue loss, disability and amputation (Rosenfeld, 1971; Nishioka & Silveira, 1982). PLA₂s are also one of the enzymes involved in the production of eicosanoids. These molecules have physiological effects at very low concentrations, but an increase in their concentration can lead to inflammation (Needleman *et al.*, 1986). Thus, the study of specific PLA₂ inhibitors may be important for the production of structure-based anti-inflammatory agents. Consequently, the study of these proteins is an important issue from scientific, medical and social points of view.

Phospholipases A₂ (EC 3.1.1.4) belong to a superfamily of proteins that hydrolyze the *sn*-2 acyl groups of membrane phospholipids to release arachidonic acid and lysophospholipids. The PLA₂ superfamily is divided into 11 classes (Six & Dennis, 2000) of which five (I, II, III, V and X) are abundant in a variety of biological fluids, particularly pancreatic secretions, inflammatory exudates and reptile and arthropod venoms (Rosenberg, 1990). PLA₂s of groups I and II are the major components of snake venoms, group II being predominant in bothropic venoms. In addition to their catalytic role, snake-venom PLA₂s show a broad range of relevant biological effects, including myotoxic, cytotoxic, oedema-inducing, artificial membrane disrupting, anticoagulant, neuromuscular, platelet-aggregation inhibiting, hypotensive, bactericidal, anti-HIV, anti-tumoral, antimalarial and antiparasitic effects (Gutiérrez & Lomonte, 1997; Ownby, 1998; Valentin & Lambeau, 2000).

Myonecrosis (muscle necrosis) may arise indirectly as a consequence of the vessel degeneration and ischaemia caused by haemorrhagic metalloproteases or as a direct effect of myotoxic PLA₂ homologues upon the plasma membranes of muscle cells (Rosenfeld, 1971). It is believed that myotoxins act on the sarco-plasma membrane, thus inducing disorganization of phospholipids, loss of intracellular components and influx of Ca²⁺ ions (Díaz *et al.*, 1992). PLA₂s with skeletal muscle-damaging (myotoxicity) activity are widely distributed in venomous snakes and can be subdivided into at least three subclasses: (i) the Asp49 enzymes with high catalytic activity, (ii) the Ser49 enzymes with lower catalytic activity and (iii) the Lys49 enzymes, which do not display measurable catalytic activity (Shimohigashi *et al.*, 1995; Ownby *et al.*, 1999). The most abundant protein in many bothropic venoms is a natural mutant in which Asp49 is changed to Lys (subclass iii). This Asp49-to-Lys mutation prevents



calcium binding and the protein lacks catalytic activity. However, these Lys49-PLA₂s are capable of destroying the integrity of membranes and provoking release from liposomes (Rufini *et al.*, 1992). This process occurs in the absence of calcium ions without detectable lipid hydrolysis. One possibility is that these proteins are catalytically active towards an as yet unidentified phospholipid analogue.

Several crystal structures of Lys49-PLA₂s from the genus *Bothrops* have already been solved, revealing very similar fold patterns (Arni *et al.*, 1995, 1999; de Azevedo *et al.*, 1997, 1999; da Silva-Giotto *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2001; Magro *et al.*, 2003). However, new insights into the quaternary structure changes and the lack of phospholipase activity have recently been reported (Magro *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2004). The lack of catalytic activity of myotoxic Lys49-PLA₂s, which was first related solely to the fact that Lys49 occupies the position of the calcium ion in the catalytically active site of Asp49-PLA₂s, has also been attributed to Lys122, which interacts with the carbonyl of Cys29, hyperpolarizing the peptide bond between Cys29 and Gly30 (Lee *et al.*, 2001; Soares *et al.*, 2004). It has been observed that Lys122 is present in a conformation interacting with Cys29 for both monomers in those structures bound with a ligand (Watanabe *et al.*, 2005). However, considering the high sequential and structural homology of this class of proteins, further structural studies seem to be essential in order to obtain a deeper understanding of their lack of phospholipase activity and their pharmacological effects.

The isolation, biochemical/pharmacological characterization and amino-acid sequence of myotoxin I from *B. moojeni* (MjTX-I) has been reported (Soares *et al.*, 2000). Protein sequencing indicated that MjTX-I is a Lys49-PLA₂ and consists of 121 amino acids (MW = 13 669 Da; SWISS-PROT database code No. P82114). The protein showed local myotoxic and oedema-inducing activities in mice and is lethal by intraperitoneal injection. In addition, it is cytotoxic to myoblasts/myotubes in culture and disrupts negatively charged liposomes. MjTX-I does not present measurable enzymatic and anticoagulant activities (Soares *et al.*, 2000).

In the present paper, we describe the crystallization and X-ray diffraction data collection of MjTX-I, aiming to solve the structure and gain insights into functional aspects of this protein.

