

Universidade Estadual Paulista – Júlio de Mesquita Filho

Instituto de Biociências de Botucatu

**Estudos estruturais com fosfolipases A₂
isoladas de venenos de serpentes dos
gêneros *Bothrops* e *Crotalus***

Carlos Alexandre Henrique Fernandes

Orientador: Prof. Titular Marcos Roberto de Mattos Fontes

Co-orientador: Dra. Débora Colombi

Tese apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu como requerimento para obtenção do título de doutorado em Ciências Biológicas Área de Concentração: Genética

Botucatu

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/6651

Fernandes, Carlos.

Estudos estruturais com fosfolipases A2 isoladas de venenos de serpentes dos gêneros Bothrops e Crotalus / Carlos Fernandes. - Botucatu, 2013

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Marcos Roberto de Mattos Fontes

Coorientador: Debora Colombi

Capes: 20901003

1. Serpente peçonhenta - Genética. 2. Cobra - Veneno. 3. Biologia molecular. 4. Fosfolipases.

Palavras-chave: Biologia molecular estrutural; Bothrops; Crotalus; Fosfolipases A2; Venenos de serpentes.

**Aos meus pais, Manuel e Maria Lucia,
pela enorme carinho e aprendizado que
me proporcionaram.**

**Ao meu filho Heitor, pelo seu sorriso que
me põe de pé todos os dias.**

Agradecimentos

Ao meu orientador, Marcos Fontes. E aqui dispenso o uso de sua titulação, porque meus agradecimentos vão além da orientação e dos conhecimentos transmitidos. Esses anos de trabalho em conjunto me fizeram crescer uma admiração e respeito pela sua pessoa inigualáveis.

À Dra. Débora Colombi, pelos valiosos conhecimentos acerca da expressão heteróloga de proteínas recombinantes e do uso da técnica de mutação sítio dirigida.

À Fundação de Auxílio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) que financiou o presente projeto de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Andreimar Martins Soares (Instituto Osvaldo Cruz – Rondônia), ao Dr. Salomon Huancahuire-Veja (Instituto de Biologia – UNICAMP) e à Dra. Consuelo L. Fortes-Dias (Fundação Ezequiel Diaz) por fornecer as amostras estudadas.

Ao LNLS (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron) pelo apoio de suas instalações técnicas para coleta de dados de difração de raios X.

Ao Prof. Dr. Cristiano Luis Pinto de Oliveira (IF-USP) pelo apoio técnico para a coleta de dados de espalhamento de raio X no equipamento NANOSTAR, em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Amando S. Ito (FFCLRP-USP) pelo apoio técnico para a coleta de dados de espectroscopia de fluorescência em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Roberto Morato Fernandez (Depto de Física e Biofísica – IBB-UNESP) pelo apoio e colaboração nos experimentos de espalhamento de raios X a baixo ângulo e espectroscopia de fluorescência.

Ao Prof. Dr. Mario de Oliveira Neto (Depto de Física e Biofísica – IBB-UNESP) pela revisão do trabalho e pelos preciosos conhecimentos acerca da técnica de espalhamento de raios X a baixo ângulo.

Ao Edson Comparetti, cujo trabalho de iniciação científica pude co-orientar e junto a ele, gerar excelentes resultados.

Aos meus colegas de laboratório Agnes, Andrea, Ângelo, Guilherme, Fábio, Frey, Lino, Natália, Rafael e Walter pelo companheirismo nesses anos. A ajuda no dia a dia do laboratório, as nossas discussões científicas e a companhia de todos vocês foram essenciais para a realização desse trabalho.

Ao pessoal do LBBC, Guilherme (às nossas memoráveis discussões de futebol), ao Luís Gustavo (às pescarias e às valorosas ajudas computacionais), ao Marcio (à nossa amizade e aos nossos devaneios científicos) e à Letícia (pelas ajudas, pela companhia e amizade e pelas risadas da hora do almoço).

À Beatriz Troncone, a melhor irmã que alguém poderia ter.

E é claro, à ela, Amanda Marcolino, por fazer continuamente meu mundo parar e nascer de novo. E cada vez mais bonito.

**“O começo de todas as ciências é o
espanto das coisas serem o que são.”**

Aristóteles

Estudos estruturais com fosfolipases A₂ isoladas de veneno de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*

Ainda nos dias de hoje, o envenenamento ofídico é um problema de saúde pública, afetando sobretudo, regiões de clima tropical, subtropical e áreas rurais de países da África, Ásia, Oceania e América Latina. No Brasil, os gêneros de serpentes *Bothrops* e *Crotalus* são responsáveis por quase 90% dos acidentes ofídicos, sendo que os acidentes provocados por este último apresentam relativa alta taxa de mortalidade. O veneno das serpentes do gênero *Bothrops* possuem uma classe de fosfolipases A₂, as Lys49-PLA₂s, que não possuem atividade catalítica, mas são capazes de induzir a mionecrose por uma mecanismo não catalítico que não é totalmente conhecido. Com relação às fosfolipases A₂ veneno das serpentes do gênero *Crotalus*, o complexo crotoxina, formado pela crotoxina A (não catalítica) e a crotoxina B (catalítica) pode constituir até cerca de 60% do veneno desses animais, como no caso da subespécie *Crotalus durissus terrificus*, e é uma potente neurotoxina que provoca um grande bloqueio da transmissão neuromuscular. Neste trabalho, utilizando diversas técnicas teóricas e experimentais, sobretudo cristalografia de raios X, são apresentados diversos resultados que visam aprofundar o conhecimento acerca do funcionamento destas proteínas. Com relação à crotoxina, é apresentada a estrutura cristalográfica da crotoxina B de *Crotalus durissus colillineatus*, a expressão heteróloga da isoforma CBa₂ da crotoxina B de *Crotalus durissus terrificus* para a posterior produção de formas mutantes sítio-dirigidas e resultados da análise do espalhamento de raios X a baixo ângulo da crotoxina e de suas subunidades isoladas, gerando informações relevantes e inéditas acerca da oligomerização destas proteínas. No caso das Lys49-PLA₂s isoladas do veneno botrópico, são apresentadas duas novas estruturas cristalográficas dessa classe de proteínas isolada da serpente amazônica *B. brazili*. A análise destas duas estruturas e a comparação estrutural delas com outras Lys49-PLA₂s gerou novas informações acerca da posição de aminoácidos hidrofóbicos na porção C-terminal, levando-se a proposição de um novo mecanismo de ação para estas proteínas. Também são apresentadas a análise funcional e a estrutura cristalográfica da PrTX-I isolada do veneno de *B. pirajai* complexada com dois inibidores diferentes que revelam novos modos de inibição da atividade miotóxica destas proteínas. São apresentados também diversos resultados provenientes de diferentes técnicas biofísicas que mostram que a MjTX-I, isolada do veneno de *B. moojeni*, é uma Lys49-PLA₂ bastante peculiar, que pode formar diversas conformações oligoméricas. Por fim, são apresentados resultados teóricos e experimentais acerca da estrutura oligomérica de dois inibidores de origem proteica de fosfolipases A₂ isolados do plasma sanguíneo de serpentes (α BaltMIP e CNF) cuja análise forneceu inéditas informações acerca da estrutura quaternária destas proteínas e de como ocorre a sua conjugação com as fosfolipases A₂.

Palavras-chave: Venenos de serpentes; fosfolipases A₂, *Bothrops*, *Crotalus*, biologia molecular estrutural.

Structural studies with phospholipases A₂ isolated from *Bothrops* and *Crotalus* genus snake venoms

Snakebite is a very serious public health problem still today, affecting tropical and subtropical countries, especially the rural areas of Africa, Asia, Oceania and Latin America. In Brazil, *Bothrops* and *Crotalus* snake genus are responsible of almost 90% of snakebites. The venoms of *Bothrops* snakes have a class of phospholipases A₂, known as Lys49-PLA₂s, which do not have catalytic activity. However, they are able to induce myonecrosis by a non-catalytic mechanism that is not fully understood. In the venom of *Crotalus* snakes, a phospholipase A₂, known as crotoxin constitutes about 60% of the venom from these animals. This protein is a potent neurotoxin that causes a large block of neuromuscular transmission formed by complexation of crotoxin A (non-catalytic) and crotoxin B (catalytic). In this work, it was used several theoretical and experimental techniques, in particular X-ray protein crystallography, to generate information to extend the knowledge of the action of these proteins. Regarding to crotoxin, the crystal structure of crotoxin B isolated from *Crotalus durissus colillinetatus* was solved and the heterologous expression of isoform CBa₂ of crotoxin B from *Crotalus durissus terrificus* was performed, in order to, subsequently, produce site-directed mutants. Furthermore, it is presented small angle X-ray scattering experiments with the crotoxin and its isolated subunits that provided intriguing and novel information about the oligomerization of these proteins. Regarding to Lys49-PLA₂s from *Bothrops* snakes, it is presented two new crystal structures of this class isolated from Amazonian snake *B. brazili*. The analysis of these structures and the structural comparison to other Lys49-PLA₂s crystallographic structures generated new information about the position of hydrophobic residues in C-terminal portion of these proteins. This information led us to a new proposition of the mechanism of action of these proteins. It is also presented the functional analysis and the crystal structure of PrTX-I, isolated from *B. pirajai*, complexed with two different inhibitors. These structures showed new ways of inhibition of the myotoxicity induced by these proteins. Furthermore, it is also showed, using several different biophysical techniques, that MjTX-I, isolated from *B. moojeni*, is a unique Lys49-PLA₂ that can form several different oligomeric conformations. Finally, it is presented theoretical and experimental results about the oligomeric conformation of two inhibitors of phospholipases A₂ isolated from the blood plasma of snakes (α BaltMIP and CNF). The analyses of these results in novel information about quaternary structure of these proteins as well as about their complex with phospholipases A₂.

Keywords: Snake venom, phospholipases A₂, *Bothrops*, *Crotalus*, Structural Molecular Biology.

Sumário

1. Capítulo 1: Introdução geral ao ofidismo	16
<i>1.1 Fosfolipases A₂ (PLA₂s): componentes protéicos de elevado interesse científico encontrados em venenos botrópicos e crotálicos</i>	20
2. Capítulo 2: Técnicas utilizadas	26
<i>2.1 Cristalografia de proteínas</i>	27
2.1.1 <i>Cristalização</i>	28
2.1.2 <i>Coleta de dados de difração de raios X</i>	33
2.1.3 <i>Substituição molecular, modelagem e refinamento da estrutura tridimensional</i>	36
<i>2.2 Espalhamento de Luz Dinâmico</i>	38
<i>2.3 Espalhamento de raios X a baixo ângulo</i>	39
<i>2.4 Espectroscopia de dicroísmo circular</i>	42
<i>2.5 Espectroscopia de fluorescência</i>	43
<i>2.6 Estudos filogenéticos</i>	45
<i>2.7 Modelagem computacional teórica e simulações de dinâmica molecular</i>	46
3. Capítulo 3: Material e Métodos	48
<i>3.1 Obtenção das amostras</i>	49
<i>3.2 Expressão heteróloga da crotoxina B de <i>Crotalus durissus terrificus</i></i>	49
<i>3.3 Ensaio de cristalização, coleta e processamento de dados</i>	51
<i>3.3 Espalhamento de luz dinâmico</i>	53
<i>3.4 Cromatografia analítica de exclusão molecular</i>	53
<i>3.5 Espalhamento de raios X a baixo ângulo</i>	54
<i>3.6 Medidas de espectroscopia de dicroísmo circular</i>	55
<i>3.7 Medidas de espectroscopia de fluorescência</i>	56
<i>3.8 Estudos filogenéticos</i>	57
<i>3.9 Modelagem teórica computacional e simulações de dinâmica molecular</i>	57
<i>3.10 Estudos funcionais</i>	58
4. Capítulo 4: Crotoxina: potente neurotoxina isolada do veneno de <i>Crotalus durissus</i>	61
4.1 Resultados e discussão	67
4.1.1 <i>Cristalização da crotoxina B de <i>Crotalus durissus collilineatus</i> nativa e complexada com inibidores vegetais</i>	67
4.1.2 <i>Expressão heteróloga e experimentos de mutação sítio dirigida com a crotoxina B de <i>Crotalus durissus terrificus</i></i>	70
4.1.3 <i>Experimentos de raios X à baixo ângulo e espectroscopia de fluorescência</i>	73
5. Capítulo 5: Lys49-PLA₂s – Miotoxinas desprovidas de atividade catalítica	85
5.1 Resultados e discussão	95

5.1.1 Estruturas cristalográficas da BbTX-II e MTX-II, duas Lys49-PLA ₂ s isoladas do veneno de <i>Bothrops brazili</i> – Proposta de um novo mecanismo de ação das Lys49-PLA ₂ s botrópicas. ____	95
5.1.2 Estruturas cristalográficas da PrTX-I complexada com inibidores vegetais (ácido caféico e ácido aristolóquico) – Explorando novos modos de inibição das Lys49-PLA ₂ s botrópicas. ____	108
5.1.3 Estudos estruturais com a Moojenitoxina-I (MjTX-I) isolada do veneno de <i>Bothrops moojeni</i> – uma Lys49-PLA ₂ que pode adotar diferentes conformações oligoméricas. _____	115
6. Capítulo 6: Inibidores plasmáticos de PLA₂s _____	128
6.1 Resultados e Discussão	130
6.1.1 α BaltMIP, um inibidor de fosfolipase A ₂ isolado do plasma sanguíneo de <i>Bothrops alternatus</i> _____	130
6.1.2 <i>Crotalus neutralization factor (CNF)</i> , um γ -PLI isolado do plasma sanguíneo de <i>Crotalus durissus terrificus</i> _____	133
7. Capítulo 7: Conclusões finais _____	147
8. Referências bibliográficas _____	151
9. Anexos _____	164

Lista de Figuras

- Figura 1:** Esquema comparativo dos dois modelos de mecanismo catalítico das fosfolipases A₂. O *single-water mechanism* tem apenas um intermediário, chamado de E*T1 e o *assisting-water mechanism* possui dois, chamados de E*T1 e E*T2. Adaptado de Bahnson (2005). 23
- Figura 2:** Representação esquemática do enovelamento de uma sPLA2 do grupo IIA, gerada a partir do monômero da BthA-I-PLA₂s de *Bothrops jararacussu* (PDB ID 1U73). 25
- Figura 3:** Etapas para resolução de uma estrutura protéica por cristalografia de proteínas de maneira 27
- Figura 4:** Representação esquemática de um diagrama de fase bidimensional da solubilidade de uma proteína (Kobe et al., 1999). 29
- Figura 5:** Diagrama das etapas de montagem do método de cristalização por difusão de vapor, sistema *hanging drop*. 31
- Figura 6:** Representação gráfica de um cristal. O centro da cela unitária é indicado por um ponto (•) e cada molécula de proteína está representada por meias-luas (◐) (Souza *et al.*, 2000). 32
- Figura 7:** Difração de raios-X por um cristal. 34
- Figura 8:** Conjunto de planos (234) e a respectiva intersecção com a cela unitária. Este conjunto corta a face a em duas partes (h=2), b em 3 partes (k=3) e c em 4 partes (l=4). 34
- Figura 9:** a. Aparato que sustenta o loop, b. Figura esquemática do modo em como o monocristal é preso ao loop, onde em (1) o cristal na gota, (2) como cristal é colocado no aparato com o loop e em (3) o cristal preso ao loop, c. detalhe do cristal preso ao loop. 35
- Figura 10:** Imagem de difração de raios X. (Miotoxina – I [MjTX-I] do veneno de *B. moojeni*). 35
- Figura 11:** Intensidade de espalhamento (I_q) e função de distribuição de distâncias ($p(r)$) de objetos de diferentes formas geométricas. Figura adaptada a partir de Svergun & Koch (2003) e gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Mario de Oliveira Neto. 41
- Figura 12:** (a) Luzes circularmente polarizadas à esquerda e à direita que incidem sobre a amostra em um experimento de dicroísmo circular (CD); (b) Transformação da luz circularmente polarizada para uma elipticamente polarizada por conta da absorção diferencial das luzes circularmente polarizadas à esquerda e à direita pela amostra. A elipse é caracterizada por uma diferença do tamanho de seus eixos, cuja razão do menor para o maior fornece a $\tan\theta$, sendo θ a elipicidade. Figura adaptada de Hofmann, 2010. 42
- Figura 13:** Representação em cartoon da estrutura da crotalina de *Crotalus durissus terrificus* formada pelas subunidades CA2-CBb. A subunidade CBb é mostrada em azul e a cadeias α , β e γ da subunidade CA2 é mostrada em laranja, verde e vermelho, respectivamente. Adaptada de Faure et al. (2011). 65

- Figura 14:** Mapa dos resíduos que estabelecem contatos entre as subunidades CA2 e CBb observada na estrutura cristalográfica da crotoxina de *Crotalus durissus terrificus*. Adaptado de Faure et al. (2011). 65
- Figura 15:** Representação em cartoon da estrutura cristalográfica de CB de *Crotalus durissus terrificus*, sendo a isoforma CBa2 representado em azul e a isoforma CBc em vermelho. Adaptado de Marchi-Salvador et al. (2008). 66
- Figura 16:** Pontes salinas formadas entre a Ser1 (exclusiva da isoforma CBa2) e a Glu92 (exclusivo das isoformas da classe II) que são responsáveis pela estabilização do dímero CBa2-CBc. Adaptado de Marchi-Salvador et al. (2008). 67
- Figura 17:** Cristais da crotoxina B de *Crotalus durissus collilineatus*. 68
- Figura 18:** Representação em cartoon da estrutura final da crotoxina B de *Crotalus durissus collilineatus*. 69
- Figura 19:** Expressão heteróloga em pequena escala da crotoxina B de *Crotalus durissus terrificus* verificada por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15%. *MM*: Marcador Molecular; A, B, C: Três diferentes colônias de bactérias previamente selecionadas; *NI*: Colônia que não induzida a expressar a proteína de interesse; *I*: Colônia induzida a expressar a proteína de interesse pela adição de IPTG 100 mM 71
- Figura 20:** Expressão heteróloga em larga escala da crotoxina B de *Crotalus durissus terrificus*. (A). Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15%. (B) Western blotting. *MM*: Marcador Molecular; *NI*: Colônia que não induzida a expressar a proteína de interesse; *I*: Colônia induzida a expressar a proteína de interesse pela adição de IPTG 100 mM; *Ins*: Porção insolúvel após a lise da membrana células das bactérias; *Sol*: Porção solúvel após a lise da membrana células das bactérias. 71
- Figura 21:** Purificação por cromatografia de afinidade da isoforma 1 da crotoxina B de *Crotalus durissus terrificus*. (A) Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15%; (B): *Western blotting*. *MM*: Marcador molecular; 40, 48, 56, 64, 68, 74: Frações eluídas partir do gradiente linear de imidazol, *C+*: Controle positivo para o *western blotting* 72
- Figura 22:** (A) Curvas de espalhamento de raios X à baixo ângulo das amostras de crotoxina (em verde), crotoxina A (CA; em preto) e crotoxina B (CB; em vermelho). (B) Função de distribuição de distâncias, $p(r)$, das amostras de crotoxina (em verde), crotoxina A (CA; em preto) e crotoxina B (CB; em vermelho). 73
- Figura 23:** Sobreposição das curvas obtidas a partir dos dados de SAXS (experimental data) sobre as curvas teóricas de SAXS das estruturas cristalográficas (Crysol fitting) utilizando o software Crysol. Abaixo da curva, a comparação dos envelopes protéicos calculados a partir da curva de SAXS (em rosa) e a partir da estrutura cristalográfica (em verde). 74
- Figura 24:** Intensidade de fluorescência emitida pelos resíduos de triptofano da crotoxina (verde), bem como de suas subunidades isoladas CA (preto) e CB (vermelho). 75
- Figura 25:** Representação em *cartoon* da estrutura cristalográfica da crotoxina (PDB ID 3R0L), onde a CA está representada em azul ciano e a CB em verde. Os resíduos de triptofano estão representados em *sticks*. 76

- Figura 26:** Representação em *cartoon* da estrutura cristalográfica tetramérica da CB de *Crotalus durissus terrificus* (PDB ID 2QOG). Os resíduos de triptofano estão representados em *sticks*. 77
- Figura 27:** Diagrama das interações hidrofóbicas estabelecidas (representadas pelas pestanas vermelhas) pelo W31 na estrutura cristalográfica da crotoxina (PDB ID 3R0L) e nos monômeros A e D das estrutura cristalográfica de CB (PDB ID 2QOG). As ligações de hidrogênio do W31 com moléculas de água também estão representadas (linhas tracejadas em azul, distância em Å). Figura gerada pelo programa Dimplot (Wallace *et al.*, 1996). 80
- Figura 28:** Anisotropia de fluorescência dos resíduos de triptofano da crotoxina (verde), CB (vermelho) e CA (preto). 81
- Figura 29:** Representação em *cartoon* da estrutura cristalográfica da (A) CB de *Crotalus durissus colillineatus*; (B) dímero A/C da estrutura cristalográfica da CB de *Crotalus durissus terrificus* (PDB ID 2QOG); (C) dímero B/D da estrutura cristalográfica da CB de *Crotalus durissus terrificus* (PDB ID 2QOG). Os resíduos de triptofano estão representados em *sticks*. 82
- Figura 30:** Intensidade de fluorescência emitida pelos resíduos de triptofano (A) e anisotropia de fluorescência (B) da crotoxina B de *Crotalus durissus terrificus* (vermelho) e de *Crotalus durissus colillineatus* (preto). 84
- Figura 31:** a. Região do loop ligação do íon Ca^{2+} de uma PLA_2 cataliticamente ativa de *N. naja naja* (Asp49- PLA_2). b. Região análoga à região de ligação do Ca^{2+} de uma miotoxina II (Lys49- PLA_2) cataliticamente inativa de *Bothrops asper*. Figura adaptada de Arni & Ward (1996). 87
- Figura 32:** (A) Interação entre o $O\gamma$ da Tyr28 e o grupo amino da Gly35 que estabiliza o loop de ligação de Ca^{2+} das estruturas das Asp49- PLA_2 s. (B) Sobreposição dos Ca das Asp49- PLA_2 s (em verde) e das Lys49- PLA_2 s (vermelho) com destaque em *sticks* dos resíduos Tyr28 e Asn28. Figura adaptada de Fernandes *et al.* (2010). 89
- Figura 33:** Duas conformações oligoméricas possíveis para as Lys49- PLA_2 s: o dímero alternativo (em verde) e o dímero convencional (azul). Suramina (amarelo) e α -tocoferol (laranja) estão mostrados interagindo com o dímero alternativo. 92
- Figura 34:** Cristais de (A) Brazilitoxina-II. (BbTX-II) e (B) MTX-II, Lys49- PLA_2 s isoladas do veneno de *Bothrops brazili*. 95
- Figura 35:** Representação em *cartoon* da estrutura cristalográfica das proteínas (A) Brazilitoxina-II (BbTX-II) e (B) MTX-II isoladas do veneno de *Bothrops brazili*. As moléculas de PEG e sulfato presentes na estrutura da MTX-II estão mostrados em *sticks*. 97
- Figura 36:** Modelo para caracterização estrutural das mudanças oligoméricas sofridas pelas Lys49- PLA_2 s complexadas usando dois ângulos: θ_A (ângulo de abertura) indica o valor de abertura entre os monômeros definido pelo vetores A1 (laranja) e B1 (azul); θ_T (ângulo de torção) indica o ângulo de torção entre os planos α (bege) e β (azul) ocupado pelas α -hélices h2 e h3 dos monômeros A e B, respectivamente. Figura adaptada de dos Santos *et al.* (2009). 99

Figura 37: Interação dos resíduos Lys20, Lys115 e Arg118 com íons sulfatos nas estruturas de Lys49-PLA₂s complexadas (A) MTX-II; que apresenta uma molécula de PEG no canal hidrofóbico; (B) Bn-IV (de *B. neuwiedi*) complexada com ácido mirístico (PDB ID 3MLM); (C) PrTX-I (de *B. pirajai*) complexada com α -tocoferol (PDB ID 3CYL)..... 100

Figura 38: Comparação estrutural entre as regiões do sítio de *docking* na membrana (MDos) (A) e do sítio de desestabilização da membrana (MDiS) entre as estruturas cristalográficas da MTX-II complexada com PEG 4000 (Lys49-PLA₂ em sua forma ativa; em amarelo) e da BbTX-II (Lys49-PLA₂ em sua forma inativa; em azul). Os números 1 e 2 subscritos referem-se aos monômeros A e B, respectivamente. 101

Figura 39: Alinhamento da região C-terminal das sequências de Lys49-PLA₂s depositadas no NCBI Protein Data Bank, com destaque para as Lys49-PLA₂s isoladas de venenos botrópicos. 102

Figura 40: Localização do sítios MDoS (Sítio de *Docking* na Membrana) e MDiS (Sítio Hidrofóbico de Desestabilização da Membrana), nas estruturas cristalográficas de (A) BbTX-II complexada com PEG 4000; (B) Bn-IV complexada com ácido mirístico (PDB ID 3MLM); (C) PrTX-I complexada com α -tocoferol (PDB ID 3CYL); (D) Ecarpholin S, uma Ser49-PLA₂ de *Echis carinatus* complexada com ácido láurico (PDB ID 2QHD) 104

Figura 41: Proposta de mecanismo miotóxico das Lys49-PLA₂s isoladas do veneno de serpentes do gênero *Bothrops*. A Lys49-PLA₂ em seu estado apo é ativado pela entrada de uma molécula hidrofóbica (um ácido graxo, por exemplo) em seu canal hidrofóbico, levando a reorientação de um dos monômeros, como medido anteriormente pelo modelo de graus de abertura e torção entre os monômeros (dos Santos *et al.*, 2009). Essa reorientação alinha a porção C-terminal e a região MDoS (sítio de *docking* na membrana) lado a lado. Além disso, coloca em um mesmo plano de maneira simétrica a região de desestabilização da membrana (MDiS) e provoca uma maior exposição ao solvente dos sítios MDoS e MDiS. A região MDoS estabiliza a proteína sobre a membrana através da interação dos resíduos carregados positivamente (Lys20, Lys115 e Arg118) com a cabeça aniônica de fosfolípidios de membrana. Por fim, a região MDiS provoca a desestabilização da membrana através da penetração dos resíduos hidrofóbicos que a compõem (Leu121 e Phe125)..... 107

Figura 42: Cristais de Piratoxina I (PrTX-I) co-cristalizada com inibidores vegetais. a. PrTX-I-Ácido Caféico; b. PrTX-I-Ácido Aristolóquico..... 109

Figura 43: Representação em *cartoon* da estrutura cristalográfica de (A) PrTX-I co-cristalizada com ácido aristolóquico e (B) PrTX-I co-cristalizada com ácido caféico. As moléculas de PEG (azul), sulfato e ácido caféico e ácido aristolóquico (amarelo) estão representados em *sticks*; 111

Figura 44: Representação da área de superfície da estrutura do complexo PrTX-I-Ácido Caféico, mostrando a densidade eletrônica gerada por omitting-map das moléculas de ácido caféico e as suas interações com os resíduos da estrutura PrTX-I-Ácido Caféico. Distância em Å. 112

Figura 45: Efeito do ácido caféico sobre o dano muscular causado pela PrTX-I no diafragma de camundongos, com as respectivas fotos das lâminas de microscopia ótica de cada grupo experimental. EN: Endomísio; ED: Edema, FA: Fibras arredondadas; PM: Perda de miofilamentos (n=3). 113

Figura 46: Representação em da área de superfície da estrutura do complexo PrTX-I-Ácido Aristolóquico, mostrando a densidade eletrônica gerada por omitting-map da molécula de ácido aristolóquico caféico e as suas interações com os resíduos da estrutura PrTX-I-Ácido Aristolóquico. Distância em Å. 114

Figura 47: Efeito do ácido aristolóquico sobre o dano muscular causado pela PrTX-I no diafragma de camundongos, com as respectivas fotos das lâminas de microscopia ótica de cada grupo experimental. EN: Endomísio; ED: Edema, FA: Fibras arredondadas; PM: Perda de miofilamentos (n=3). 115

Figura 48: (A) Representação em *cartoon* da estrutura cristalográfica da Moojenitoxina-I (MjTX-I). (B) Sobreposição dos átomos Ca dos quatro monômeros que constituem a estrutura da MjTX-I, com destaque para as regiões que apresentam maior r.m.s.d. (C) Sobreposição dos átomos Ca dos monômeros A da estrutura cristalográfica da MjTX-I, da BnSP-7 (PDB ID 1PA0), Myo-II (PDB ID 1CLP), do monômero B da estrutura cristalográfica da BthTX-I (PDB ID 3HZD) e das estruturas cristalográficas da godMT-II (PDB ID 1GOD) e Acl-K49 (PDB ID 1S8H). 117

Figura 49: Experimentos de espalhamento de raios X à baixo ângulo (SAXS) da MjTX-I. (A) Curvas teóricas (linhas contínuas) para os estados monomérico e dimérico (calculado pelo software Crysol a partir da estrutura cristalográfica) da MjTX-I e a curva obtida por SAXS (círculos) com a amostra dissolvida em água e em 20 mM Tris HCl. (B) Função da distribuição de distâncias, $p(r)$, após o uso da transformada inversa de Fourier. (C) Sobreposição do dímero convencional (em *cartoon*) com o envelope *ab initio* calculado a partir da curva de SAXS (superfície cinza). (D) Sobreposição do dímero alternativo (em *cartoon*) com o envelope *ab initio* calculado a partir da curva de SAXS. 121

Figura 50: (A) Cromatografia de exclusão analítica da MjTX-I em 20 mM Tris HCl pH 8,0. O gel de eletrorese 13% SDS-PAGE mostra frações da MjTX-I eluídas em diferentes posições do pico obtido. Linha I: marcador molecular da Bio-Rad Laboratories, Inc; Linha II: MjTX-I coletada nos volumes de eluição correspondentes aos pontos 1 e 2 do cromatograma; Linha III: MjTX-I coletada no volume de eluição correspondente ao ponto 3 do cromatograma. (B) Curva de calibração utilizando proteínas padrão de massa molecular conhecida mostra as diferentes conformações oligoméricas da MjTX-I em 20 mM Tris HCl pH 8,0. As proteínas padrão de massa molecular conhecida foram obtidas a partir do quite de calibração para gel filtração de proteínas de baixa massa molecular da empresa Sigma-AldrichTM que contém os seguintes componentes: blue dextran (2000 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), citocromo C (12.4 kDa), e aprotinina (6.5 kDa). 123

Figura 51: Alinhamento de sequências de aminoácidos de Lys49-PLA2s do gênero Bothrops. Os números destacados acima do alinhamento se referem a posições que possuem aminoácidos conservados em outras Lys49-PLA2s, mas que não se conservam na sequência da MjTX-I. 125

Figura 52: Efeito da MjTX-I sobre a contração muscular evocada indiretamente sobre a junção neuromuscular nervo frênico-diafragma de camundongos. O bloqueio neuromuscular foi produzido após a administração de 1 μ M (círculos) e 5 μ M (triângulos) em relação ao controle (quadrados). A ordenada representa a % da amplitude da contração em relação à amplitude da contração inicial. A abcissa representa o tempo após a aplicação da MjTX-I/tampão na preparação. As barras verticais representam o desvio em relação à média dos

experimentos realizados e o asterisco indica diferença significativa em relação ao controle (p<0,05) (n=3). 126

Figura 53: Árvore filogenética baiesiana de todas as Lys49-PLA₂s isoladas do veneno de serpentes do gênero *Bothrops* depositadas no NCBI protein database visualizada de maneira tradicional (A) e computando os comprimentos dos ramos (em azul) (B). Os valores de probabilidade posterior após 10⁶ ciclos estão indicados nos nós dos ramos. Nós com valores de probabilidade posterior menor que 0,75 foram colapsados. E-value mínimo das sequências foi de 3.10⁻⁴⁷. 127

Figura 54: Representação em cartoon do modelo teórico da α BaltMIP obtido após 10 ns de dinâmica molecular. Os resíduos 11-37 e 49-143 correspondem, respectivamente às regiões de α -helical neck e domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD domain). O resíduo Asn103 está representando em *sticks* corresponde ao sítio de glicosilação e é conservado em todas as α -PLIs. 131

Figura 55: Alinhamento das sequências de aminoácidos do α -BaltMIP, dos demais α -PLIs disponíveis no NCBI protein data bank e das SP-D humana e de camundongo. 132

Figura 56: Conformação trimérica teórica do α -BaltMIP gerado após um refinamento de simulated annealing do modelo obtido após 10 ns de simulação de dinâmica molecular. Este arranjo trimérico obteve um diâmetro de aproximadamente de 7,5 nm, bastante próximo do raio hidrodinâmico (3,6 nm) obtido por espalhamento de luz dinâmico. 133

Figura 57: Espectros de dicroísmo circular do *Crotalus neutralization factor* (CNF) isolado do plasma de *Crotalus durissus terrificus* e o do complexo formado pelo CNF com a crotoxina isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (CNF+CB). 134

Figura 58: Espectros de dicroísmo circular do *Crotalus neutralization factor* (CNF) em função da temperatura. 136

Figura 59: Desenovelamento térmico do *Crotalus neutralization factor* (CNF) monitorado a 200 nm. Foi obtido um *Transition melting* (T_m) para a CNF de 78,1°C, que foi calculado a partir do ponto de inflexão da curva sigmoide no Origin. 136

Figura 60: Espectros de dicroísmo circular do *Crotalus neutralization factor* (CNF) complexado com a crotoxina B (CNF-CB). 137

Figura 61: Desenovelamento térmico do *Crotalus neutralization factor* (CNF) complexado à crotoxina B (CNF+CB) monitorado a 200 nm. Foram obtidos dois *Transition meltings* (T_{m1} e T_{m2}) que foram calculados a partir dos pontos de inflexão das curvas sigmóides no Origin. 138

Figura 62: (A) Cromatografia de exclusão analítica da CNF em 20 mM Formato de Amônio pH 6,5. (B) Curva de calibração utilizando proteínas padrão de massa molecular conhecida. 140

Figura 63: Curva de espalhamento de raios X à baixo ângulo da CNF dissolvida em 20 mM Bicarbonato de Amônio pH 6,5 concentrada a 5 mg.ml⁻¹. O gráfico em vermelho mostra a relação da intensidade do espalhamento em relação ao vetor de espalhamento ao quadrado, onde se pode obter três raios de giro diferentes obtidos de uma mesma amostra de CNF. 140

- Figura 64:** Gel de eletroforese em condições não dsenaturantes da CNF de diferentes concentrações (1, 5 e 10 mg.ml⁻¹) mostrando as diferentes condições oligoméricas das formas glicosiladas (g+) e não glicosiladas (g-). A primeira linha à esquerda é a linha dos marcadores de massa molecular..... 141
- Figura 65:** Anisotropia de fluorescência dos resíduos de tirosina do *Crotalus neutralization factor* (CNF) em diferentes concentrações, de 72 μ M (preto), 100 μ M (vermelho) e 140 μ M (azul)..... 142
- Figura 66:** (A) Curva de espalhamento de raios X a baixo ângulo do *Crotalus neutralization factor* (CNF; em preto) e do seu complexo com a crotoxina B (CNF-CB; vermelho) após a retirada dos 20 (para CNF) e 8 (para CNF-CB) pontos iniciais que eram referentes à agregados. (B) Curva de distribuição de distâncias ($p(r)$) para as amostras de CNF (vermelho) e CNF-CB (preto). 143
- Figura 67:** Representação em *cartoon* da estrutura teórica da CNF obtida após 10 ns de dinâmica molecular..... 144
- Figura 68:** Representação em *cartoon* da estrutura teórica da CNF obtida após 10 ns de dinâmica molecular com destaque em sticks para as tirosinas presentes na estrutura (em amarelo) e para o fragmento PGLPLSLQNG (em azul) apontado por Twin et al. (2002) como o sítio responsável pela interação da fosfolipase A₂ com os inibidores gama de serpentes do gênero *Python* graças a capacidade desse fragmento de inibir atividade fosfolípida..... 145
- Figura 69:** Intensidade de fluorescência emitida pelos resíduos de tirosina do *Crotalus neutralization factor* (CNF) em diferentes concentrações, de 72 μ M (preto), 100 μ M (vermelho) e 140 μ M (azul). 146