2. Experimental procedures

2.1. Purification

MjTX-I was isolated from *B. moojeni* snake venom by ion-exchange chromatography on CM-Sepharose (Soares *et al.*, 2000). The homogeneity of the toxin was assayed by SDS-PAGE, cathodic

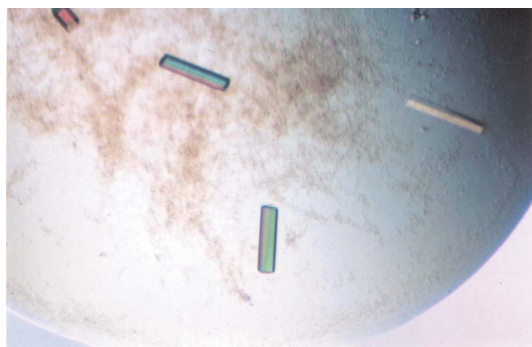


Figure 1
Crystals of MjTX-I from *B. moojeni*.

Table 1

Data-collection and processing statistics.

Values in parentheses are for the highest resolution shell.

Unit-cell parameters (Å)	$a = 56.8, b = 125.0, c = 64.7, \beta = 105.5$
Space group	C2
Resolution (Å)	40–2.18 (2.28–2.18)
Unique reflections	22875 (2843)
Completeness (%)	97.0 (96.8)
$R_{\text{merge}}^{\dagger}$ (%)	6.0 (52.5)
Radiation source	Synchrotron (LNLS-CPr)
Data-collection temperature (K)	100
$\sigma(I)$ cutoff for data processing \ddagger	–3
$I/\sigma(I)$	19.2 (2.0)
Redundancy	3.8 (3.7)

$\dagger R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} [\sum_i (I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle)] / \sum_{hkl,i} I_{hkl,i}$, where $I_{hkl,i}$ is the intensity of an individual measurement of the reflection with Miller indices h, k and l and $\langle I_{hkl} \rangle$ is the mean intensity of that reflection. Calculated for $I > -3\sigma(I)$. \ddagger Data processing used the *HKL* suite (Otwinowski & Minor, 1997).

PAGE, isoelectric focusing and immunoelectrophoresis (Soares *et al.*, 2000).

2.2. Crystallization

A lyophilized sample of MjTX-I was dissolved in ultrapure water at a concentration of 12 mg ml^{–1}. The sparse-matrix method (Jancarik & Kim, 1991) was used to perform initial screening of the crystallization conditions (Crystal Screens I and II, Hampton Research).

Small polycrystals of MjTX-I were obtained by the conventional hanging-drop vapour-diffusion method (McPherson, 1982), in which the protein solution was equilibrated against a reservoir containing 0.2 M magnesium chloride, 30% (w/v) polyethylene glycol 4000 and 0.1 M Tris–HCl pH 8.5 (Hampton Research Crystal Screen I, condition No. 6) after two months at 291 K. In order to improve the crystal quality, we made some modifications to the original reservoir solution. Better monocrystals were obtained with 0.15 M magnesium chloride, 32% (w/v) polyethylene glycol 4000 and 0.1 M Tris–HCl pH 8.5 and measured approximately 0.20 × 0.15 × 0.10 mm after approximately 12 months (Fig. 1).

2.3. X-ray data collection and processing

X-ray diffraction data from a single MjTX-I crystal were collected at a wavelength of 1.421 Å (at 100 K) using a synchrotron-radiation source (Laboratório Nacional de Luz Sincrotron, LNLS, Campinas, Brazil) and a MAR CCD imaging-plate detector (MAR Research). The crystal was mounted in a nylon loop and flash-frozen in a stream of nitrogen at 100 K using no cryoprotectant. The crystal-to-detector distance was 80 mm and an oscillation range of 1° was used; 146 images were collected. The data were processed to 2.18 Å resolution using the *HKL* program package (Otwinowski & Minor, 1997).

3. Results and discussion

The data-collection statistics are shown in Table 1. The data set is 97.0% complete at 2.18 Å resolution with $R_{\text{merge}} = 6.0\%$. The crystals belong to space group C2, with unit-cell parameters $a = 56.8, b = 125.0, c = 64.7$ Å, $\beta = 105.5^\circ$.

Packing-parameter calculations based on the protein molecular weight indicate the presence of three or four molecules in the asymmetric unit. This corresponds to a Matthews coefficient (Matthews, 1968) of 2.0 Å³ Da^{–1} with a solvent content of 54.5% or 2.7 Å³ Da^{–1} with a solvent content of 39.3% for three and four molecules in the asymmetric unit, respectively. To evaluate the local