Lista de Tabelas

Tabela 1: Dados de cristalização e dos modelos utilizados para a substituição molecular das estruturas cristalográficas resolvidas neste trabalho. PrTX-I-AA e PrTX-I-CA referem-se as estruturas cristalográficas da PrTX-I complexada com ácido aristolóquico e ácido caféico respectivamente.	52
Tabela 2: Estatísticas de coleta e processamento de dados da crotoxina B de <i>Crotalus durissus colillineatus</i>	68
Tabela 3: Estatísticas finais do refinamento da crotoxina B de <i>Crotalus durissus colillineatus</i>	69
Tabela 4: Cálculo da área de acessibilidade ao solvente dos resíduos de triptofano (\AA^2) das estruturas cristalográfica da crotoxina (PDB ID 3R0L) e de CB (PDB ID 2QOG) e das subunidades (no caso da crotoxina) ou monômeros (no caso de CB) isolados. Esses valores de área foram calculados pelo programa AreaMol do pacote de programas CCP4i (Potterton <i>et al.</i> , 2004).	78
Tabela 5: Cálculo da área de acessibilidade ao solvente dos resíduos de triptofano (\AA^2) das estruturas cristalográfica da CB de <i>Crotalus durissus collineatus</i> , dos dímeros que compõem a estrutura cristalográfica da CB de <i>Crotalus durissus terrificus</i> (PDB ID 2QOG) e dos monômeros isolados. Esses valores de área foram calculados pelo programa AreaMol do pacote de programas CCP4i (Potterton <i>et al.</i> , 2004).	83
Tabela 6: Estatísticas de coleta e processamento de dados da Brazilitoxina-II (BbTX-II) e MTX-II isoladas do veneno de <i>Bothrops brazili</i>	96
Tabela 7: Estatísticas finais do refinamento da Brazilitoxina-II (BbTX-II) e MTX-II de <i>Bothrops brazili</i>	96
Tabela 8: Área da superfície enterrada (Buried Surface Area) dos resíduos que compõem o sítio de desestabilização da membrana (MDiS; Leu121 e Phe125) nas estruturas apo (ausência de ligantes no canal hidrofóbico) e complexadas (presença de ligantes no canal hidrofóbico). BthTX-I: Bothropstoxin I do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> venom (PDB ID: 3HZD); PrTX-I: Piratoxin I do veneno de <i>Bothrops pirajai</i> (PDB ID: 2Q2J); BbTX-II: Brazilitoxina II do veneno de <i>Bothrops brazili</i> (PDB ID 4K09); BnSP-7: Lys49-PLA ₂ do veneno de <i>Bothrops pauloensis</i> (PDB ID 1PA0); BthTX-I-PEG4K: BthTX-I complexada com PEG4000 (PDB ID 3IQ3); BthTX-I- α T: BthTX-I complexada com alfa tocoferol (PDB ID 3CXI); BthTX-I-BPB: BthTX-I modificada quimicamente pelo brometo de p-bromofenacila (BPB) (PDB ID 3HZW); PrTX-I- α T: PrTX-I complexada com alfa tocoferol (PDB ID 3CYL); PrTX-I-BPB: PrTX-I modificada quimicamente pelo brometo de p-bromofenacila (BPB) (PDB ID 2OK9); MTX-II-PEG4K: MTX-II do veneno de <i>Bothrops brazili</i> complexada com PEG4000 (PDB ID 4K06); BnIV-Myristic Acid: Bn-IV do veneno de <i>Bothrops neuwiedi</i> complexada com ácido mirístico (PDB ID 3MLM).	105
Tabela 9: Estatísticas de coleta e processamento de dados dos complexos PrTX-I-Ácido Caféico e PrTX-I-Ácido Aristolóquico.	110
Tabela 10: Estatísticas do refinamento dos complexos PrTX-I-Ácido Caféico e PrTX-I-Ácido Aristolóquico.	110

Tabela 11: Estatísticas finais de coleta de dados e do refinamento da estrutura cristalográfica da Moojenitoxina-I (MjTX-I).....	116
Tabela 12: Listagem dos resíduos e átomos envolvidos em ligações de hidrogênio e pontes salinas nas interfaces dos monômeros que constituem a estrutura cristalográfica da MjTX-I.	119
Tabela 13: Listagem dos resíduos envolvidos em contatos de van der Waals nas interfaces dos monômeros que constituem a estrutura cristalográfica da MjTX-I.	120
Tabela 14: Raio hidrodinâmico e porcentagem de polidispersividade obtidos por experimentos de espalhamento de luz dinâmico (DLS) da MjTX-I. Os experimentos foram realizados com a proteína dissolvida em água ultra pura e em diferentes concentração de Tris HCl pH 8,0 (0,5; 2,0; 5,0; 10,0 e 20 mM). No casa das medidas realizadas na presença do tampão, elas foram obtidas após imediatamente a sua adição e duas horas depois. Os círculos em cinza correspondem a conformação oligomérica obtida em cada condição experimental.	122
Tabela 15: Raio hidrodinâmico e porcentagem de polidispersividade obtidos por experimentos de espalhamento luz dinâmico (DLS) do <i>Crotalus neutralization factor</i> (CNF) e do complexo desta proteína com a crotoxina B (CNF+CB) em três diferentes temperaturas.	139

Lista de Abreviaturas

α BaltMIP: Inibidor endógeno de fosfolipases A₂ do tipo α isolado do plasma de *Bothrops alternatus*;

Asp49-PLA₂s: Fosfolipases A₂ catalíticas que possuem um resíduo de ácido aspártico na posição 49;

α PLI: Inibidor endógeno de fosfolipases A₂ do tipo α ;

BbTX-II: Brazilitoxina-II, uma Lys49-PLA₂ isolada do veneno de *Bothrops brazili*;

BthTX-I: Bothropstoxina-I, uma Lys49-PLA₂ isolada do veneno de *Bothrops jararacussu*;

BSA: Área de superfície enterrada (*Buried Area Surface*);

CA: Crotoxina A ou Crotapotina;

CB: Crotoxina B;

CD: Espectroscopia de dicroísmo circular;

CNF: *Crotalus neutralization factor*, um inibidor endógeno de fosfolipases A₂ do tipo γ isolado do plasma de *Crotalus durissus terrificus*;

CNF-CB: Complexo formado pelo *Crotalus neutralization factor* e a crotoxina B;

CRD Domain: Domínio de reconhecimento de carboidratos;

DLS: Espalhamento de Luz Dinâmico;

D_T: Coeficiente de Difusão Translacional;

F_{calc}: Fatores de estrutura calculados após a realização da substituição molecular;

F_{obs}: Fatores de estrutura observados a partir da difração de raios X por um monocristal;

K_{AV}: Coeficiente de partição;

Lys49-PLA₂s Fosfolipases A₂ desprovidas de atividade catalítica que possuem um resíduo de lisina na posição 49;

MDiS: Sítio de desestabilização da membrana (*Membrane Disruption-Site*);

MDoS: Sítio de *docking* à membrana (*Membrane Docking-Site*);

MjTX-I: Moojenitoxina-I, uma Lys49-PLA₂ isolada do veneno de *Bothrops moojeni*;

PDB: Protein Data Bank;

PDB ID: Código de três letras que identificam uma estrutura cristalográfica depositada no Protein Data Bank;

PEG: Polietilenoglicol;

PLA₂s: Fosfolipases A₂;

PLI: Inibidor endógeno de fosfolipases A₂;

p(r): Curva de distribuição de distâncias;

PrTX-I: Piratoxina-I, uma Lys49-PLA₂ isolada do veneno de *Bothrops pirajai*;

PrTX-I-AA: Piratoxina-I complexada com Ácido Aristolóquico;

PrTX-I-CA: Piratoxina-I complexada com Ácido Caféico;

R_{cryst}: Valor de discordância entre os valores dos fatores de estrutura calculados (F_{obs}) e os valores dos fatores de estrutura observados (F_{calc});

R_{free}: Valor de discordância entre os valores dos fatores de estrutura calculados (F_{obs}) e os valores dos fatores de estrutura observados (F_{calc}) calculado usando um subconjunto de reflexões retiradas aleatoriamente (geralmente em torno de 5%) que não são usadas durante o refinamento da estrutura;

R_g: Raio de giro;

R_h: Raio hidrodinâmico;

SAXS: Espalhamento de raios X a baixo ângulo

svPLA₂s: Fosfolipases A₂ isoladas do veneno de serpentes;

T_m: *Transition melting*;

γPLI: Inibidor endógeno de fosfolipases A₂ do tipo γ.

Capítulo 1
Introdução geral ao ofidismo

As serpentes sempre despertaram curiosidade e fascínio entre os homens, fato este comprovado pela influência que estes animais exerceram e exercem em vários aspectos da vida humana através de mitos, símbolos e religiões. Este interesse também se refletiu na ciência, com a consequente realização de muitos estudos a respeito das propriedades e componentes dos venenos de serpentes. A importância dada a tais estudos é claramente evidenciada pelo grande volume de artigos que tratam do estudo dos venenos destes animais e seus constituintes publicados em periódicos especializados em toxicologia (Guimaraes & Carlini, 2004). Grande parte desse fascínio e interesse advém do envenenamento provocado por esses animais do qual o homem sofre desde os tempos mais remotos da Antiguidade.

De fato, ainda nos dias de hoje, o envenenamento ofídico é um problema de saúde pública, afetando especialmente, regiões de clima tropical, subtropical e áreas rurais de países da África, Ásia, Oceania e América Latina (Pinho & Pereira, 2001). Estima-se que ocorram cerca de 420 mil envenenamentos por serpentes a cada ano no mundo, resultando em pelo menos 20.000 mil mortes (Kasturiratne *et al.*, 2008). Entretanto, como grande parte desses acidentes ocorrem em áreas remotas e em países com baixa ou ausente infraestrutura de notificação e controle do número de envenenamentos, estes números podem estar subestimados e o número de acidentes pode chegar a 1 milhão e 800 mil e o número de mortes a 94 mil (Kasturiratne *et al.*, 2008). A mortalidade causada por envenenamento ofídico é maior do que de diversas Doenças Tropicais Negligenciadas, como cólera, leishmaniose, esquistossomose e doenças de Chagas (Kasturiratne *et al.*, 2008; Williams *et al.*, 2010). Por conta disso, no ano de 2009, a Organização Mundial de Saúde (OMS) passou a incluir o envenenamento ofídico na lista de Doença Tropicais Negligenciadas e a Sociedade Internacional de Toxicologia (IST) criou a *The Global Snake Bite Initiative* (Williams *et al.*, 2010). Ambas iniciativas visam reduzir a mortalidade e a morbidade causada pelos acidentes ofídicos através de ações educativas e de formação de equipes médicas e de centros de saúde, sobretudo em áreas remotas do planeta,

assim como uma política de melhor distribuição e acesso aos soros antiofídicos. Além disso, o envenenamento ofídico pode ser considerado também como uma doença ocupacional já que o grupo mais acometido por ele é formado por jovens do sexo masculino que exercem atividades agrícolas, fato este que é frequentemente negligenciado pelas autoridades governamentais (Gutiérrez *et al.*, 2006; Kasturiratne *et al.*, 2008).

A soroterapia é o único tratamento capaz de neutralizar a ação dos venenos, consistindo na administração de soro antiofídico, também chamado de soro heterólogo antiveneno, rico em anticorpos específicos (Hawgood, 1992). Esse soro é composto por uma alta concentração de imunoglobulinas, obtidos através da sensibilização de diversos animais, geralmente equinos (Theakston & Reid, 1983). O soro antiofídico pode evitar ou reverter grande parte dos sintomas dos envenenamentos ofídicos, e desempenham um papel crucial na redução da mortalidade e da morbidade. Estas preparações foram incluídas na Lista de Medicamentos Essenciais da OMS e devem ser parte de qualquer pacote de cuidados primários de saúde nos locais em que ocorrem acidentes ofídicos (Kasturiratne *et al.*, 2008; Williams *et al.*, 2010).

No Brasil, o primeiro estudo epidemiológico de acidentes ofídicos foi realizado em 1901 por Vital Brazil, quando ele contabilizou o número de óbitos por picadas de serpentes peçonhentas do Estado de São Paulo. Nesse mesmo período, Vital Brazil passou a produzir e distribuir os primeiros tubos de soro antiofídico para consumo. Distribuía também o *Boletim para Observação de Accidente Ophidico*, que deveria ser preenchido junto com a administração do soro e continha várias informações acerca do paciente e do local e das características da serpente que provocou o acidente. Essa ficha foi pioneira na notificação dos acidentes ofídicos ocorridos no país, servindo de modelo para as mais atuais, permitindo uma boa acurácia no levantamento dos números de acidentes e morbidade e mortalidade ocorrida no Brasil (Bochner & Struchiner, 2003).

Estima-se que ocorrem, anualmente, no Brasil cerca de 20.000 casos de acidentes com serpentes com variação significativa por região, sendo os coeficientes mais elevados no Norte e Centro-Oeste (Brasil, 2001). No ano de 2010, foram notificados que 73,5% dos acidentes foram causados por serpentes do gênero *Bothrops*, 7,5% causados pelo gênero *Crotalus*, 3,0% pelo gênero *Lachesis*, 0,75% pelo gênero *Micrurus*, 3,0% por serpentes não peçonhentas e em 11,8% dos casos não houve identificação da serpente (Brasil, 2001). Esse perfil se mantém inalterado ao longo dos últimos 100 anos (Bochner & Struchiner, 2003).

Como podemos ver, o gênero *Bothrops* (família Viperidae) é o responsável pela grande maioria dos acidentes ofídicos no Brasil. Esse gênero possui 24 espécies, com ampla distribuição geográfica, e são popularmente conhecidas como jararacas. Ainda que seja responsável por cerca de 75% dos acidentes ocorridos no país, a mortalidade é bastante baixa, sendo que apenas 0,4% do total de acidentes com estas serpentes levam ao óbito (Brasil, 2001). Entretanto, a frequência de sequelas, relacionada a complicações locais é extremamente alta, devido à drástica mionecrose local que não é eficientemente neutralizada pela soroterapia, levando muitas vezes à amputação do membro afetado (Gutiérrez & Lomonte, 1995).

O gênero *Crotalus* (família Viperidae), por sua vez, ainda que seja responsável por apenas 7,5% dos acidentes ofídicos no Brasil, cerca de 2,5% desses acidentes acabam levando ao óbito, devido às pronunciadas atividades neurotóxica, miotóxica e coagulante, que acarretam em paralisias musculares, insuficiência respiratória, mioglobínúria e insuficiência renal aguda com comprometimento dos néfrons, principal causa de óbito nesses envenenamentos (Araújo *et al.*, 2003; Azevedo-Marques *et al.*, 2003). No Brasil, as serpentes do gênero *Crotalus*, popularmente conhecidas como cascavéis, estão representadas por uma única espécie com ampla distribuição geográfica, *Crotalus durissus*, que possui cinco subespécies, sendo as espécies *Crotalus durissus terrificus* e a *Crotalus durissus collilineatus* as mais conhecidas e estudadas (Melgarejo, 2003).

Um dos componentes encontrado em grande abundância nos venenos desses animais e que é um dos principais responsáveis pela atividade miotóxica do envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* e pela atividade neurotóxica no caso das serpentes do gênero *Crotalus*, são as fosfolipases A₂, as quais serão abordadas em termos estruturais e funcionais a seguir.

1.1 Fosfolipases A₂ (PLA₂s): componentes protéicos de elevado interesse científico encontrados em venenos botrópicos e crotálicos

As fosfolipases A₂ (PLA₂s) são enzimas pequenas (14 kDa), estáveis, Ca²⁺-dependentes e que promovem a hidrólise da ligação éster *sn*-2 de fosfolipídios, liberando ácidos graxos livres e lisofosfolipídios, como por exemplo, o ácido araquidônico (Van & De Haas, 1963; Schaloske & Dennis, 2006). Estes produtos, por sua vez, participam de um grande número de processos biológicos. O ácido araquidônico, por exemplo, pode ser convertido em eicosanóides, que são utilizados como segundo mensageiros em um grande número de processos fisiológicos e patológicos, como regulação do sono, respostas imunes, mediação de inflamações e nocicepção (Tsuboi *et al.*, 2002). Já os lisofosfolipídios, podem servir como precursores envolvidos na proliferação, migração e controle da apoptose celular em diversos processos inflamatórios (Prescott *et al.*, 2000; Moolenaar *et al.*, 2004).

Inicialmente, as fosfolipases A₂ foram classificadas em três grupos, de acordo com a sua sequência de aminoácidos (Davidson & Dennis, 1990). Em 1994, foi estabelecido o primeiro sistema de numeração que classificou estas enzimas em quatro grupos (Dennis, 1994). Essa classificação foi revisada alguns anos depois, reclassificando estas enzimas em onze grupos, tendo como critérios o número de pontes dissulfeto e a similaridade das sequências de aminoácidos (Six & Dennis, 2000). Com o grande avanço nas técnicas de biologia molecular nos últimos anos, um grande número de novas PLA₂s foram descobertas e uma nova revisão da classificação se tornou necessária. Recentemente, as PLA₂s foram classificadas em quinze

grupos, que podem ser organizados em cinco grandes grupos: as PLA₂ secretadas (sPLA₂), as PLA₂ citosólicas (cPLA₂), as PLA₂ Ca²⁺ independentes (iPLA₂), os fatores de ativação plaquetária do tipo acetilhidrolases (PAF-AH) e as PLA₂ lisossomais (Schaloske & Dennis, 2006). O grupo das sPLA₂s possui dezesseis subgrupos, que incluem as PLA₂s de veneno de serpentes (svPLA₂s). As fosfolipases A₂ dos venenos das famílias Elapidae e Viperidae, as mais importantes em relação a envenenamento ofídico, pertencem, respectivamente, aos grupos IA e IIA/IIB. Esta classificação é baseada na similaridade das sequências, posição das pontes dissulfeto e inserção de *loops* (Six & Dennis, 2000; Schaloske & Dennis, 2006). As svPLA₂s classificadas nos grupos IA e IIA possuem seis pontes dissulfeto, sendo que seis delas são conservadas nas duas famílias, com diferenças nas pontes Cys11/Cys77, exclusiva de Elapidae, e Cys51/Cys133, exclusiva de Viperidae. Além disso, as svPLA₂s classificadas no grupo IIB possuem apenas cinco pontes dissulfeto, faltando a ponte Cys61/Cys91 (Arni & Ward, 1996; Schaloske & Dennis, 2006)

O sítio catalítico das fosfolipases A₂ é composto por uma histidina (His48, de acordo com o sistema de numeração para PLA₂s proposto por Renetseder *et al.* (1985)) próxima a um aspartato conservado (Asp99) e um ácido aspártico na posição 49, que é essencial para a coordenação do cofator Ca²⁺ (Arni & Ward, 1996; Magro *et al.*, 2009). Duas propostas foram realizadas na tentativa de explicar o mecanismo catalítico da hidrólise de fosfolipídios das fosfolipases A₂. A primeira proposta foi realizada por Scott, White *et al.* (1990) baseada em estruturas de fosfolipases das classes IA e III nativas e complexadas com análogos de transição. Neste modelo, conhecido como *single-water mechanism*, o átomo Nδ1 da His48 é estabilizado pelo átomo de oxigênio do grupo carboxil do Asp99, que, por sua vez, forma uma ponte de hidrogênio com o oxigênio hidroxil da Tyr53 (Scott, Otwinowski *et al.*, 1990; Scott, White *et al.*, 1990). Após a ligação do fosfolipídio, o átomo Nδ1 da His48 retira um próton de uma molécula de água estrutural, iniciando o ataque nucleofílico da posição *sn*-2 do substrato,

formando intermediário oxianion tetraédrico. Esse intermediário tetraédrico é estabilizado pelo cofator Ca^{2+} , que por sua vez, está ligado ao oxigênio do carboxil da Asp49, aos átomos de oxigênio da cadeia principal do *loop* de ligação de Ca^{2+} (região 26-35) e duas águas estruturais. Após o colapso do intermediário tetraédrico e a liberação dos produtos da hidrólise, três moléculas de água se movem para a região do sítio ativo.

Posteriormente, foi proposto um segundo mecanismo, conhecido como *assisting-water mechanism*, onde duas moléculas de água estariam na formação e na hidrólise, respectivamente, do intermediário tetraédrico (Rogers *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1998). Neste modelo, a molécula de água que gera o ataque nucleofílico é coordenada pelo Ca^{2+} . Essa molécula de água também é estabilizada por uma segunda molécula de água que, por sua vez, forma ligações de hidrogênio com a His48 e com o Asp99. Este mecanismo é suportado pela estrutura cristalográfica de um mutante His48Gln de uma fosfolipase humana do grupo IIA (Edwards *et al.*, 2002). Esse mutante ainda possui uma significativa atividade catalítica e apresenta as regiões do sítio catalítico e do *loop* de ligação do Ca^{2+} sem desvios estruturais significantes. Levando em conta o *assisting-water mechanism*, o Gln funcionaria de maneira similar a His48, formando uma ligação de hidrogênio com a molécula de água que é responsável por estabilizar a molécula de água catalítica (Edwards *et al.*, 2002). Um diagrama comparando os dois modelos de mecanismo catalítico pode ser visto na Figura 1.

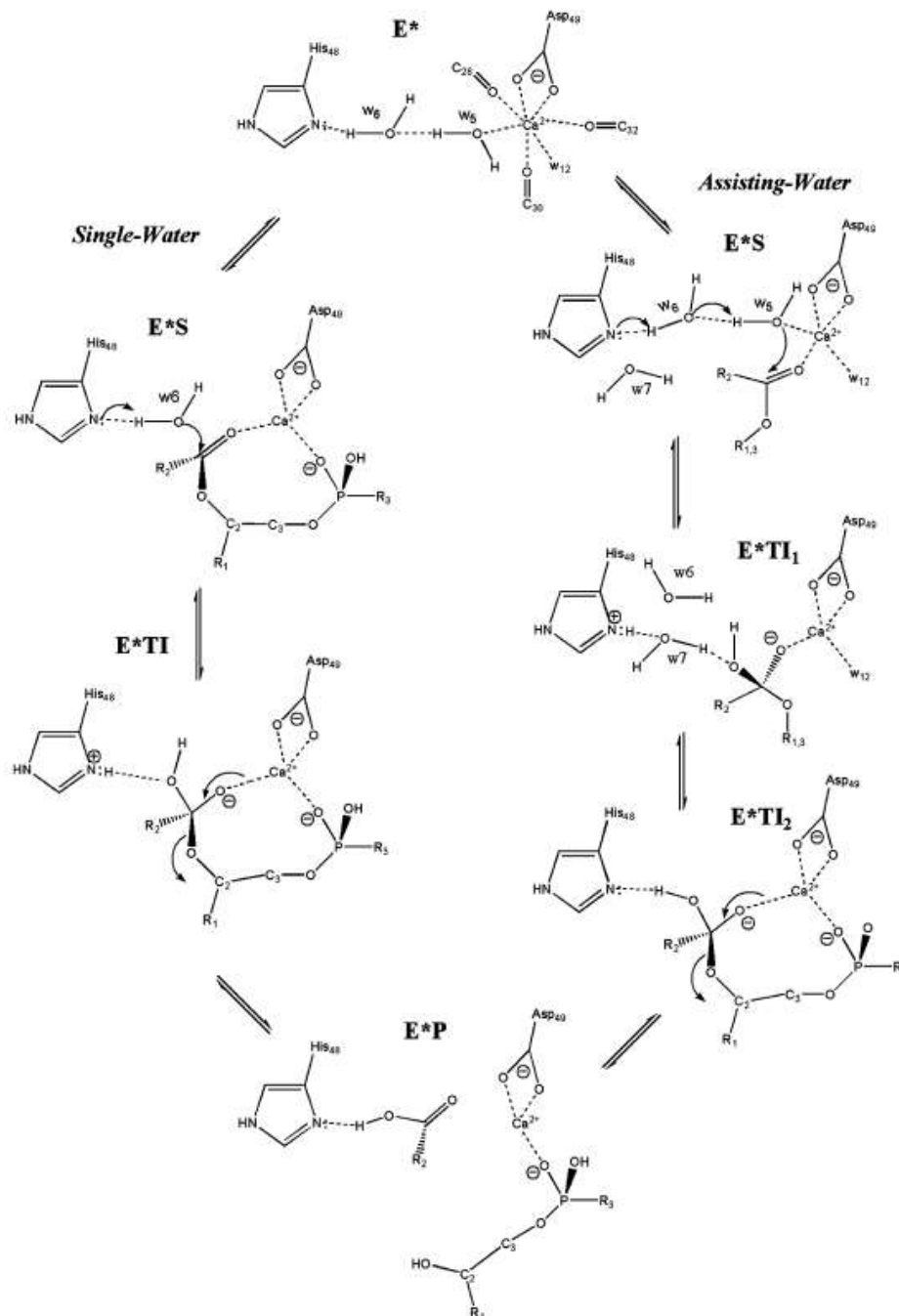


Figura 1: Esquema comparativo dos dois modelos de mecanismo catalítico das fosfolipases A₂. O *single-water mechanism* tem apenas um intermediário, chamado de E*TI e o *assisting-water mechanism* possui dois, chamados de E*TI₁ e E*TI₂. Adaptado de Bahnson (2005).

Apesar das diferenças entre os dois mecanismos apresentados, diversos estudos demonstraram que o íon Ca²⁺ é cofator obrigatório para a catálise das sPLA₂s. Estudos que o substituíram por outros cátions divalentes (Cd²⁺, Sr²⁺, Ba²⁺, Mg²⁺) mostraram que o Cd²⁺, ao contrário dos outros íons, era capaz de fazer com que a enzima ainda se ligasse com o substrato,

mas, ainda, apenas o Ca^{2+} suportava atividade catalítica (Yu *et al.*, 1993). Entretanto, experimentos mais recentes demonstraram também que os íons Ni^{2+} e Co^{2+} eram capazes de suportar significativa atividade catalítica em determinados grupos polares de fosfolipídios (Yu *et al.*, 1998). Esses resultados podem ser atribuídos a diferentes coordenações na geometria da coordenação entre os íons e os fosfolipídios, indicando uma notável plasticidade do sítio ativo (Yu *et al.*, 1998).

O enovelamento típico das PLA₂s de veneno de serpentes (Figura 2) é extremamente conservado em todas as enzimas das classes I e II e é constituído por duas longas hélices α ligadas por pontes dissulfeto em conjunção com o *loop* de ligação do Ca^{2+} (hélices 2 e 3; resíduos 37-54 e 90-109; respectivamente) (Arni & Ward, 1996; Magro *et al.*, 2009). Os resíduos que compõem o sítio catalítico são: His48, Asp49, Asp99 e Tyr52 (Arni & Ward, 1996; Magro *et al.*, 2009). Outras regiões estruturais bem conservadas são a hélice N-terminal (1-13), a região das folhas- β (75-84), o *loop* de ligação do Ca^{2+} (26-35), o “*loop* elapídico” (uma inserção de dois a três aminoácidos na região 52-65 presente apenas nas enzimas da classe IA), a *short-helix* (15-22) e o segmento C-terminal (115-133). Estas regiões podem adotar diversas orientações, especialmente o segmento C-terminal, uma região muito flexível. Além da sua típica ação fosfolipídica, uma grande variedade de outras atividades farmacológicas foi descritas para as fosfolipases de venenos de serpentes, incluindo atividades pré (Westerlund *et al.*, 1992) e pós-neurotóxicas (Bon *et al.*, 1979), cardiotoxica (Fletcher *et al.*, 1981), miotóxica (Gutierrez *et al.*, 1991), bactericida (Paramo *et al.*, 1998), inibitória de agregação plaquetária (Yuan *et al.*, 1993), formadora de edema (Lloret & Moreno, 1993), hemolítica (Condrea, *et al.*, 1981), anticoagulante (Rosenberg *et al.*, 1983), convulsionante (Fletcher *et al.*, 1980) e hipotensiva (Huang, 1984).

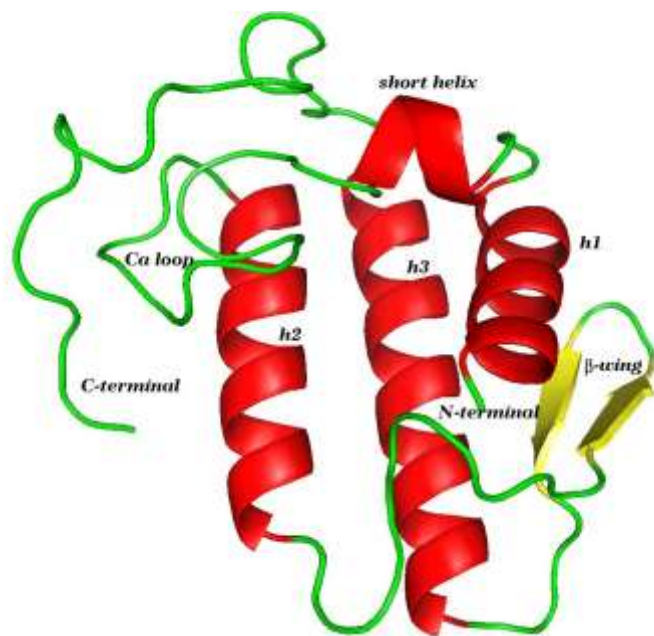


Figura 2: Representação esquemática do enovelamento de uma sPLA2 do grupo IIA, gerada a partir do monômero da BthA-I-PLA₂s de *Bothrops jararacussu* (PDB ID 1U73).

Capítulo 2

Técnicas utilizadas

2.1 Cristalografia de proteínas

O fluxograma da Figura 03 mostra, de maneira simplificada, as etapas para resolução de uma estrutura proteica por cristalografia de proteínas no caso que haja proteínas com grande similaridade estrutural depositadas no banco de dados *Protein Data Bank (PDB)* e se faz possível o uso do método da substituição molecular. A maneira como estas etapas serão realizadas são discutidas a seguir:

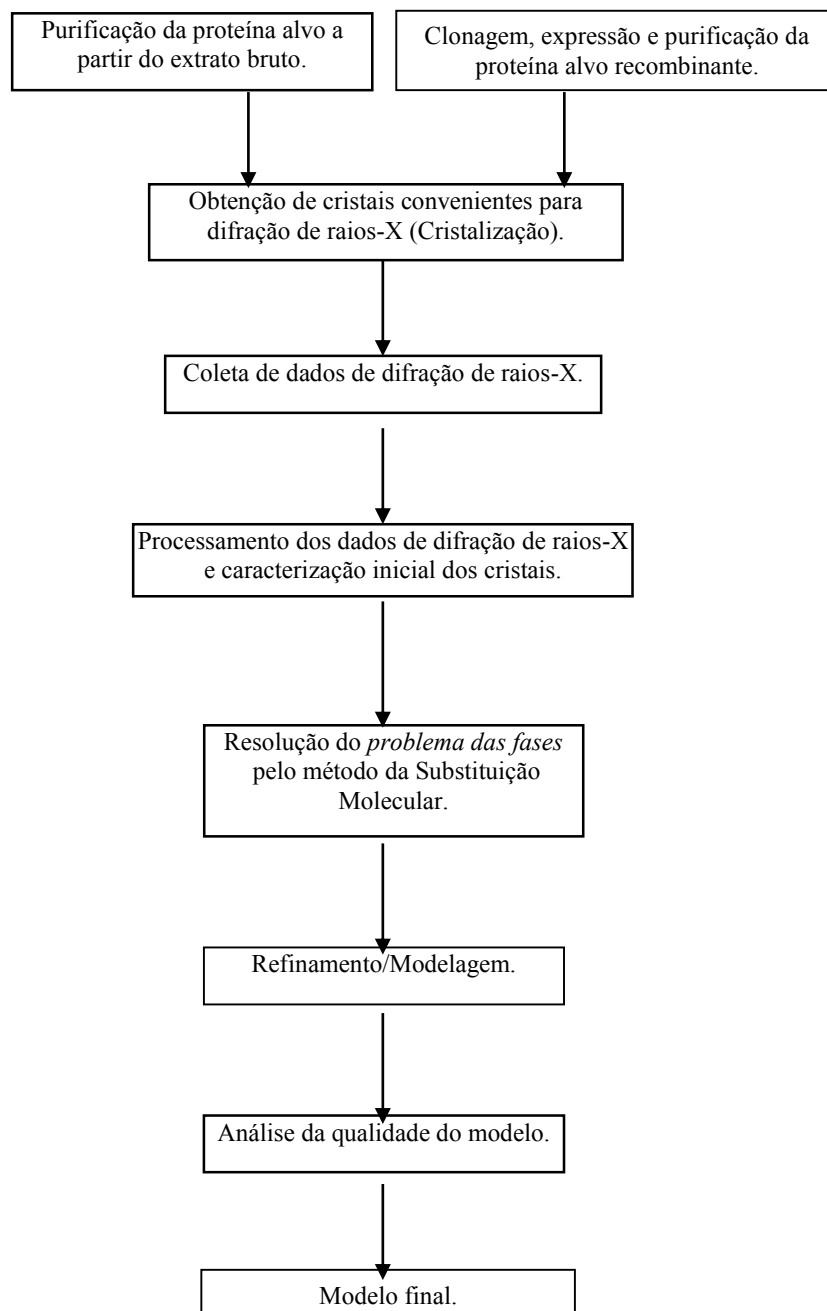


Figura 3: Etapas para resolução de uma estrutura proteica por cristalografia de proteínas de maneira simplificada.

2.1.1 Cristalização

A primeira etapa para se resolver a estrutura de uma proteína por cristalografia de proteínas é a obtenção de um cristal da proteína estudada para experimentos de difração de raios X. A característica fundamental de um cristal é a sua estrutura interna, tridimensionalmente ordenada e periódica, na qual as moléculas estão empacotadas e unidas por meio de interações não covalentes (Ducruix & Giegé, 1999).

A cristalização de moléculas em uma solução é um fenômeno de equilíbrio reversível cujos parâmetros termodinâmicos e cinéticos dependem das propriedades físico-químicas do solvente e do soluto envolvidos. Sabe-se que sob condições de supersaturação, o sistema é guiado para um estado de equilíbrio no qual o soluto é dividido entre as fases líquidas e sólidas. Embora nessas condições as moléculas percam liberdade rotacional e translacional, diminuindo portanto, a entropia do sistema, elas, ao mesmo tempo, formam novas e numerosas ligações químicas estáveis. Isso reduz a energia livre do sistema e fornece a força direcional para o processo de ordenação das moléculas. Entretanto, dependendo das propriedades químicas do solvente e soluto envolvidos, quando o sistema retornar ao equilíbrio, o resultado pode ser uma fase amorfa em vez de uma fase cristalina (McPherson, 2003). Segundo Blundell & Johnson (1976), os principais fatores que afetam o processo de cristalização são: pH da solução de cristalização, concentração e tipo do agente precipitante (e outros aditivos utilizados), força iônica da solução, temperatura, pressão, viscosidade, gravidade, presença de ligantes, aditivos específicos e degradação e/ou desnaturação da amostra proteica, contaminantes macromoleculares, heterogeneidade conformacional e concentração da solução de proteína.

O crescimento de cristais de proteínas envolve três etapas principais: nucleação, crescimento e término do crescimento (Kobe *et al.*, 1999). A nucleação, onde ocorre formação dos primeiros agregados ordenados, é o processo inicial na obtenção de cristais. Quando o núcleo atinge um tamanho crítico, começa a fase de crescimento. Um cristal pequeno pode

crescer pela incorporação de átomos (moléculas) nas suas faces planas em duas dimensões ou em espiral, ou sobre defeitos na superfície do cristal. O mecanismo dependerá da energia das interações entre os constituintes do cristal nas direções consideradas. A morfologia do cristal corresponde diretamente à taxa de crescimento de cada face: faces crescidas lentamente serão maiores e bem desenvolvidas, enquanto as que crescem mais rapidamente tendem a possuírem faces menores. O crescimento de um cristal cessa provavelmente quando há acúmulo de defeitos dentro da rede cristalina, impedindo desta forma a continuação do crescimento de suas faces (McPherson, 2003).

A representação esquemática de um diagrama de fase bidimensional (Figura 4) entre a solubilidade de uma macromolécula ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) e o agente precipitante, compreenderá duas regiões: insaturada (abaixo da curva de saturação) e supersaturada (acima da curva de saturação).

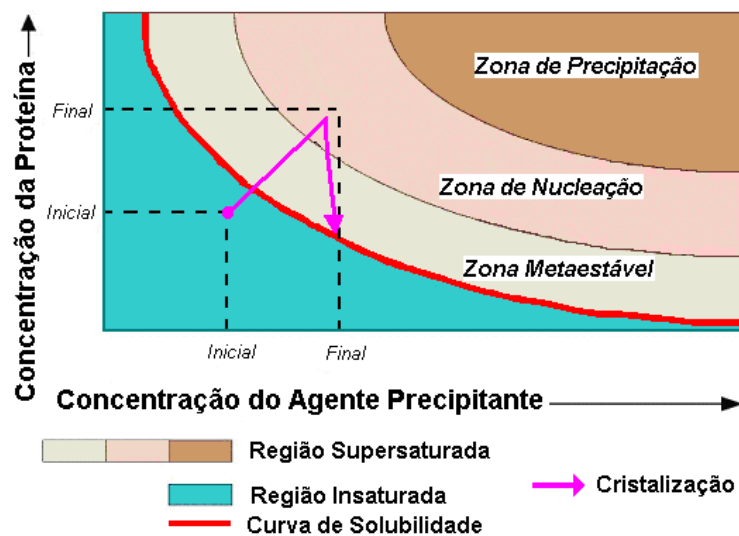


Figura 4: Representação esquemática de um diagrama de fase bidimensional da solubilidade de uma proteína (Kobe et al., 1999).

A região insaturada não apresenta concentração suficiente de proteína e agente precipitante que possibilite a nucleação ou mesmo a cristalização de qualquer macromolécula. A região de supersaturação é subdividida em zona de precipitação, zona de nucleação e zona metaestável. Em soluções extremamente concentradas, as moléculas do soluto saem da

condição solúvel e passam para o estado sólido, podendo agregar-se em um precipitado amorfo ou cristalizar. Um precipitado amorfo corresponde a um mínimo de energia local e frequentemente ocorre quando a agregação acontece muito rapidamente (zona de precipitação). Assim, a estratégia usada para induzir a cristalização de macromoléculas é conduzir lentamente para um estado de solubilidade onde possa ocorrer a nucleação (zona de nucleação) e seguir para uma solubilidade mínima até atingir o grau desejado de supersaturação (zona metaestável) ocorrendo conseqüentemente o crescimento do cristal (McPherson, 2003).

Um método bastante eficiente para o aumento gradativo da concentração do agente precipitante é o *método de difusão de vapor* (McPherson, 2003). O princípio deste método é o processo de equilíbrio de duas soluções; uma é formada pela solução de cristalização (ou solução precipitante) e a outra por esta solução + a solução de proteína; através da fase de vapor, em meio hermeticamente fechado por uma graxa de vácuo. A solução menos concentrada (solução de cristalização+solução de proteína) perderá seu solvente mais volátil até o potencial químico de ambas as soluções se igualar. Cristais tendem a se formar à medida que a concentração de precipitante e de proteína aumenta gradativamente (McPherson, 2003).