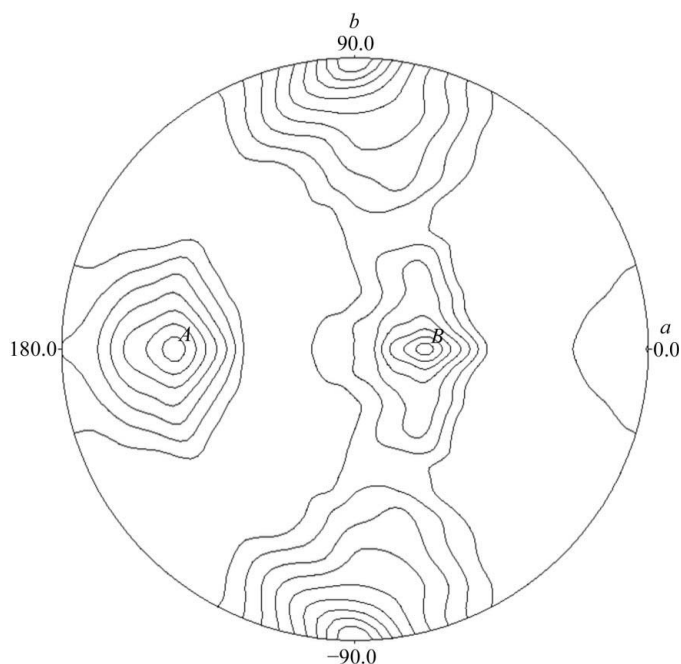


Figure 2 Self-rotation function projection of the $\kappa = 180^\circ$ section for MjTX-I calculated using *POLARRFN* (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994). Spherical polar angles are defined as follows: φ , the angle from the Cartesian x axis (a) on the xy plane (ab); ω , the angle from z axis (c); κ , the rotation around the axis defined by $\varphi\omega$.

symmetry of MjTX-I, the self-rotation function was calculated between 15 and 3.5 Å resolution applying an integration radius of 20 Å with the program *POLARRFN* (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994). The $\kappa = 180^\circ$ self-rotation function projection in the ab plane (Fig. 2) reveals a peak at $\varphi = 90$ and -90° on the circumference arising from the crystallographic twofold axis. The presence of two peaks with similar height (*A* and *B*) suggests the presence of two twofold non-crystallographic symmetry (NCS) axes, which is compatible with 222 symmetry and a tetramer in the asymmetric unit. This leads to a new quaternary structure for MjTX-I in contrast to the dimeric (Arni *et al.*, 1995; de Azevedo *et al.*, 1997, 1999; da Silva-Giotto *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2001; Magro *et al.*, 2003) and monomeric (Arni *et al.*, 1999) Lys49-phospholipase A_2 structures solved to date.

Efforts are being made towards molecular-replacement solution using the *AMoRe* program (Navaza, 1994) with the coordinates of several Lys49-PLA₂s.

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP) and Laboratório Nacional

de Luz Síncrotron (LNLS). We thank Dr G. Oliva (IFSC-USP) for useful discussions.

References

- Arni, R. K., Fontes, M. R. M., Barberato, C., Gutiérrez, J. M., Díaz-Oreiro, C. & Ward, R. J. (1999). *Arch. Biochem. Biophys.* **366**, 177–182.
- Arni, R. K., Ward, R. J. & Gutiérrez, J. M. (1995). *Acta Cryst. D* **51**, 311–317.
- Azevedo, W. F. de Jr, Ward, R. J., Gutiérrez, J. M. & Arni, R. K. (1999). *Toxicon*, **37**, 371–384.
- Azevedo, W. F. de Jr, Ward, R. J., Lombardi, F. R., Giglio, J. R., Soares, A. M., Fontes, M. R. M. & Arni, R. K. (1997). *Protein Pept. Lett.* **4**, 329–334.
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1994). *Acta Cryst. D* **50**, 760–763.
- Díaz, C., Gutiérrez, J. M. & Lomonte, B. (1992). *Arch. Biochem. Biophys.* **298**, 135–142.
- Gutiérrez, J. M. & Lomonte, B. (1995). *Toxicon*, **33**, 1405–1424.
- Gutiérrez, J. M. & Lomonte, B. (1997). *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism*, edited by R. M. Kini, pp. 321–352. Chichester: John Wiley & Sons.
- Jancarik, J. & Kim, S.-H. (1991). *J. Appl. Cryst.* **24**, 409–411.
- Lee, W. H., da Silva-Giotto, M. T., Marangoni, S., Toyama, M. H., Polikarpov, I. & Garratt, R. C. (2001). *Biochemistry*, **40**, 28–36.
- McPherson, A. (1982). *Preparation and Analysis of Protein Crystals*. New York: Wiley.
- Magro, A. J., Soares, A. M., Giglio, J. R. & Fontes, M. R. M. (2003). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311**, 713–720.
- Matthews, B. W. (1968). *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497.
- Navaza, J. (1994). *Acta Cryst. A* **50**, 157–163.
- Needleman, P., Turk, J., Jakschik, B. A., Morrison, A. R. & Lefkowitz, J. B. (1986). *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 69–102.
- Nishioka, S. A. & Silveira, P. V. P. (1982). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **47**, 805–810.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). *Methods Enzymol.* **276**, 307–326.
- Ownby, C. L. (1998). *J. Toxicol. Toxin Rev.* **17**, 1003–1009.
- Ownby, C. L. H., Selistre de Araujo, S., White, S. P. & Fletcher, J. E. (1999). *Toxicon*, **37**, 411–445.
- Ribeiro, L. A., Albuquerque, M. J. & Pires de Campos, V. A. F. (1998). *Rev. Assoc. Med. Bras.* **44**, 312–318.
- Rosenberg, P. (1990). *Handbook of Toxicology*, edited by W. Shier & D. Mebs, pp. 67–277. New York: Marcel Dekker.
- Rosenfeld, G. (1971). *Venomous Animals and their Venoms II*, edited by W. Bucherl, E. Buckley & V. Deulofeu, pp. 345–384. New York: Academic Press.
- Rufini, S., Cesaroni, P., Desideri, R. F., Gubensek, F., Gutiérrez, J. M., Luly, P., Maassoud, R., Morero, R. & Pedersen, J. Z. (1992). *Biochemistry*, **31**, 12424–12430.
- Shimohigashi, Y., Tani, A., Matsumoto, H., Nakashima, K. & Yamaguchi, Y. (1995). *J. Biochem.* **118**, 1037–1044.
- Silva-Giotto, M. T. da, Garratt, R. C., Oliva, G., Mascarenhas, Y. P., Giglio, J. R., Cintra, A. C. O., de Azevedo, W. F. Jr, Arni, R. K. & Ward, R. J. (1998). *Proteins*, **30**, 442–454.
- Six, D. A. & Dennis, E. A. (2000). *Biochim. Biophys. Acta*, **1488**, 1–19.
- Soares, A. M., Andrião-Escarso, S. H., Angulo, Y., Lomonte, B., Gutiérrez, J. M., Marangoni, S., Toyama, M. H., Arni, R. K. & Giglio, J. R. (2000). *Arch. Biochem. Biophys.* **373**, 7–15.
- Soares, A. M., Fontes, M. R. M. & Giglio, J. R. (2004). *Curr. Org. Chem.* **8**, 1677–1690.
- Valentin, E. & Lambeau, G. (2000). *Biochimie*, **82**, 815–831.
- Watanabe, L., Soares, A. M., Ward, R. J., Fontes, M. R. M. & Arni, R. K. (2005). *Biochimie*, **87**, 161–167.