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”). Os sistemas *hanging drop* e *siting drop* são os mais adequados para testes iniciais com um grande número de condições de cristalização, já que utiliza quantidades pequenas de proteína (0,5 a 5,0µL) e facilita a análise dos experimentos (McPherson, 2003). Neste sistema, a solução de cristalização fica no reservatório e a solução de proteína + solução de cristalização ficam na gota suspensa. Um diagrama das etapas de montagem do método de cristalização por difusão de vapor, *hanging drop*, pode ser visto na figura 5.



Figura 5: Diagrama das etapas de montagem do método de cristalização por difusão de vapor, sistema *hanging drop*.

Para cristalizar uma proteína, deve-se fazer uma busca das melhores condições de cristalização que atuam na nucleação e no crescimento dos cristais. Com o aumento do número de macromoléculas biológicas cristalizadas com sucesso, tornou-se óbvio que muitas das condições de cristalização apresentavam semelhanças químicas entre si. Empresas como a Hampton Research®, desenvolveram então, quites comerciais de soluções de cristalização previamente determinadas, através das quais, se faz uma busca inicial da condição de cristalização da proteína em estudo. Após a montagem das gotas, observam-se quais soluções obtiveram melhores resultados e então se altera o tipo e a concentração dos componentes químicos que compõem a solução (tampões, sais, agentes orgânicos e polímeros) até que a condição de cristalização seja alcançada. Este método de se variar o tipo e a concentração dos componentes da solução é conhecido como método da matriz esparsa (Jancarik & Kim, 1991).

Existem ainda outras metodologias de cristalização que podem ser utilizadas para a obtenção de monocristais e/ou melhoramento de cristais previamente obtidos, como por exemplo, o método de *seeding* (“semeadura”) (Stura, 1999), subdividido em *macroseeding* (consiste na colocação de um pequeno monocristal em solução estável de proteína e precipitante

para crescimento deste) e *microseeding* (consiste na trituração de um monocristal, utilizando-se micronúcleos, a partir dos quais novos cristais serão formados). Além disso, pode-se acrescentar diversos tipos 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 (4, 10, 18 ou 25°C); entre outras técnicas (McPherson, 2003).

Um cristal é definido como sendo um composto sólido de uma variedade regular de íons ou átomos, os quais compõem as moléculas que ocorrem repetitivamente em posições específicas definidas pela rede tridimensional (Drenth, 1994). Cada uma das menores unidades que se repete infinitamente nas três dimensões do espaço é denominada cela unitária (Figura 06) caracterizada por 3 vetores (vértices) a , b e c e três ângulos α , β , γ . A menor parte da cela unitária a partir da qual pode ser reproduzida depois de aplicadas operações de simetria (grupo espacial) é denominada unidade assimétrica (Figura 06).

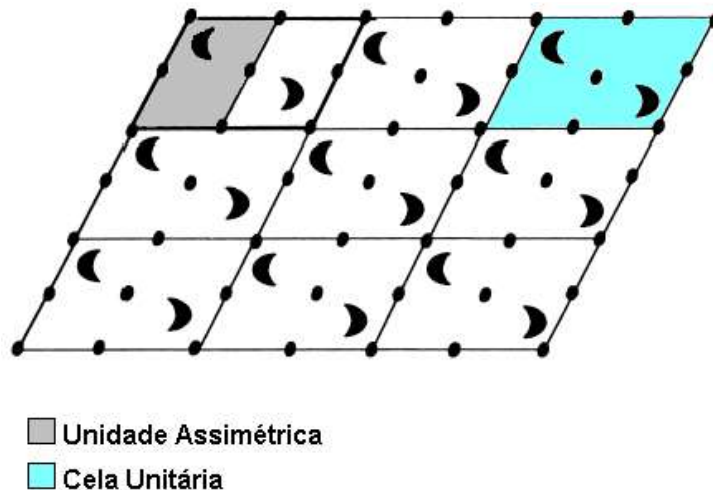


Figura 6: Representação gráfica de um cristal. O centro da cela unitária é indicado por um ponto (•) e cada molécula de proteína está representada por meias-luas (☾) Figura extraída de Souza *et al.*, 2000.

2.1.2 Coleta de dados de difração de raios X

A coleta de dados de difração de raios X é muito importante, pois constitui a única fonte de dados através pela qual podemos obter a estrutura cristalográfica (Blundell & Johnson, 1976). Os dados são obtidos quando um feixe de raios X, após incidir sobre um material cristalino, sofre difração. Estes dados podem ser obtidos através da utilização de uma fonte de raios X convencional, com um ânodo rotatório, ou raios X obtidos a partir de luz síncrotron (Drenth, 1994), como o existente no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas – SP, local onde os conjuntos de dados de difração de raios X das proteínas estudadas neste trabalho foram obtidos.

O fenômeno da difração de raios X foi explicado por Lawrence Bragg que demonstrou que os ângulos com que emergem os feixes difratados por cristais poderiam ser calculados tratando o fenômeno da difração como uma reflexão por conjuntos de planos, paralelos e equivalentes, definidos pelos átomos de um cristal (Drenth, 1994). É por esta razão que cada ponto do padrão de difração de raios X se designa por reflexão. Os raios X difratados por planos adjacentes percorrem diferentes distâncias e Bragg demonstrou que a difração só ocorre quando a diferença da distância percorrida é igual a um múltiplo do comprimento de onda do feixe de raios X. Esta distância é, por sua vez, dependente do ângulo de reflexão (θ) (Figura 7). A relação entre este ângulo θ e o comprimento de onda λ é dada pela chamada Lei de Bragg, $2d\sin\theta=n\lambda$, a partir da qual se pode definir o termo resolução d de um padrão de difração, principal parâmetro indicador da qualidade de um conjunto de dados de difração de raios X (Drenth, 1994).

A simbolização dos planos de difração num cristal é feita por meio de três índices, os índices de Miller (h,k,l), exemplificados na figura 8 um conjunto de planos (234) e a respectiva intersecção com os lados a , b e c da cela unitária.

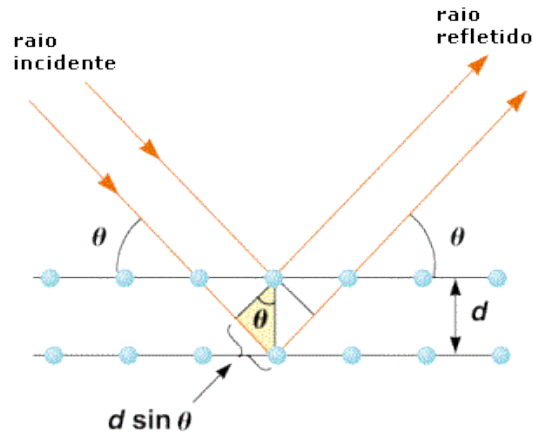


Figura 7: Difração de raios-X por um cristal

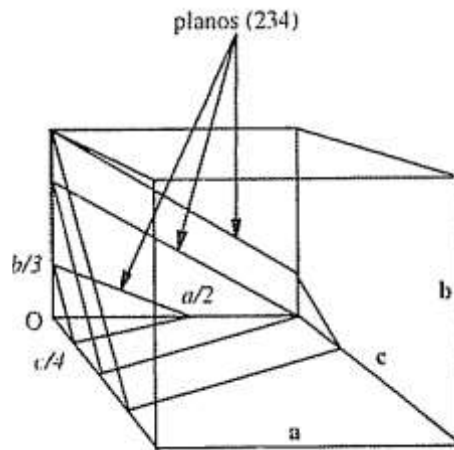


Figura 8: Conjunto de planos (234) e a respectiva intersecção com a célula unitária. Este conjunto corta o lado a em duas partes ($h=2$), b em 3 partes ($k=3$) e c em 4 partes ($l=4$). Figura extraída de Romão (1996)

O método de coleta de dados de difração de raios X por cristais proteicos mais conhecidos e utilizados é o de roto-oscilação, onde neste tipo de coleta de dados o cristal rotaciona em torno de um eixo perpendicular ao feixe de raios X (Drenth, 1994). Normalmente, as coletas de dados ocorrem a temperaturas criogênicas (em torno de 100K), o que reduz os danos causados pela radiação nos cristais que acarreta em decréscimo nas intensidades das reflexões e na redução do tempo de vida do cristal. Para evitar o problema de formação de gelo durante a coleta, os cristais podem ser emergidos rapidamente em uma solução crio protetora (como glicerol por exemplo) que, na medida do possível, deve ser inócua ao cristal (Mcree,

1993). Neste tipo de coleta, a montagem dos cristais para coleta de dados é feita em um *loop* de nylon ao qual o cristal fica preso por tensão superficial (Figura 9).

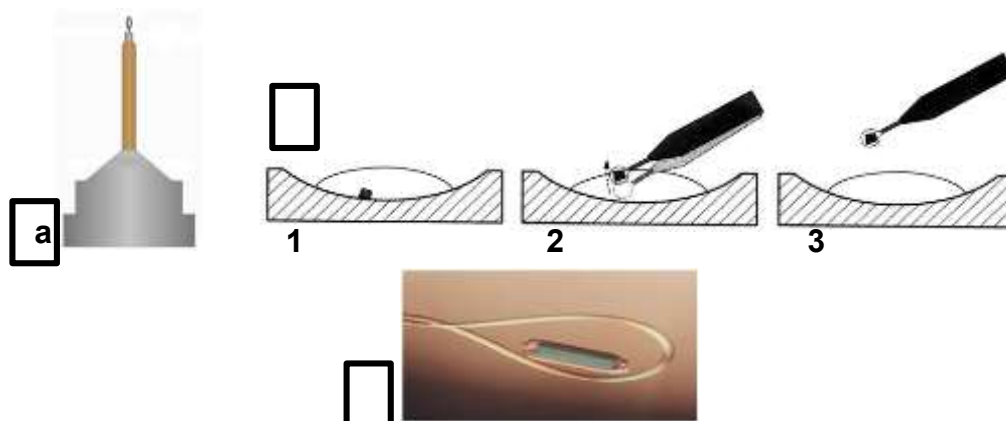


Figura 9: a. Aparato que sustenta o loop, b. Figura esquemática do modo em como o monocristal é preso ao loop, onde em (1) o cristal na gota, (2) como cristal é colocado no aparato com o loop e em (3) o cristal preso ao loop, c. detalhe do cristal preso ao loop.

O *loop* montado é acoplado em uma cabeça goniométrica que possibilita o alinhamento do cristal em relação ao feixe de raios X durante o movimento de roto-oscilação desta cabeça goniométrica. A coleta de dados é normalmente feita por placas CCD ou Pilatus, ligadas através de uma interface a uma estação gráfica onde são visualizadas as imagens difração de raios X (Figura 10).

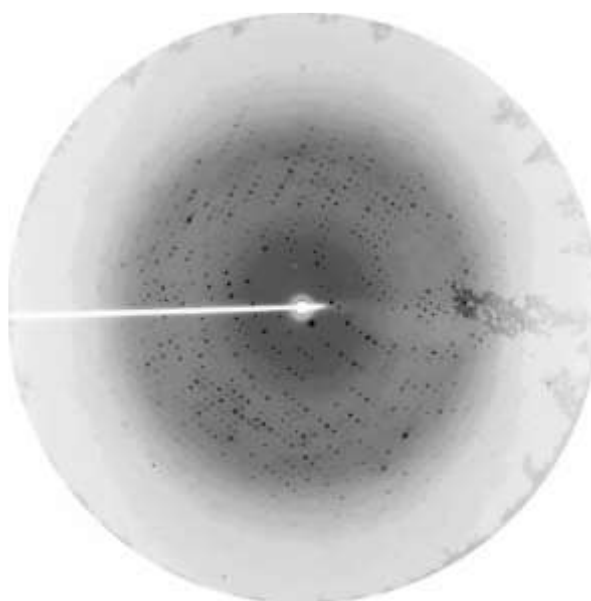


Figura 10: Imagem de difração de raios X. (Miotoxina – I [MjTX-I] do veneno de *B. moojeni*).

Inicialmente, pode-se determinar a partir deste conjunto de dados informações como grupo espacial, parâmetros de rede do cristal, número de monômeros da proteína na unidade assimétrica cristalina e previsão da porcentagem de água no cristal (McPherson, 2003). O processamento dos dados coletados pode ser feito utilizando-se os programas HKL2000 (Otwinowski & Minor, 1997) e MOSFLM (Leslie, 1992) largamente utilizados pela comunidade cristalográfica.

2.1.3 Substituição molecular, modelagem e refinamento da estrutura tridimensional

Para se determinar a estrutura tridimensional de uma proteína é necessário se conhecer a distribuição eletrônica das moléculas que formam o cristal. Para tanto, é necessária a análise completa dos feixes de raios X difratados por ele, ou seja, necessitamos conhecer a intensidade e a fase da radiação difratada. Cada reflexão é uma radiação eletromagnética tratada como uma onda, portanto como funções periódicas caracterizadas por três grandezas, amplitude (F), fase (α) e comprimento de onda (λ). Dessa forma, podem ser descritas como uma série de Fourier em termo dos fatores de dispersão atômica, f_j , chamada equação do fator de estrutura:

$$F_{hkl} = |F_{hkl}| \exp 2\pi i \alpha = \int_V \rho(x, y, z) \exp 2\pi i (hx_j + ky_j + lz_j) dV \quad (1)$$

onde α é o ângulo da fase; $|F_{hkl}|$ é a amplitude do fator de estrutura; x_j , y_j e z_j é a posição do átomo j na cela unitária e V é o volume da cela unitária, contribuindo cada elemento de volume para F_{hkl} com uma fase determinada pelas suas coordenadas (x, y, z) .

Alternativamente, F_{hkl} pode ser descrito como um somatório das contribuições de cada elemento de volume da densidade eletrônica $\rho(x, y, z)$ na cela unitária:

$$F_{hkl} = \sum_j f_j \exp 2\pi i (hx_j + ky_j + lz_j) \quad (2)$$

onde f_j é a amplitude da contribuição do átomo j

Uma vez que a transformada de Fourier é uma operação reversível, a densidade eletrônica pode ser representada em função dos fatores de estrutura:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}| \exp 2\pi i \alpha_{h,k,l} \exp[-2\pi i (hx_j + ky_j + lz_j)] \quad (3)$$

Entretanto, a única informação que pode ser medida é a intensidade da radiação. Desse modo torna-se necessário obterem-se maneiras de conhecer a fase da radiação, ou como se diz habitualmente: resolver o "problema das fases" (Drenth, 1994). Existem diversas maneiras de resolver este "problema", mas o método mais simples e mais utilizado é o método de Substituição Molecular, utilizando-se, por exemplo, os programas MOLREP (Vagin & Teplyakov, 2010) ou Phaser (McCoy *et al.*, 2007). Neste método é necessário que se tenha uma proteína homóloga e com um razoável valor de identidade (usualmente com um mínimo 30-50%) àquela que se pretende resolver a estrutura para ser usada como modelo para obter informação sobre as fases. A estrutura conhecida (modelo) deve ser posicionada corretamente na cela unitária da proteína de estrutura desconhecida. Este posicionamento se dá através de funções de rotação e translação por comparação dos fatores de estrutura do modelo (F_{calc}) com os fatores de estrutura medidos (F_{obs}) da estrutura nova (Navaza & Saludjan, 1997).

Após a substituição molecular, iniciam-se as etapas de refinamento e ajustes manuais da estrutura cristalográfica em relação aos mapas de densidade eletrônica utilizando-se programas gráficos, tal como o Coot (Emsley & Cowtan, 2004). Em seguida, o modelo deve ter sua energia livre minimizada e refinadas as distâncias das ligações peptídicas, os ângulos diédricos, as interações atômicas, entre outros parâmetros, levando em conta os dados experimentais coletados. Para esta etapa de refinamento, utiliza-se, por exemplo, o programa REFMAC (Murshudov *et al.*, 1997) do pacote de programas do CCP4 (Potterton *et al.*, 2004). Após ter sua energia livre minimizada e ter refinado diversos de seus parâmetros estruturais, o modelo retorna novamente ao programa gráfico Coot para novos ajustes manuais, em seguida, volta novamente ao REFMAC para novo refinamento e minimização da energia livre e,

novamente aos programas gráficos para mais ajustes manuais. E assim se faz sucessivamente até se obter a estrutura final da proteína em estudo. Além do REFMAC, os programas CNS (Brunger *et al.*, 1998) e Phenix (Adams *et al.*, 2002) também podem ser utilizados no refinamento da estrutura. Uma estrutura é refinada até a máxima concordância entre o F_{calc} e o F_{obs} . Esta concordância é dada pelos valores de R_{cryst} e R_{free} (McPherson, 2003). O R_{free} e o R_{cryst} são conceitos basicamente idênticos, exceto que o R_{free} é calculado usando um subconjunto de reflexões retiradas aleatoriamente (geralmente em torno de 5%) que não são usadas durante o refinamento da estrutura (Brunger, 1992). Além disso, o gráfico de Ramachandran e outros critérios estereoquímicos que são gerados por programas específicos para isso, tal como o PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) e o RAMPAGE (Lovell *et al.*, 2003) avaliam a qualidade da estrutura obtida através da coerência estereoquímica com a de outras estruturas já obtidas.

Obtida a estrutura tridimensional de uma proteína, pode-se então, dar início aos estudos da relação estrutura-função que ela apresenta.

2.2 Espalhamento de Luz Dinâmico

O espalhamento de luz pode fornecer preciosas informações sobre as propriedades de macromoléculas, incluindo coeficientes de difusão, suas dimensões, a massa molecular, e propriedades de associação e dissociação. Quando em solução, as macromoléculas apresentam movimentos de rotação e translação (movimento browniano) em uma pequena região da solução (Hofmann, 2010). No caso da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS), ela calcula o coeficiente de difusão translacional de uma macromolécula (D_T) a partir do seu movimento browniano em solução (Amaré & Burley, 1997). Esse movimento acontece numa escala de tempo de micro a milissegundos e o componente translacional desse movimento é resultado direto de sua difusão, o que leva a um alargamento do comprimento de onda espalhado

comparado com o comprimento de onda da luz incidida (Hofmann, 2010). Ou seja, a luz espalhada pelas partículas em movimento exibirá flutuações de intensidade correspondentes ao movimento destas partículas e a análise do decaimento da função de auto correlação do sinal da luz espalhada fornecerá uma medida direta do D_T em solução (Amaré & Burley, 1997).

A partir do D_T é possível se obter informações sobre o tamanho de macromoléculas em solução a partir da equação de Stokes-Einstein na qual se pode obter o raio hidrodinâmico (R_H) da molécula em solução (Hofmann, 2010):

$$D_T = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H} \quad (4)$$

onde k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura, η é a viscosidade da solução.

Finalmente, a partir do R_H é possível se obter uma estimativa da massa molecular da molécula utilizando-se a curva de calibração de proteínas globulares de massa conhecida (Amaré & Burley, 1997).

A técnica de DLS (conhecida também como espectroscopia de auto correlação ou espectroscopia de espalhamento quase-elástico de luz) ou também é bastante utilizada para se verificar a polidispersividade das amostras já que é bastante sensível a agregação das moléculas. Isso se mostra bastante útil para a cristalização de proteínas, já que amostras com baixa polidispersividade (< 15%) têm uma chance cerca de 80% maior de cristalizar do que amostras com alta polidispersividade (Amaré & Burley, 1997). Além disso, devido a estimativa da massa molecular, é possível se obter, em amostras com baixa polidispersividade, uma indicação do estado oligomérico da proteína em solução.

2.3 Espalhamento de raios X a baixo ângulo

A técnica de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) é uma ferramenta cada vez mais utilizada para análise do tamanho de moléculas proteicas em solução e seu envelope,

sendo, portanto, uma ferramenta útil e bastante informativa acerca da forma e da composição oligomérica de proteínas e complexos proteicos. Nessa técnica, é incidido raios X da ordem de 1 Å numa amostra proteica em solução que espalha coerentemente raios X baixo ângulo já que o espalhamento de raios X advindo de partículas com dimensões coloidais (entre centenas e dezenas de Å, como é o caso de proteínas) ocorre em ângulos pequenos ($2\theta < 10^\circ$) (Craievich, 2005). A intensidade do espalhamento é dada em função do vetor de espalhamento q , onde q é igual a $4\pi\text{sen}\theta\lambda^{-1}$, sendo 2θ o ângulo entre a radiação incidida e a radiação espalhada (Svergun & Koch, 2003) (Figura 11). Para sistemas diluídos, a forma de uma macromolécula em solução determina a forma da função de decaimento de espalhamento ($I(q)$). Com a aplicação da transformada de Fourier sobre a intensidade do espalhamento ($I(q)$) se obtém a função de distribuição de distâncias ($p(r)$) que é um histograma das distâncias interatômicas e fornece informações sobre o tamanho da macromolécula analisada (Svergun & Koch, 2003).

Guinier observou que para valores baixos q , a curva de $I(q)$ para partículas que se aproxima de formas esféricas é descrita por uma reta com inclinação negativa a partir da qual se pode calcular o raio de giro (média das distâncias dos átomos em relação ao centro da gravidade da molécula; R_g) da molécula em solução (Craievich, 2005) (Equação 5) e, portanto, se obter informações acerca do seu tamanho.

$$R_g = \sqrt{-3\alpha} \quad (5)$$

onde α é o valor de inclinação da reta.

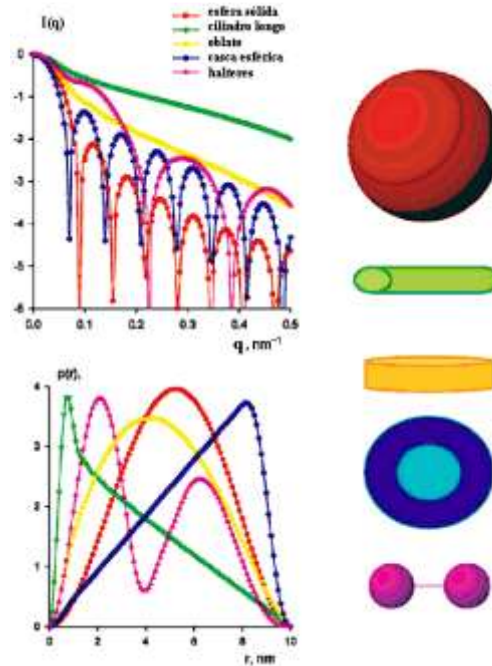


Figura 11: Intensidade de espalhamento ($I(q)$) e função de distribuição de distância ($p(r)$) de objetos de diferentes formas geométricas. Figura adaptada a partir de Svergun & Koch (2003).

Diversos softwares são utilizados para auxiliar o processamento e análise dos dados obtidos por SAXS. O cálculo de $p(r)$ pela transformada de Fourier não é simples de ser realizada devido a erros produzidos por erros estatísticos na medida de I_q , sobretudo para altos valores de q e por isso é utilizado por programas que minimizam esses efeitos. Um dos programas utilizados para essa determinação de $p(r)$ é o GNOM (Svergun, 1992) que fornece uma curva de $p(r)$ estável e sem falsas oscilações, além de estimar a qualidade dos dados obtidos. Outros dois programas bastante utilizados para análise dos dados de SAXS são o Crysol (Svergun *et al.*, 1995), o DAMMIN (Svergun *et al.*, 1999) e o Gasbor (Svergun *et al.*, 2001). O programa Crysol (Svergun *et al.*, 1995) gera curvas de espalhamento I_q de estruturas cristalográficas depositadas no Protein Data Bank (PDB) e desta forma compara a curva de espalhamento de uma proteína em solução obtida por SAXS com a da estrutura cristalográfica, afim de confirmar a conformação oligomérica da proteína analisada. Os programas DAMMIN (Svergun *et al.*, 1999) e Gasbor (Svergun *et al.*, 2001), a partir dos dados de SAXS conseguem calcular o volume e a densidade eletrônica da macromolécula e gerar um modelo estrutural de baixa

resolução de proteínas em solução. Por fim, a ferramenta web SAXS-MoW (Fischer *et al.*, 2010) calcula a massa molecular da proteína analisada a partir da curva de SAXS obtida.

2.4 Espectroscopia de dicroísmo circular

A técnica de espectroscopia de dicroísmo circular é baseada na diferença de absorção entre uma radiação incidente circularmente polarizada à esquerda e a radiação circularmente polarizada à direita por moléculas opticamente ativas, como por exemplo, as proteínas, devido ao carbono α assimétrico dos aminoácidos. Essa absorção diferencial provoca uma mudança no sentido do vetor resultante, que de circularmente polarizado passa a se tornar elípticamente polarizado (Figura 12) que é medida em miligraus (θ) (Hofmann, 2010).

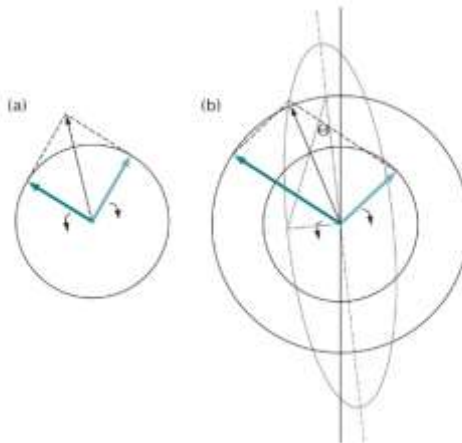


Figura 12: (a) Radiações circularmente polarizadas à esquerda e à direita que incidem sobre a amostra em um experimento de dicroísmo circular (CD); (b) Transformação da radiação circularmente polarizada para uma elípticamente polarizada por conta da absorção diferencial das radiações circularmente polarizadas à esquerda e à direita pela amostra. A elipse é caracterizada por uma diferença do tamanho de seus eixos, cuja razão do menor para o maior fornece a $\tan\theta$, sendo θ a elipicidade. Figura adaptada de Hofmann, 2010.

Graças à lei de Beer-Lambert ($A = \epsilon \cdot c \cdot l$; onde A é a absorbância; ϵ é o coeficiente de extinção molar; c é a concentração das moléculas no meio e l é o caminho óptico), essa absorção diferencial depende da concentração da amostra e do número aminoácidos e por isso, a unidade θ em miligraus é transformada para elipicidade molar residual média ($[\theta]$; deg.cm.mol^{-1}) onde essas variáveis são normalizadas (Correa & Ramos, 2009). Essa transformação é dada pela equação:

$$[\theta] = \frac{\theta \times 100 \times M}{C \times l \times n} \quad (6)$$

onde θ está em graus, M é a massa molecular da proteína em Daltons, C é a concentração da proteína em $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, n é o número de resíduos e l é o caminho ótico em cm (Correa & Ramos, 2009).

No caso das proteínas, a espectroscopia de dicroísmo circular é utilizada principalmente, para a avaliação da sua estrutura secundária e para monitoramento de suas mudanças frente à ligação com cofatores ou inibidores. As alfas hélices possuem transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$ nos comprimentos de onda 190-195 nm e 208-210 nm e uma transição eletrônica $n \rightarrow \pi^*$ no comprimento de onda 222 nm. As folhas beta possuem uma transição eletrônica $\pi \rightarrow \pi^*$ no comprimento de onda 195-200 nm e uma $n \rightarrow \pi^*$ no comprimento de onda 215-220 nm. Finalmente, os elementos desordenados possuem uma transição eletrônica $\pi \rightarrow \pi^*$ no comprimento de onda 200 nm e uma $n \rightarrow \pi^*$ de baixa energia no comprimento de onda 220 nm (Kelly *et al.*, 2005). Esta técnica também permite estudos de análise de estabilidade de proteínas frente à aumento da temperatura e adição de agentes desnaturantes (uréia, guanidina, ácidos ou bases). Nesses experimentos se fixa o comprimento de onda medido (geralmente 222 nm) e a temperatura é aumentada ou o agente desnaturante é titulado e se observa uma transição da proteína de um estágio enovelado para um estágio desenovelado (Hofmann, 2010). Além disso, é possível se monitorar, no ultravioleta próximo (250-330 nm) mudanças no espectro de dicroísmo circular de aminoácidos aromáticos e pontes dissulfeto (Kelly *et al.*, 2005).

2.5 Espectroscopia de fluorescência

A fluorescência é um fenômeno onde uma molécula em sua forma excitada (de maior energia) emite luz quando retorna a um estado de menor energia. Como nessa transição de energia, parte é perdida, e assim, a radiação emitida terá menor energia (maior comprimento de onda) que a utilizada para sua excitação. A razão entre os fótons emitidos por um fluoróforo

(compostos que emitem fluorescência) e os fótons absorvidos (da radiação que foi incidida para a sua excitação) é chamada de rendimento quântico. O rendimento quântico é adimensional e é a única medida absoluta da fluorescência de uma molécula (Hofmann, 2010).

As propriedades fluorescentes de uma molécula dependem da mesma (fatores intrínsecos) ou do meio em que se encontra (fatores extrínsecos). As proteínas possuem três fluoróforos intrínsecos, os resíduos de triptofano, tirosina e fenilalanina, ainda que o rendimento quântico desse último seja muito pequeno e, portanto, a contribuição para a emissão da fluorescência, desprezível (Brown & Royer, 1997). Com relação ao resíduo de tirosina, a sua fluorescência emitida é quase completamente abolida quando este resíduo se encontra ionizado ou está próximo a um grupo amino ou carboxílico ou a um resíduo de triptofano. Dessa forma, a fluorescência intrínseca de proteínas é usualmente determinada pela fluorescência emitida pelo triptofano (348 nm) que pode ser seletivamente excitado pelos comprimentos de onda 295-305 nm (Brown & Royer, 1997). Mudanças no espectro de emissão intrínseco de uma proteína (supressão ou deslocamento do comprimento de onda da fluorescência emitida) são bastante sensíveis à mudança do ambiente intermolecular dos resíduos de triptofano, que podem indicar mudanças conformacionais da proteína. Dessa maneira, é possível se obter relevantes dados estruturais acerca da proteína em estudo (Brown & Royer, 1997; Hofmann, 2010).

Além disso, o fenômeno da fluorescência também pode ser utilizado para se obter informações sobre o tamanho e a forma de uma macromolécula por conta da propriedade de anisotropia (variação da direção) dessa fluorescência (Brown & Royer, 1997). Nesse tipo de experimento, a fluorescência é induzida sobre a amostra por uma radiação plano polarizada e a radiação emitida também é polarizada. Por conta do movimento de difusão rotacional das moléculas, a fluorescência polarizada emitida pelos fluoróforos da amostra vai ter intensidades desiguais ao longo de diferentes eixos de polarização (Hofmann, 2010). A extensão dessa

fluorescência em diversos eixos pode medir o eixo da difusão rotacional e então, se obter informações acerca do tamanho e da forma dessa molécula (Wilson, 2010).

2.6 Estudos filogenéticos

A construção de uma árvore filogenética de proteínas tem por objetivo se estudar as relações de parentesco entre suas sequências homólogas. Inicialmente, é necessário fazer buscas por sequências homólogas nos bancos de dados, que pode ser realizada com o programa BLAST (Basic Local Alignment Sequence Tool) (Altschul *et al.*, 1990). Este programa utiliza um algoritmo desenvolvido para alinhar sequências de nucleotídeos ou aminoácidos de acordo com a similaridade existente entre a sequência alvo e as sequências depositadas no banco de dados. Ao final de cada alinhamento, o BLAST gera uma lista de sequências mais similares à sequência alvo e classifica cada alinhamento individual utilizando dois valores: o *score* e o *e-value*. O *score* é um valor que indica o número de semelhança entre duas sequências. O *e-value* é um valor estatístico que indica a expectativa de que outra sequência com *score* idêntico ou maior ao valor obtido em um determinado alinhamento seja encontrada. Portanto, sequências com alto *score* exibem um baixo *e-value*, e sequências idênticas possuem *e-value* igual a zero.

A partir das sequências encontradas, elas devem ser alinhadas para que possam serem submetidas aos algoritmos de análise filogenética. Há um grande número de programas de alinhamento de sequências, sendo o programa AMAP (Schwartz & Pachter, 2007) o mais recente e cuja utilização pela comunidade vêm crescendo nos últimos anos. Com as sequências alinhadas, já é possível iniciar os cálculos para a construção da árvore. Dentre todos os métodos existentes, o que vêm ganhando destaque nos últimos anos é a metodologia baiesiana por ser tão eficaz como a metodologia da máxima verossimilhança (ML), porém mais rápida e menos exigente computacionalmente por conta da aplicação de uma cadeia Markov-Monte Carlo (Hall, 2008).

2.7 Modelagem computacional teórica e simulações de dinâmica molecular

Devido ao aumento exponencial do número de sequências de proteínas disponibilizadas em bancos de dados nos últimos anos, algumas ferramentas computacionais passaram a ter um papel relevante na execução de estudos estruturais e funcionais de moléculas proteicas. Estes programas que também vêm sendo aperfeiçoados a uma velocidade crescente, são capazes de prever, construir e aperfeiçoar modelos tridimensionais teóricos de proteínas. No entanto, devido ao fato de não dependerem da produção de cristais proteicos para executarem a construção dos modelos (como é o caso da técnica de cristalografia), estes recursos computacionais se mostram bastantes úteis para a realização de estudos estruturais que envolvam um vasto número de proteínas e/ou complexos. Desta forma, estas ferramentas são ideais para o estudo de grande parte das proteínas cujas sequências de aminoácidos já são conhecidas, mas que ainda não foram objeto de qualquer tipo de análise estrutural.

Dois dos recursos computacionais mais conhecidos e utilizados para a elaboração de modelos estruturais teóricos de proteínas são a modelagem por homologia e as técnicas de *threading*. No primeiro método, uma molécula de estrutura não conhecida (*target*) é comparada com outra(s) que possua(m) uma estrutura tridimensional já determinada (*template*) (Leach, 2001). Caso estas moléculas tenham um grau de identidade adequado, que depende basicamente do número de resíduos usado no alinhamento das duas sequências, elas são consideradas homólogas, o que possibilita que as coordenadas espaciais da(s) molécula(s)-modelo (*template*) sejam utilizadas para a geração do modelo tridimensional teórico da molécula-alvo (*target*) (Leach, 2001). Os métodos de *threading* (igualmente conhecidos como *fold recognition techniques*), por sua vez, não apenas se baseiam na identidade sequencial para a execução do(s) alinhamento(s) necessário(s) à construção dos modelos estruturais teóricos, mas também no enovelamento das moléculas envolvidas (no caso da molécula-alvo, a predição de sua estrutura secundária é realizada com base em sua sequência de resíduos de aminoácidos) (Leach, 2001).

Ambos métodos são bastante eficientes, porém as técnicas de *threading* parecem mostrar-se mais adequadas quando o grau de identidade entre a molécula-alvo e a(s) molécula(s)-modelo está aquém de valores considerados tradicionalmente mais adequados. Em alguns casos, a construção de modelos teóricos através do emprego de técnicas de *threading* foi realizada com sucesso mesmo quando os valores de identidade entre as moléculas utilizadas eram inferiores a 25% (Bourne & Weissig, 2002). Após a construção do modelo teórico, utiliza-se programas de simulação de dinâmica molecular que simulam o comportamento da proteína em solução em um certo intervalo de tempo (nanossegundos), com o acréscimo de água e o uso de um campo de força para a diminuição da energia livre do sistema, avaliação das interações eletrostáticas envolvidas no enovelamento, bem como na estabilização do próprio modelo.

Capítulo 3

Material e Métodos

3.1 Obtenção das amostras

Para o presente trabalho, foram utilizadas proteínas que foram isoladas diretamente do veneno bruto, com exceção dos experimentos de expressão da crotoxina B recombinante de *Crotalus durissus terrificus* que será mostrado em uma sessão própria (3.2). Outras amostras de crotoxina utilizadas foram cedidas pelo nosso colaborador Prof. Dr. Andreimar M. Soares, da Fundação Oswaldo Cruz de Rondônia, assim como a amostra de Piratoxina-I (PrTX-I) isolada do veneno de *Bothrops pirajai* (Mancuso *et al.*, 1995), a amostra de MTX-II, isolada do veneno de *Bothrops brazili* (Costa *et al.*, 2008) e a amostra de α -BaltMIP, um inibidor natural isolado do veneno de *Bothrops alternatus* (Santos-Filho *et al.*, 2011). A amostra de Braziliatoxina-II (BbTX-II) isolada do veneno de *B. brazili* (Huanchuire-Veja *et al.*, 2009) utilizada foi cedida pelo nosso colaborador Prof. Dr. Sergio Marangoni, do Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas – SP (UNICAMP). A Amostra de *Crotalus Neutralization Factor* (CNF) utilizada foi cedida pela nossa colaboradora Profa. Dr. Consuelo Latorre Fortes-Dias, da Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte – MG. Já as amostras de Moojetoxina-I (MjTX-I) utilizadas foram purificadas no próprio laboratório a partir do veneno da *Bothrops moojeni* utilizando um gradiente isocrático de 0 a 100% de 500 mM bicarbonato de amônio pH 8,0 em uma coluna CM Sepharose Fast Flow.

3.2 Expressão heteróloga da crotoxina B de *Crotalus durissus terrificus*

Bactérias das linhagens Rosetta e BL21(DE3) foram transformadas com o pET-28a(+) contendo a sequência de cDNA isoforma CBa₂ da crotoxina B de *C. d. terrificus*, permanecendo 1,5 minutos a 42° C e, em seguida, 5 minutos no gelo. Posteriormente apenas as bactérias foram incubadas a 37°C sob agitação por duas horas. Após esse tempo, o crescimento continuou em meio de cultura sólido, *overnight*, contendo os antibióticos adequados. Dessa maneira foram selecionadas nas placas apenas as colônias de bactérias da contendo a sequência que codifica a

proteína de interesse. Em seguida, três colônias previamente selecionadas foram inoculados em meio LB contendo os antibióticos adequados, e em seguida incubados durante 15 horas a 37°C sob agitação constante. Em seguida, uma alíquota deste pré-inóculo foi transferido para uma cultura em pequena escala (15 ml) e em grande escala (1000 ml), em uma diluição 1:100, contendo os antibióticos utilizados como agentes de seleção. As bactérias cresceram à temperatura de 37°C até alcançar uma absorbância a 600 nm de aproximadamente 0,6. Em seguida, uma alíquota foi separada para controle e ao restante foi adicionado 1 mM IPTG (Isopropyl-B-D-Galactoside), levando a indução da expressão da proteína de interesse a 28°C. Após 4 horas da adição de IPTG, as colônias foram centrifugadas a 4788 xg por dez minutos à temperatura de 4°C. A expressão da proteína em larga também foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15% e pela técnica de *western blotting*.