APÊNDICE VIII

Resumo teórico das técnicas utilizadas

Resumo teórico das técnicas utilizadas

1. Cristalização de proteínas

Para cristalização de macromoléculas geralmente é utilizado o processo de *salting-out* que consiste na preparação de uma solução com agentes precipitantes (sais, polímeros ou solventes orgânicos) e proteína, e posterior aumento gradativo da concentração destes agentes até que o ponto de supersaturação da proteína seja alcançado (Green, 1932). Deve-se lembrar que em termos termodinâmicos o estado de menor energia para a proteína é o estado cristalino. As moléculas protéicas perdem liberdade rotacional e translacional, diminuindo a entropia do sistema. Ao mesmo tempo ganham novas ligações químicas estáveis, reduzindo a energia potencial do sistema e fornecendo uma força direcional para o estado ordenado (McPherson, 1989; Ducruix & Giegé, 1992).

A formação de um cristal tem início a partir da associação de agregados protéicos (formados por contatos entre as superfícies de moléculas vizinhas impulsionadas por forças de empacotamento) originando um núcleo estável ao qual moléculas vão se adicionando em direção à rede cristalina promovendo o crescimento do cristal. O fim deste crescimento ocorre quando acabam as moléculas protéicas disponíveis na solução ou por variação de qualquer fator que interrompa este crescimento (Kobe *et al.*, 1999; Souza *et al.*, 2000).

Os cristais de macromoléculas biológicas diferem dos cristais de pequenas moléculas em vários aspectos. Um cristal protéico dificilmente excede 1mm^3 em volume. São cristais frágeis devido ao alto conteúdo de solvente (20 a 80%) e às fracas interações entre as moléculas dentro da rede cristalina (interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio) (Souza *et al.*, 2000). Outra característica de cristais de macromoléculas biológicas é a dimensão de sua

cela unitária que comparada com dimensões de celas unitárias de pequenas moléculas é consideravelmente maior (algumas dezenas de milhares de ângstrons) (Usha., *et al*, 1984; Ducruix & Giegé, 1992).

Com o aumento do número de macromoléculas biológicas cristalizadas com sucesso, tornou-se óbvio que muitas das condições de cristalização se assemelhavam, ou seja, havia uma concentração de resultados positivos de cristalização de macromoléculas biológicas usando-se números limitados de precipitantes, tampões e aditivos. Dentro deste raciocínio Jancarick & Kim (1991) propuseram o **método da matriz esparsa**, no qual são variados pelo menos três parâmetros principais que afetam a cristalização: pHs (tampões), aditivos (sais e/ou agentes orgânicos) e polímeros (polietileno glicol – PEG e 2-metil-2,4-pentanediol – MPD).

Um método bastante eficiente para o aumento gradativo da concentração do agente precipitante é o **método de difusão de vapor**. O princípio deste método é o processo de equilíbrio de duas soluções (uma é formada por agente precipitante com alta concentração e a outra pelo mesmo agente + proteína) através da fase de vapor, em meio hermeticamente fechado. A solução menos concentrada perderá seu solvente mais volátil até que o potencial químico de ambas as soluções se igualem. Um cristal tende a se formar à medida que a concentração do precipitante e, conseqüentemente, da proteína aumente gradativamente (McPherson, 1989; Ducruix & Giegé, 1992).

Para o método de difusão de vapor podem ser utilizados os sistemas: *hanging drop* (“gota suspensa”), *sitting drop* (“gota sentada”) e *sandwich drop* (“gota sanduíche”). O sistema *hanging drop* (Figura 01) é mais utilizado e adequado para testes iniciais com um grande número de condições de cristalização, já que utiliza quantidades pequenas de proteína (0,5 – 5,0µL) e facilita a análise dos experimentos. Neste sistema a solução protéica + solução

precipitante ficam na gota suspensa e a solução precipitante (duas vezes mais concentrada) fica no reservatório (Marchi-Salvador, 2005).

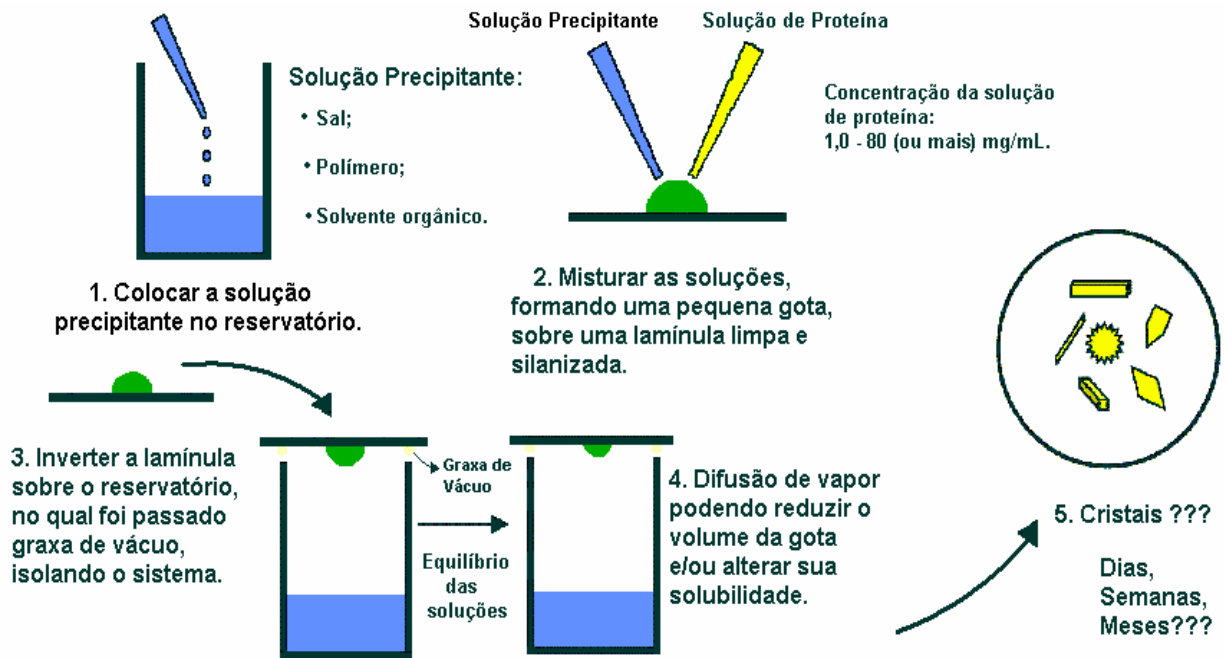


Figura 01: Diagrama da seqüência de eventos para a montagem do método de cristalização por difusão de vapor, *hanging drop*.

A concentração da gota contendo solução de proteína + solução de precipitante será equilibrada contra a solução precipitante do reservatório que geralmente está 50% mais concentrada em relação à gota, pois para o preparo da gota, misturou-se uma alíquota de proteína à mesma quantidade de solução precipitante contida no poço. O equilíbrio prossegue por meio da difusão de vapor de substâncias voláteis (água e/ou solventes orgânicos) até que a pressão de vapor da gota se iguale a do reservatório. Se o equilíbrio ocorrer por meio de troca de vapor da gota para o reservatório, haverá uma diminuição do volume da gota e, conseqüentemente, o aumento na concentração de todos os constituintes da gota. Para substâncias químicas com pressão de vapor maior que a pressão de vapor da água (por exemplo, os álcoois), a troca de vapor ocorrerá do reservatório para gota, aumentando o volume da gota e diminuindo a concentração desta (Watanabe, 1998; Marchi-Salvador, 2005).

Diversos parâmetros afetam a solubilidade e, conseqüentemente, o processo de cristalização. São eles: parâmetros físico-químicos intrínsecos (pH da solução de cristalização, força iônica, volume, concentração, solubilidade, pureza de precipitantes e proteína, entre outros) e extrínsecos (variação de temperatura, efeitos de densidade, pressão, viscosidade, vibração, gravidade, etc.); parâmetros bioquímicos e biofísicos (degradação e/ou desnaturação da amostra protéica, adição e presença de ligantes, íons, agentes redutores, detergentes, etc) e heterogeneidade conformacional ou da seqüência dos aminoácidos da amostra utilizada.