Os péletis foram ressuspensos em tampão 20 mM Tris HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 0,5 mM TCEP, 0,5 mM PMSF, 1 mg.ml⁻¹ lisozima, 1 mg.ml⁻¹ DNase, 1 mg.ml⁻¹ RNase, 0,5 mM Cloreto de magnésio, 1 µg.ml⁻¹ aprotinina, 1 µg.ml⁻¹ lepatatina, 1 µg.ml⁻¹ pesptatina e sonicadas 10 vezes, com pulsos de 30 segundos, com intervalos entre os pulsos de 30 segundos. Após o rompimento celular, o extrato total das bactérias foi submetido à centrifugação 4788xg por 20 minutos a 4°C. A porção solúvel foi descartada e a insolúvel ressuspensa em 6 M uréia, 20 mM Tris HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 1 mM β-mercaptoetanol. O extrato celular então, foi então aplicado a uma coluna de afinidade HisTrapTMHP (GE Healthcare) contendo 5,0 ml de resina níquel-agarose, acoplada a um cromatógrafo (AKTA Purifier – GE Healthcare) que foi submetida a um gradiente linear contínuo de 10 a 500 mM de Imidazol para a eluição da proteína de interesse. A eluição da proteína também foi avaliada em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15% e pela técnica de *western blotting*.

Para a realização da técnica de *western blotting* as amostras contidas no gel SDS-PAGE 15% foram transferidas eletroforeticamene para uma membrana de PVDF. A membrana foi

incubada em solução de bloqueio (PBS 1X 0,01M de NaHPO₄; 0,15M de NaCl, pH 7,2; 5% leite em pó desnatado; 0,1% Tween® 20), por 1 hora, sob agitação, à temperatura ambiente. Nessa mesma solução, foi feita uma diluição de 1:1000 do anticorpo monoclonal anti-histidina (RGS.HisAntibody (100) Isotype mouse IgG1, Qiagen). A membrana foi incubada na solução com anticorpo, nas mesmas condições, por 1 hora e, posteriormente, lavada com solução de bloqueio por três vezes, 5 minutos de duração cada lavagem. A membrana foi então incubada na solução de bloqueio com o segundo anticorpo, IgG de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma), em uma diluição 1:10000. Foram feitas três lavagens, 5 minutos cada, em solução de bloqueio, solução PBS 1X com 0,1% de Tween® 20 e solução PBS 1X. A revelação foi feita em câmara escura, utilizando a solução substrato *ECL plus Western Blotting Detection System* (Amersham Biosciences) em filme de raios X (Kodak).

3.3 Ensaio de cristalização, coleta e processamento de dados

Amostras liofilizadas das proteínas foram ressuspensas em água ultra-pura de modo a atingir a concentração de 12 mg.ml⁻¹, que foi utilizada em todos os testes de cristalização. Para a montagem das placas foi utilizado um poço com 500 µl de solução e uma gota composta por 1 µl de solução do poço e 1µl de solução proteica, utilizando o método *hanging-drop* (McPherson, 2003). Os testes de cristalização foram inicialmente realizados através do método da matriz esparsa (Jankarik & Kim, 1991), utilizando o quite número 1 de 50 soluções da *Hampton Research*. As condições de cristalização das proteínas estudadas neste trabalho encontram-se na tabela 01. Com a CB de *C.d. colillineatus* e a PrTX-I foram realizados experimentos de co-cristalização com inibidores de origem vegetal, o ácido caféico e o ácido aristolóquico (comprados junto a Sigma-AldrichTM) a partir das condições de cristalização da proteína nativa. Esses inibidores foram diluídos em 2,5% etanol e água deionizada, respectivamente, nas concentrações de 5,14 mg.ml⁻¹ e 9,75 mg.ml⁻¹, de modo a se obter na gota

uma proporção proteína/ligante de 1:8. Para a montagem das placas foi utilizado um poço com 500 µl de solução e uma gota composta por 0,8 µl de solução do poço, 0,2 µl da solução de inibidores e 1µl de solução proteica, também utilizando o método *hanging-drop* (McPherson, 2003).

Tabela 1: Dados de cristalização e dos modelos utilizados para a substituição molecular das estruturas cristalográficas resolvidas neste trabalho. PrTX-I-AA e PrTX-I-CA referem-se as estruturas cristalográficas da PrTX-I complexada com ácido aristolóquico e ácido caféico respectivamente.

	BbTX-II	MTX-II	PrTX-I-AA	PrTX-I-CA	Crotoxina B
Serpente	<i>Bothrops brazili</i>	<i>Bothrops brazili</i>	<i>Bothrops pirajai</i>	<i>Bothrops pirajai</i>	<i>Crotalus durissus colillineatus</i>
Condições de cristalização	30% (m/v) PEG 4000; 0,25 M Sulfato de Lítio; 0,1 M Tris HCl pH 8,5	30% (m/v) PEG 8000; 0,25 M Sulfato de Amônio; 0,1 M Cacodilato de sódio pH 6,5	30% (m/v) PEG 4000; 0,2 M Sulfato de Lítio; 0,1 M Tris HCl pH 7,5.	30% (m/v) PEG 4000; 0,2 M Sulfato de Lítio; 0,1 M Tris HCl pH 7,5.	2,0 M Sulfato de Amônio; 0,1 M Tris HCl pH 8,5
Temperatura de cristalização (K)	291	291	291	291	291
Tempo de formação dos cristais (dias)	21	21	10	10	15
Modelo utilizado na substituição molecular	Piratoxina I de <i>Bothrops pirajai</i> (PDB ID 2Q2J)	Bothropstoxina I de <i>Bothrops jararacussu</i> complexada com PEG 4000 (PDB ID 31Q3)	Piratoxina I de <i>Bothrops pirajai</i> complexada com alfa-tocoferol (PDB ID 3CYL)	Bothropstoxina I de <i>Bothrops jararacussu</i> complexada com PEG 4000 (PDB ID 31Q3)	Monômero B da estrutura da crotoxina B de <i>Crotalus durissus terrificus</i> (PDB ID 2QOG)

Os cristais foram submetidos à difração de raios-X na linhas MX1 e MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas, São Paulo utilizando-se o método de roto-oscilação e à temperatura criogênica. Os dados foram processados utilizando-se o programa HKL2000 (Otwinowski & Minor, 1997). As fases foram recuperadas pelo método de substituição molecular, utilizando-se os programas MOLREP (Vagin & Teplyakov) e PHASER (McCoy *et al.*, 2007). Na tabela 01, encontram-se os modelos utilizados na técnica de substituição molecular para cada uma das estruturas obtidas. Os dados foram refinados no programa PHENIX (Adams *et al.*, 2002) e a estrutura modelada manualmente no programa Coot (Emsley & Cowtan, 2004). A qualidade estereoquímica foi avaliada pelo programa PHENIX (Adams *et al.*, 2002). As figuras foram geradas pelo programa Pymol (Delano, 2002). No presente

trabalho, todos os valores de *root square mean deviation* (r.m.s.d.) e as sobreposições de estruturas foram obtidos com o programa Coot (Emsley & Cowtan, 2004) e as figuras geradas pelo programa Pymol (Delano, 2002).

3.3 Espalhamento de luz dinâmico

Experimentos de espalhamento de luz dinâmico (DLS) foram realizados com amostras liofilizadas da Moojetoxina I isolada do veneno de *Bothrops moojeni* (MjTX-I), com α BaltMIP, com o *Crotalus neutralization factor* (CNF) e com o CNF complexado com crotoxina B (CNF-CB). As amostras de MjTX-I foram dissolvidas em água ultra pura e em gradativas concentrações de Tris HCl pH 8,0 (0,5, 2,0 e 10 mM) de modo a atingir a concentração de 1,5 mg.ml⁻¹. As medidas com a proteína dissolvida em tampão foram realizadas logo após a dissolução da proteína e duas horas depois. A amostra de α BaltMIP foi dissolvida a 1,0 mg.ml⁻¹ em água ultra pura. As amostras de CNF e CNF-CB foram dissolvidas a 2,5 mg.ml⁻¹ em 10 mM formato de amônio pH 6,0. Neste trabalho, os experimentos de DLS foram executados utilizando-se o sistema DynaPro[®] - TITAN (Wyatt Technology). Além disso, todas as amostras foram medidas 100 vezes em triplicata e os resultados analisados no programa Dynamics v.6.10.

3.4 Cromatografia analítica de exclusão molecular

Experimentos de cromatografia analítica de exclusão molecular foram realizados com amostra de MjTX-I dissolvida em 20 mM Tris HCl pH 8,0 em uma coluna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare[™]) equilibrada com o mesmo tampão a 20°C. A amostra de MjTX-I (V = 0,1 ml; [2,0 mg.ml⁻¹]) foi injetada utilizando um fluxo de 0,5 ml/min. Esse experimento também foi realizado com o *Crotalus neutralization factor* (CNF) dissolvido em 20 mM formato de amônio pH 6,5 em uma coluna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare[™]) equilibrada com o

mesmo tampão a 20°C. A amostra de CNF ($V = 0,1 \text{ ml}$; $[5,0 \text{ mg.ml}^{-1}]$) foi injetada utilizando um fluxo de 0,5 ml/min.

Para a determinação da massa dessas duas proteínas em solução foram utilizadas proteínas padrão de massa molecular conhecida obtidas a partir de quites específicos para gel filtração da empresa Sigma-AldrichTM. Para a MjTX-I, foi utilizado o quite que possui proteínas de baixa massa molecular e contém: blue dextran (2000 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), citocromo C (12.4 kDa), e aprotinina (6.5 kDa). Para o CNF, foi utilizado o quite que possui proteínas de alta massa molecular e contém: blue dextran (2000 kDa), β -amilase (200 kDa), álcool desidrogenase (150 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa). Os volumes de retenção de cada padrão na coluna foram medidos e usados para o cálculo do coeficiente de partição de cada amostra (K_{AV}), que é definido por $K_{AV} = (V_r - V_o) / (V_c - V_o)$, onde V_r é o volume de retenção de cada amostra, V_o é o volume morto do sistema, medido pelo tempo de retenção do blue dextran e V_c é o volume total da coluna. O coeficiente K_{AV} de cada padrão foi graficado contra o logaritmo da sua massa molecular para gerar uma curva padrão que, por sua vez, foi utilizada para calcular a massa molecular de cada uma das espécies oligoméricas encontradas nas amostras de MjTX-I e CNF, a partir dos volumes de eluição obtidas por elas.

3.5 Espalhamento de raios X a baixo ângulo

Os experimentos de espalhamento de raios a baixo ângulo com a Moojenitoxina I (MjTX-I) de *Bothrops moojeni* e com a crotoxina de *Crotalus durissus terrificus*, bem como de suas subunidades isoladas, foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Roberto Morato Fernandez do Departamento de Física e Biofísica do Instituto de Biociências de Botucatu sob a supervisão do Prof. Dr. Cristiano Luís Pinto de Oliveira. As amostras de MjTX-I foram dissolvidas em água e em 20 mM Tris HCl pH 8,0 a 5 mg.ml^{-1} e as de crotoxina e de suas

subunidades isoladas apenas em 20 mM Tris HCl pH 8,0 na mesma concentração. Os experimentos foram realizados a 25°C Nanostar™-Bruker Laboratory localizado no Instituto de Física da Universidade de São Paulo. Os dados foram obtidos após uma exposição de 3600 s e foram analisados com o programa SUPERSAXS (Oliveira & Pedersen, dados não publicados). Os dados de SAXS obtidos foram comparados com as curvas de espalhamento da estrutura cristalográfica da MjTX-I calculadas pelo programa Crysol (Svergun *et al.*, 1995). A modelagem *ab initio* da estrutura à baixa resolução da MjTX-I obtida a partir dos dados de SAXS foi realizada utilizando-se o programa Gasbor (Svergun *et al.*, 2001).

Os experimentos de SAXS realizados com o *Crotalus neutralization factor* (CNF) e da CNF complexada à crotoxina B (CNF-CB) foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Mario de Oliveira Neto do Departamento de Física e Biofísica do Instituto de Biociências de Botucatu. As amostras de CNF e CNF-CB foram dissolvidas em 20 mM formato de amônio pH 6,5 e medidas nas concentrações de 1 e 5 mg.ml⁻¹. A obtenção da função de distribuição de distâncias ($p(r)$) das amostras medidas foram realizadas através do software GNOM (Svergun, 1992) e as medidas de raio de giro através da equação de Guinier. A estimativa da massa molecular das amostras de CNF e CNF-CB foi obtida através do programa SAXS MoW (Fischer *et al.*, 2010).

3.6 Medidas de espectroscopia de dicroísmo circular

Experimentos de dicroísmo circular no intervalo de comprimento de onda 190-260 nm foram realizados com o *Crotalus neutralization factor* (CNF) e com o CNF complexado à crotoxina B (CNF-CB) em um espectropolarímetro J-815 da Jasco Inc. As amostras foram diluídas em 10 mM formato de amônio pH 6,5 na concentração de 400 µg.ml⁻¹. As medidas foram realizadas em um cubeta de quartzo de 0,5 nm, utilizando um *scanning speed* de 100 nm/min; *bandwidth* de 1 nm; *step resolution* de 0,5 nm e a 20°C de temperatura na presença de

fluxo de nitrogênio gasoso. O espectro final corresponde à média de 20 acumulações, já subtraído da medida do tampão (branco) e normalizados através da transformação da unidade de miligraus para elipcidade residual média $[\theta]$ (degrees $\text{cm}^2\text{dmol}^{-1}\text{residue}^{-1}$). A deconvolução das curvas de CD foi realizada pelo algoritmo CONTINN (Sreerama & Woody, 2000).

A fim de avaliar a estabilidade térmica da CNF e do complexo CNF-CB foram realizados experimentos de dicroísmo circular em função do aumento da temperatura. Para esses experimentos, as amostras foram dissolvidas em 10 mM tampão fosfato pH 7,0 na concentração de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Os espectros foram obtidos no intervalo de 200-260 nm em uma cubeta de quartzo de 5 mm, a cada cinco graus, sendo a temperatura elevada a um grau por minuto e se aguardando cinco minutos em cada temperatura medida para a estabilização da amostra antes da medida. O espectro final corresponde a média de 5 espectros e normalizados através da transformação da unidade em miligraus para elipcidade residual média $[\theta]$ (degrees $\text{cm}^2\text{dmol}^{-1}\text{residue}^{-1}$). Por fim, com o intuito de avaliar os estágios de enovelamento da CNF e do complexo CNF-CB, os dados de $[\theta]$ obtidos a 200 nm, que indica o aparecimento de elementos desordenados, foram graficados em razão da temperatura. Em seguida, esses dados foram fitados no programa Origin (versão 8) como uma fita sigmoide onde o ponto de inflexão da curva indica o *Transition Melting* (T_M) das amostras.

3.7 Medidas de espectroscopia de fluorescência

As medidas de espectroscopia de fluorescência foram realizadas em um espectrofluorímetro *Hitachi F-7000* locado no Laboratório de Fotobiofísica do Departamento de Física da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, sob a coordenação do Prof. Dr. Amando S. Ito. Para os experimentos de fluorescência estática e anisotropia da crotoxina e suas subunidades isoladas, do CNF e do complexo CNF-CB, foi utilizada uma cubeta de caminho óptico de 2 mm e um *bandwidth* de 2 nm. Para os experimentos de fluorescência estática o comprimento de onda de excitação utilizado foi de 280 nm e o

comprimento de onda emitido foi detectado no intervalo de comprimento de onda 290-500 nm na velocidade de $1200 \text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$. Para os experimentos de anisotropia, o comprimento de onda de excitação utilizado foi de 280 nm e o comprimento de onda polarizado emitido foi detectado no intervalo de comprimento de onda 330-350 nm na velocidade de $240 \text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$. Para os experimentos de fluorescência estática todas as amostras possuíam a concentração de $40 \mu\text{M}$ e para os experimentos de anisotropia as amostras de crotoxina e de suas subunidades possuíam a concentração de $40 \mu\text{M}$ e as de CNF foram medidas nas concentrações de 72, 100 e $140 \mu\text{M}$

3.8 Estudos filogenéticos

Para os estudos filogenéticos da MjTX-I de *Bothrops moojeni*, as sequências homólogas de Lys49-PLA₂s de outras serpentes do gênero *Bothrops* foram selecionadas através da ferramenta BLAST (Altschul *et al.*, 1990). As sequências selecionadas foram alinhadas utilizando o programa AMAP v.2.0 (Schwartz & Pachter, 2007). A partir do alinhamento final foi construída a árvore filogenética utilizando inferência bayesiana pelo programa MrBayes v.3.1.1 (Huelsenbeck & Conquist, 2001). Duas cadeias de Markov-Monte Carlo de 500.000 gerações foram simuladas em quatro cadeias progressivas com trocas entre si, com um valor de fator temperatura de 0,2, desprezando-se as 2.500 árvores iniciais. A árvore filogenética e o tamanho dos seus ramos foi visualizada com o programa Mesquite v.2.72 (Maddison & Maddison, 2011).

3.9 Modelagem teórica computacional e simulações de dinâmica molecular

Neste trabalho, o programa *on-line* HHpred (Söding *et al.*, 2005), baseado em métodos de *threading* e disponibilizado pelo servidor do *Max-Planck Institute for Developmental Biology* (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>), foi utilizado para a construção do alinhamento entre a molécula *target* e a molécula *template*, que posteriormente foi transferido para o programa Modeller v.9.10 (Marti-Renom *et al.*, 2000) para a construção dos modelos

iniciais teóricos. Para a construção do modelo teórico do α BaltMIP foi utilizada cadeia A da estrutura cristalográfica da proteína D humana surfactante de pulmão (SP-D) (PDB ID 1PWB) por conta da similaridade estrutural do domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD *domain*). Para a obtenção do modelo trimérico, o monômero obtido após a simulação de dinâmica molecular foi alinhado estruturalmente com os três monômeros da SP-D e em seguida, foi realizado um experimento de *simulated annealing* no programa CNS v.1.1 (Brunger *et al.*, 1998). O modelo teórico do *Crotalus neutralization factor* (CNF) teve como modelo inicial a cadeia U da estrutura cristalográfica da uroquinase ativadora de plasminogênio humana (PDF ID 2FD6).