Outras metodologias de cristalização podem ser utilizadas para a obtenção de monocristais e/ou melhoramento de cristais previamente obtidos: o método de *seeding* (“semeadura”), subdividido em *macroseeding* (um pequeno monocristal, ao qual novas moléculas protéicas irão se agregar de forma ordenada, é transferido para uma solução estável de precipitante + proteína), *microseeding* (consiste na utilização de micronúcleos, oriundos da trituração de um cristal, aos quais novas moléculas protéicas irão se adicionar formando novos cristais) e *streakseeding* (semelhante ao *macroseeding*; neste procedimento o cristal é transferido para outra solução com o auxílio de uma haste flexível e liberado nesta nova solução de cristalização que deverá ser 60-80% menos concentrada do que a solução inicial); a utilização de óleos nos reservatórios (o óleo fica sobre a solução precipitante contida no poço diminuindo a velocidade de crescimento dos cristais); a adição de substâncias “aditivas” à gota (quites comerciais); variações da temperatura de crescimento dos cristais (podendo variar de 4 a 35°C); entre outras técnicas.

2. Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Experimentos de espalhamento dinâmico de luz nos fornecem informações sobre o tamanho e monodispersividade de macromoléculas em solução através da determinação do raio hidrodinâmico, do coeficiente de difusão translacional, da porcentagem de polidispersão e da massa molecular estimado da macromolécula. Estas informações são aplicadas na determinação da homogeneidade da amostra protéica utilizada para cristalização. Se ocorrer agregação entre as moléculas, o raio hidrodinâmico aumentará e a cristalização da proteína é dificultada (Bergfors, 1999).

A formação de um monocristal regular requer que o núcleo inicial esteja bem organizado para que as demais moléculas protéicas se adicionem propiciando o crescimento de um cristal altamente organizado. Proteínas com distribuição monomodal (que em solução apresentam somente um tipo conformacional, podendo ser somente monômeros, dímeros, trímeros, etc) têm maior probabilidade (70 a 80%) de cristalizarem. Convencionalmente, proteínas com agregações não específicas são menos favoráveis à cristalização e, se estas cristalizarem, aumenta a probabilidade dos dados estatísticos serem de baixa qualidade (Burley, 1997; Bergfors, 1999).

3. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) é uma técnica comumente utilizada para separar moléculas e determinar a pureza de uma amostra de proteína. Esta técnica é baseada em um processo analítico de separação de misturas, cujo principal agente é o campo elétrico. É também usada na identificação de substâncias, no estudo de homogeneidade de

sistemas biológicos e na determinação de pontos isoeletricos (Scopes, 1994; Souza *et al.*, 2000).

A separação de moléculas envolve a migração de partículas em um determinado gel durante a aplicação de uma diferença de potencial. Na eletroforese em gel de poliacrilamida as proteínas migram através dos poros do gel em resposta a um campo elétrico. O tamanho desses poros diminui para concentrações crescentes de acrilamida. A facilidade com que as proteínas migram através do gel é condicionada pelo tamanho dos poros do gel e pela massa molecular das proteínas. Considerando um determinado tamanho de poro tem-se que, quanto menor for a massa molecular da proteína mais facilmente ela migrará em relação às proteínas de alta massa molecular. A porcentagem de acrilamida do gel deve ser escolhida tendo em consideração a massa molecular da proteína que se quer identificar. Em alguns casos, o formato das moléculas também influi, pois algumas terão maior facilidade para migrar pelo gel.

Para a determinação da pureza e da massa molecular das proteínas usa-se o detergente aniônico, dodecil sulfato de sódio (SDS), o qual rompe quase todas as interações não-covalentes da proteína, ligando-se a maioria das proteínas por interações hidrofóbicas em quantidades grosseiramente proporcionais a massa molecular de cada dois resíduos de aminoácidos. O SDS ligado adiciona uma grande carga negativa à molécula de proteína que supera sua carga intrínseca e faz com que a proteína migre em direção ao eletrodo positivo, quando uma voltagem é aplicada (Laemmli, 1970). Como resultado, uma mistura complexa de proteínas é fracionada em uma série de diferentes bandas protéicas arranjadas de acordo com sua massa molecular.

Quando a amostra protéica é tratada com β -mercaptoetanol ocorre o rompimento das pontes dissulfeto e a conseqüente separação uniforme das subunidades protéicas, as quais

se ligarão a uma mesma quantidade de SDS migrando com a igual velocidade pelo gel de poliacrilamida.

As proteínas são detectadas corando-se o gel com um corante, tal como o azul Coomassie, o qual se une às proteínas, porém não ao gel de poliacrilamida. Quando as posições das bandas da proteína desconhecida são comparadas com as posições de bandas conhecidas estabelecidas pelo padrão de massa molecular aplicado como referência, temos como resultado uma medida satisfatória da massa molecular da proteína desconhecida. Caso a proteína tenha duas ou mais subunidades diferentes, cada subunidade será, em geral, separada pelo tratamento com o SDS e uma banda isolada aparecerá para cada uma delas (Marchi-Salvador, 2005).

4. Coleta de dados de difração de Raios-X

O problema experimental envolvido na determinação de estruturas cristalográficas está relacionado com a obtenção de monocristais e com a medida mais completa e exata possível de um conjunto de dados de difração de raios-X. O método de coleta de dados de difração de raios-X por cristais protéicos utilizado é o de roto-oscilação. Neste método, um determinado cristal é submetido a uma fonte monocromática de raios-X com comprimento de onda entre 0,7 e 1,8 Å por um dado intervalo de tempo. Durante esse tempo, o cristal é girado ao redor de um eixo de rotação perpendicular ao eixo de raios-X por alguns graus (de 0,5 a 2,0°) e a radiação espalhada pelo cristal é medida por um detector de raios-X. O resultado da medida é chamado de padrão de difração (Arndt & Wonacott, 1977; McRee, 1993; Drenth, 1994).

O ângulo pequeno de rotação reduz a ocorrência de reflexões sobrepostas, mas ocasiona o registro parcial das reflexões que ocorrem muito próximas do início ou do fim de uma faixa de rotação. Como as porções restantes destas reflexões parciais são registradas na imagem seguinte e a câmara de roto-oscilação apresenta precisão mecânica alta, é possível adicionar os componentes individuais destas reflexões parciais e obter uma intensidade integrada. Além disso, entre cada rotação, o cristal fica oscilando em torno de um mesmo eixo de rotação, o que minimiza os efeitos de flutuação da intensidade do feixe de raios-X (Cardoso, 2002).

As coletas de dados ocorreram em temperatura criogênica a qual reduz os danos causados pela radiação, tais como o decréscimo nas intensidades das reflexões e a redução do tempo de vida do cristal. Para evitar o problema de formação de gelo durante a coleta alguns cristais são colocados e rapidamente retirados em solução crioprotetora (glicerol ou polietileno glicol 400) que, na medida do possível, deve ser inócua ao cristal.

A montagem dos cristais para coleta de dados atualmente é feita em *loop* de nylon ao qual o cristal fica preso por tensão superficial. O *loop* montado foi acoplado na cabeça goniométrica e alinhado ao feixe de raios-X para que durante o movimento de oscilação do cristal no aparelho este fique exposto de maneira homogênea à radiação.

5. Processamento dos dados de difração

Ao final de uma coleta de dados, inúmeras imagens de difração são obtidas, cada uma referente a uma determinada orientação do cristal. Cada imagem deve ser analisada individualmente de modo que cada reflexão possa ser identificada e o valor de sua intensidade possa ser medido.

O processamento de dados de difração de raios-X envolve a indexação, integração, correção de vários fatores (Lorentz, polarização e danos por radiação) e o escalonamento (Otwinowski & Minor, 1997). Na indexação ocorre a determinação dos três vetores-base de uma rede cristalina a partir de um conjunto observado de vetores de espalhamento de uma única imagem de difração de raios-X. Após a análise detalhada das coordenadas de cada reflexão de cada imagem coletada, é feita a determinação de quais reflexões são completas ou parciais e as intensidades são integradas somando-se todas as reflexões obtidas das imagens que formam o conjunto de dados coletados de um mesmo cristal. Por fim, os dados obtidos (todas as reflexões de todas as imagens) são comparados em uma etapa conhecida como “escalonamento”, na qual as intensidades das reflexões são ajustadas a uma escala comum e os erros associados a cada uma das intensidades podem ser estimados com maior precisão.

Para avaliar a qualidade do processamento de um conjunto de dados de difração de raios-X analisa-se o índice de discordância entre as intensidades de reflexões simetricamente equivalentes (R_{merge} ou R_{sym}) e a razão entre a medida da intensidade da reflexão e o seu desvio padrão ($I/\sigma(I)$ – intensidade/ruído).

O valor de $I/\sigma(I)$ (valor médio, por faixa de resolução, da razão entre as intensidades das reflexões (hkl) e seus respectivos erros) é um parâmetro usado como critério, tanto para rejeitar reflexões, como para definir o limite de resolução para o processamento dos dados.

O R_{merge} , por outro lado, é uma estimativa da qualidade global dos dados e compara as diferenças de intensidade de reflexões simetricamente equivalentes que deveriam ser idênticas em intensidade (McRee, 1993; Drenth, 1994; Otwinowski & Minor, 1997). Em termos práticos, dados com R_{sym} menor do que 5% são considerados excelentes, entre 6 e 12% são bons e acima de 20% são questionáveis (McRee, 1993; Drenth, 1994).

Outros parâmetros importantes para avaliar a qualidade de um conjunto de dados de difração são o número de reflexões totais (número de todas as reflexões medidas e aceitas na faixa de resolução estabelecida para aquele conjunto de dados), o número de reflexões únicas (número de reflexões distintas em um conjunto de dados), a multiplicidade (número de vezes que reflexões simetricamente equivalentes foram medidas), a completeza (porcentagem das reflexões únicas medidas sobre o número de reflexões teoricamente esperadas para a faixa de resolução estabelecida) e a redundância (razão entre o número de reflexões totais e o número de reflexões únicas). Geralmente os dados na maior resolução são coletados com completeza menor devido à dificuldade de discernir o sinal destas reflexões do ruído de fundo (McRee, 1993; Drenth, 1994).

6. Determinação da estrutura protéica

A obtenção da estrutura tridimensional de um cristal de proteína por meio da técnica de difração de raios-X requer, inevitavelmente, a determinação das fases dos fatores de estrutura do cristal, uma vez que no processo de difração de raios-X somente a amplitude ou módulo do fator de estrutura pôde ser obtido. Os valores das fases foram perdidos no processo. A determinação da fase ficou conhecida como o problema das fases.

O método de substituição molecular baseia-se no fato de proteínas com seqüência de aminoácidos semelhantes possuírem enovelamentos similares (McRee, 1993; Drenth, 1994). Eventualmente, o método de substituição molecular pode ser aplicado quando o enovelamento de uma proteína for similar, mesmo com valor de homologia baixo.

Neste método, a molécula de estrutura conhecida é denominada molécula modelo, a qual é posicionada na cela cristalina da estrutura desconhecida através da aplicação de seis

variáveis (três rotacionais e três translacionais) sobre o conjunto conhecido de coordenadas atômicas. Portanto, resolver uma estrutura por substituição molecular resume-se em encontrar funções de rotação e de translação (Giacovazzo, 1992; Cardoso, 2002).

7. Modelagem manual e refinamento da estrutura protéica

O modelo tridimensional inicialmente construído normalmente apresenta erros. Em uma etapa conhecida como refinamento, o modelo é ajustado, ou seja, tanto as coordenadas atômicas quanto os fatores de temperatura e a ocupância de cada um dos átomos são refinados em torno das posições iniciais procurando a obtenção de um modelo 3D ideal.

O objetivo do processo de refinamento é minimizar simultaneamente os dados observados e a informação química já conhecida para proteínas (Cardoso, 2002).

O refinamento da estrutura cristalográfica de uma macromolécula pode ser formulado como um problema de otimização não-linear com restrições químicas tais como tamanho, ângulos de ligações e topologia da macromolécula. Como a razão entre os dados observados e os parâmetros a serem ajustados (coordenadas atômicas x , y , z e fatores B de temperatura para cada átomo) é geralmente menor que um, as equações empregadas nestes cálculos não podem ser resolvidas exatamente. Desta maneira, é valioso utilizar restrições estereoquímicas (distância entre ligações atômicas, ângulos das ligações, ângulos diédricos, interações de van der Waals, etc) durante o refinamento de estruturas protéicas reduzindo o número de variáveis a serem otimizadas (Giacovazzo, 1992; Zanotti, 1992).

Inicialmente, o mapa de densidade eletrônica obtido experimentalmente deve ser interpretado e, na medida do possível, um modelo tridimensional deve ser construído de forma a explicar a densidade eletrônica observada dentro do cristal. Entretanto, é muito

comum que os mapas de densidade eletrônica experimentais apresentem falhas e não possam ser interpretados visualmente nem por algoritmos computacionais. Muitas falhas estão associadas diretamente aos erros experimentais. Sabe-se que toda medida experimental apresenta um erro e quando ela é usada para o cálculo de outras grandezas, o erro se propaga no cálculo influenciando o resultado final. Assim, a qualidade do conjunto de dados de difração e de todas as grandezas obtidas a partir desse conjunto deve ser avaliada ao longo das etapas que envolvem a determinação estrutural de uma macromolécula biológica para que o objetivo possa ser cumprido com êxito e o resultado seja confiável.

O progresso do refinamento é avaliado por meio dos valores: R_{cris} e R_{free} . O R_{cris} quantifica a concordância entre os fatores de estrutura observados e os calculados. Entretanto, não é conveniente usar um valor baixo do R_{cris} como indicativo único de uma estrutura correta, embora um valor alto indique uma estrutura modelada incorretamente (Kleywegt, 2000). O valor do R_{cris} é dependente da redundância, completeza, limites de resolução e exatidão dos dados observados. Além disso, o valor R_{cris} pode ser reduzido em decorrência da modelagem errônea dos dados observados, do tendenciamento no cálculo das fases e da produção de modelos super-refinados. Assim, torna-se indispensável utilizar um outro índice da qualidade do modelo, o R_{free} (Brünger, 1992). Para o cálculo do R_{free} , de 5 a 10% das reflexões são retiradas aleatoriamente do conjunto de dados, não sendo usadas durante o refinamento. Desta maneira, caso a estrutura esteja sendo refinada erroneamente, o valor do R_{free} aumentará embora o R_{cris} possa apresentar um valor aceitável (Watanabe, 2003; Marchi-Salvador, 2005).