As simulações de dinâmica molecular foram executadas com o programa GROMACS v 4.5.3 (*Groningen Machine for Chemical Simulation*) (Berendsen *et al.*, 1995). O campo de força escolhido foi o GROMOS 96 53a6 (Oostenbrink *et al.*, 2005) ajustando-se o pH do sistema para 7,0, a temperatura para 298 K e a pressão para 1,0 bar, constantes. A configuração inicial do sistema foi gerada após dois processos de minimização de energia utilizando um algoritmo do tipo *steepest descent*, sendo o primeiro deles realizado com todos os átomos da proteína congelados e o segundo com restrição de posicionamento dos átomos da cadeia principal. Na etapa seguinte, 200 ps de dinâmica molecular foram calculados com restrição de posicionamento dos átomos da cadeia principal da proteína (método PRMD). Em seguida, outros dez nanosegundos foram executados para possibilitar a minimização de energia do modelo obtido.

3.10 Estudos funcionais

A avaliação funcional da complexação da PrTX-I de *B. pirajai* com os inibidores ácido caféico e ácido aristolóquico foi realizada pelo MsC. Fábio Florença Cardoso e a avaliação funcional da MjTX-I foi realizado pelo Dr. Walter L. G. Cavalcante, ambos no Laboratório da

Junção Neuromuscular do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu (UNESP) sob supervisão da Profa. Dra. Marcia Gallacci.

Para esta avaliação, foram utilizados camundongos Swiss (~25g), machos, adultos, fornecidos pelo Biotério Central da UNESP – Botucatu e alojados no biotério do referido Departamento. Os animais foram mantidos em gaiolas higienizadas regularmente, abastecidas com água e ração *ad libitum*, em ambiente com temperatura controlada (24 ± 2 °C) e ciclo claro-escuro (12-12 h). Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e exanguinado por secção dos grandes vasos cervicais. Após toracotomia ampla, a preparação do nervo frênico-musculo diafragma foi removida (Bulbring, 1997). Durante este período, a preparação foi perfundida intermitentemente com solução nutriente de Ringer (135 mM de cloreto de sódio; 15 mM de bicarbonato de sódio; 5 mM de cloreto de potássio; 2 mM de cloreto de magnésio; 1 mM de fosfato de sódio; 2 mM de cloreto de cálcio; 11 mM de dextrose anidra). A seguir, o hemidiafragma esquerdo foi cortado em formato triangular e montado verticalmente no sistema de cubas para órgão isolado (Tecnal, Modelo TE-051), contendo 15 ml da solução nutriente, constantemente borbulhada com carbogênio (95% O₂ e 5% CO₂) e mantida a 35°C (± 2 °C). O bordo costal diafragmático foi conectado a um suporte de vidro de formato “L”, e o centro tendíneo do musculo diafragma foi conectado a um transdutor de tensão isométrica (Grass Telefactor, Modelo FT03), o qual estava acoplado a um amplificador de sinal (Gould Systems). Os sinais foram registrados em um computador através de um sistema de aquisição de dados Summit ACQUIRE (Gould Systems) e posteriormente submetidos à análise utilizando o programa Summit DataViewer (Gould Systems). Para evocar as contrações musculares indiretas, a extremidade livre do nervo frênico foi aspirada por um eletrodo de platina —de sucção, que se encontrava acoplado a um estimulador elétrico (Grass Telefactor, Modelo S88). Um segundo eletrodo, constituído por um fio de platina enrolado em um suporte de vidro de formato “L”, serviu como eletrodo de referencial e consistiu no local em que o músculo foi

conectado. As contrações musculares foram evocadas indiretamente, por pulsos elétricos retangulares com duração de 0,5 ms, intensidade supramáxima e frequência de 0,2 Hz. As preparações foram mantidas a 35 °C (± 2 °C) e submetidas a um período de estabilização de 45 minutos, durante os quais houve renovação da solução nutriente a cada 15 minutos e estimulação elétrica na frequência de 0,2 Hz. Em seguida, foram registradas as contrações na ausência de qualquer substância durante 15 minutos. Subsequentemente, a proteína (MjTX-I/PrTX-I) (1 μ M), o composto vegetal (no caso dos ensaios com PrTX-I; nas proporções 1:1 e 1:5 massa/massa de proteína/inibidor) incubados previamente por 30 minutos em temperatura ambiente foram aplicadas à preparação. Em seguida, as contrações musculares indiretas foram registradas por um período de 90 minutos. Após a realização do estudo funcional da PrTX-I com os dois inibidores, fragmentos do músculo diafragma foram tratados com solução de Bouin e fixados em historresina. Subsequentemente, cortes transversais de 5 μ m de espessura foram obtidos em micrótomo e submetidos a coloração hematoxilina e eosina (coloração HE) para a avaliação da morfologia geral das fibras musculares. As preparações histológicas coradas com HE foram submetidas à análise semiquantitativa. Em cada músculo foram analisados três campos microscópicos diferentes. O número de fibras com lesão foi representado como porcentagem do número total de fibras (normais + lesadas) em cada campo. Este estudo foi realizado utilizando um sistema de análise de imagens computadorizado (Leica Germany, Qwin). Os resultados experimentais foram expressos como média e erro padrão da média (EPM). A análise estatística dos resultados foi realizada através do Teste t de Student (ao comparar duas amostras) ou da Análise de Variância (ao comparar mais de duas amostras). Neste último modo, a análise foi complementada pelo Teste de Tukey-Kramer (Snedecor & Cochran, 1989). Foi estabelecido o nível de significância de 5%. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu (Protocolo 033/05).

Capítulo 4
Crotoxina: potente neurotoxina isolada do veneno de
Crotalus durissus

A ação neurotóxica, principal característica do veneno crotálico, é fundamentalmente produzida pela crotoxina, que é o componente responsável pela alta toxicidade do veneno, representando até 60% do peso total do veneno bruto seco (Breithaupt, 1976). Além da crotoxina, outras neurotoxinas foram isoladas do veneno de *Crotalus durissus*, como a crotamina, a giroxina e a convulxina, cujos efeitos, caracterizados experimentalmente, não são identificados nas manifestações do envenenamento humano (Azevedo-Marques *et al.*, 2003).

A crotoxina é um complexo composto por uma associação não-covalente entre duas subunidades: uma ácida que é conhecida como crotoxina A, CA ou crotapotina (Aird *et al.*, 1985; 1990) e uma básica que é conhecida como crotoxina B ou CB (Hendon *et al.*, 1971; Aird *et al.*, 1986). A crotoxina B é uma fosfolipase A₂ neurotóxica e miotóxica com potente atividade de bloqueio da transmissão neuromuscular através de uma ação pré-sináptica inibindo a liberação de acetilcolina pelos impulsos nervosos, provocando paralisias motora e respiratória nos animais (Vital-Brazil *et al.*, 1971; Hawgood *et al.*, 1977; Faure *et al.*, 1993). Quando isoladas as duas subunidades, foi demonstrado que a CB possui uma ação tóxica e enzimática menor que a crotoxina e que a crotapotina não possui ação tóxica e nem atividade enzimática (Hendon *et al.*, 1971). Diversos experimentos mostraram que a CB se liga a diferentes receptores pré-sinápticos e que o complexo CA-CB deve se dissociar para a expressão da neurotoxicidade (Jeng *et al.*, 1987; Delot & Bon, 1993; Krizaj *et al.*, 1996). O complexo crotoxina se liga a receptores de proteína 48 kDa localizados na membrana pré-sináptica, formando o complexo ternário transitório, CA-CB-R48, seguido pela dissociação do complexo CA-CB e a liberação da subunidade CA (Faure *et al.*, 2003). Esse mecanismo de dissociação é essencial para a letalidade dessa toxina já que a ligação CA-CB abole a sua toxicidade (Hendon & Tu, 1979). Portanto, as subunidades CA e CB atuam de uma maneira sinérgica, já que a CA direciona a CB ao receptor localizado na junção neuromuscular (Jeng *et al.*, 1987; Delot & Bon, 1993;

Krizaj *et al.*, 1996), evita a formação de dímeros reativos de CB (Radvanyi & Bon, 1982) e diminui a absorção de CB pelos fosfolípidios de membrana (Hawgood & Bon, 1991).

De fato, a crotoxina de uma serpente individual é uma mistura de isoformas naturalmente ocorrentes cujo pI varia de 4,9 a 5,2 (Faure & Bon, 1987). No veneno da subespécie *Crotalus durissus terrificus* de uma única serpente foram encontradas 16 isoformas de crotoxina, resultado da associação randômica de diferentes isoformas de CA e CB. Quatro isoformas de CA (CA₁, CA₂, CA₃, CA₄) e quatro isoformas de CB (CBa₂, CB_b, CB_c, CB_d) foram purificadas e as quatro isoformas de CA e duas de CB (CBa₂ e CB_c) foram completamente sequenciadas (Faure *et al.*, 1991; 1993; 1994). As quatro isoformas de CA são compostos das cadeias polipeptídicas α , β e γ , ligadas por pontes dissulfeto e são derivadas pós-traducionalmente de um PLA₂-like precursor pro-CA, similar a uma fosfolipase A₂ do grupo IIA (Faure *et al.*, 1991). Já as isoformas de CB resultam da expressão de diferentes RNAs mensageiros presentes em um único indivíduo (Bouchier *et al.*, 1991).

A combinação destas múltiplas isoformas de CA e CB leva à formação de diferentes complexos de crotoxina que tem diferenças significativas em suas propriedades biológicas e farmacológicas (Faure *et al.*, 1993). Uma comparação quantitativa das propriedades da crotoxina revelou a existência de duas classes: classe I (formada pela CB_b, CB_c, CB_d e as isoformas de CA), que é altamente tóxica mas enzimaticamente menos ativa, e classe II (formada pela CBa₂ e as isoformas de CA) que é menos tóxica e mais enzimaticamente ativa (Faure *et al.*, 1993). As isoformas mais tóxicas de crotoxina bloqueiam a transmissão neuromuscular de preparações cervicis biventer de pintainhos que as isoformas menos tóxicas. Estas diferentes isoformas de crotoxina também afetam a estabilidade do complexo CA-CB. As isoformas da classe II formam complexos menos estáveis e que se dissociam rapidamente, enquanto que as isoformas da classe I formam complexos mais estáveis e se dissociam mais lentamente (Faure *et al.*, 1993). Finalmente, as diferenças na estrutura primária das diferentes

isoformas de CA não afeta a atividade tóxica da crotoxina, entretanto, a variação de poucos aminoácidos na estrutura primária das diferentes isoformas de CB modifica as propriedades tóxicas e farmacológicas da crotoxina (Faure *et al.*, 1991; 1993).

Recentemente, foi obtida a estrutura cristalográfica da crotoxina de *Crotalus durissus terrificus*, formado pela associação da CA₂-CB_b (Figura 13), onde são descritos os sítios de interação entre o complexo CA/CB (Figura 14) (Faure *et al.*, 2011). Além disso, é apontado que as diferenças na toxicidade e na estabilidade do complexo apresentadas pelas diferentes isoformas se dá por conta diferenças na posição do Trp70 (Faure *et al.*, 2011). No caso das isoformas da classe I (como é a estrutura do complexo CA₂-CB_b), o Trp31 e o Trp70 na subunidade CB_b estabelece ligações de hidrogênio com o Asp89 e Asp99 da cadeia β da CA₂, bloqueando o acesso ao sítio catalítico, justificando a formação de complexos mais estáveis, enzimaticamente menos ativos e que se dissociam mais lentamente. No caso das isoformas da classe II (como é um dos monômero da estrutura do dímero CB_{a2}-CB_c, que será comentado a seguir), um resíduo de serina na posição 1 (que é ocupada por uma histidina nas isoformas de classe I), provocaria mudanças na posição do Trp70, que na presença da subunidade CA deixaria o sítio ativo mais acessível e daria origem a um complexo menos estável (Faure *et al.*, 2011).

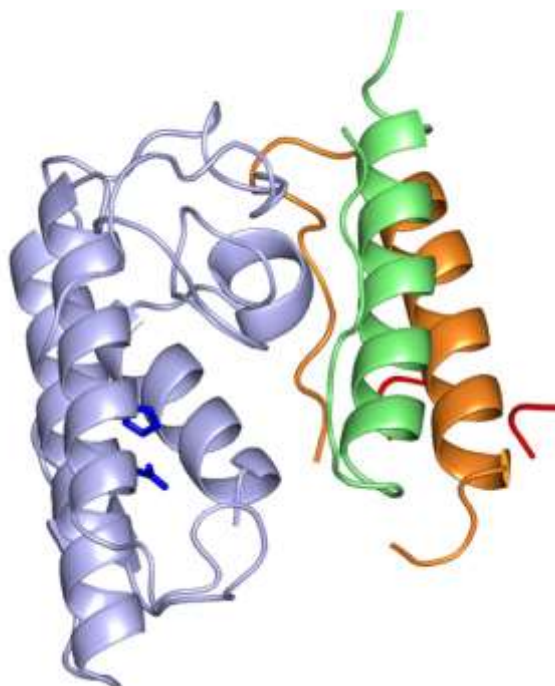


Figura 13: Representação em cartoon da estrutura da crotoxina de *Crotalus durissus terrificus* formada pelas subunidades CA2-CBb. A subunidade CBb é mostrada em azul e as cadeias α , β e γ da subunidade CA2 são mostradas em laranja, verde e vermelho, respectivamente. Adaptada de Faure et al. (2011).

CA2 α -chain		CBb												
		Helix A					Helix B					C-terminal		
		R1	L3	N6	K10	R14	K16	N17	A18	V19	P20	F21	M118	F119
N-terminal region	C27							3						
	Y28		2	12				13	6	12				
	C29							12		10				
	G30							11		5	3	2		
	A31										3	4		
Helix C	Q34				1	4	2					6		
	W36										2	2	4	3

CA2 β -chain		CBb											
		Helix B		Loop preceding Ca^{2+} -loop		Ca^{2+} -loop		Loop preceding β -wing		C-terminal region			
		V19	P20	A23	F24	W31	G32	K69	W70	F119	Y120	P121	S124
N-terminal region	G60											6	1
	E81											8	
	I82				13						2	3	3
preceding Helix D and Helix D	V83				7								
	E87					12	3	1					
	D88							1	10				
	C91								13				
	G92					8			4				
Helix D	I95					6			2				
	C96				3	24							
	D99	4		2	7	7							
	K100				8								
Helix D	A102	1											
	A103				2						11		
	F106	2	16								3		
C-terminal region	R107										11		
	M110										3		

Figura 14: Mapa dos resíduos que estabelecem contatos entre as subunidades CA2 e CBb observada na estrutura cristalográfica da crotoxina de *Crotalus durissus terrificus*. Adaptado de Faure et al. (2011).

Além disso, também já foi obtida a estrutura cristalográfica da CB de *Crotalus durissus terrificus*, isolada da subunidade CA (Marchi Salvador *et al.*, 2008). Essa estrutura apresenta 4 monômeros na unidade assimétrica, e é formada por dois dímeros resultado da associação entre as isoformas CB_{a2}-CB_c (Figura 15). A presença de dímeros e tetrâmeros também foi observada em solução, através da técnica de DLS, onde concentrações de CB a 1 mg.ml⁻¹ e 5 mg.ml⁻¹ resultaram em raio hidrodinâmicos de 2.7 nm (~ 34kDa) e 3.2 nm (~52 kDa), respectivamente, considerando que a CB possui 14 kDa, como é típico das fosfolipases A₂ do grupo IIA. Interessantemente, o dímero é formado por duas isoformas de CB que pertencem à classes diferentes de crotoxina (CB_c pertence à classe I e CB_{a2} pertence à classe II) e é estabilizado por uma ponte salina formada pelos resíduos Ser1 da isoforma CB_{a2} e Glu92 da isoforma CB_c. (Figura 16) (Marchi-Salvador *et al.*, 2008).

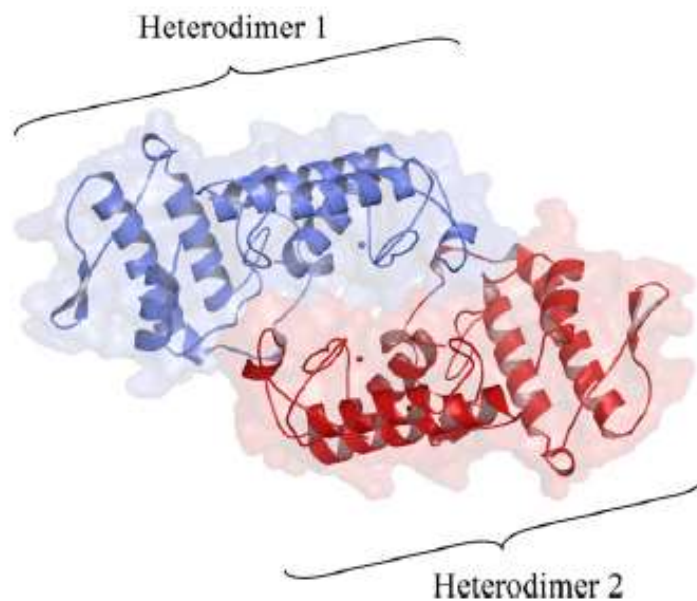


Figura 15: Representação em cartoon da estrutura cristalográfica de CB de *Crotalus durissus terrificus*, sendo a isoforma CB_{a2} representado em azul e a isoforma CB_c em vermelho. Adaptado de Marchi-Salvador *et al.* (2008).

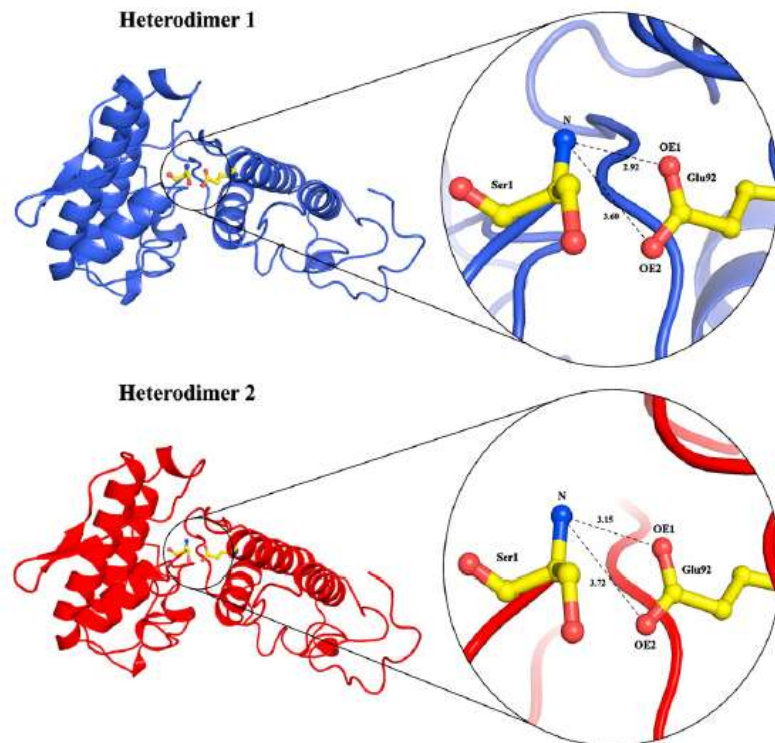


Figura 16: Pontes salinas formadas entre a Ser1 (exclusiva da isoforma CBa2) e a Glu92 (exclusivo das isoformas da classe II) que são responsáveis pela estabilização do dímero CBa2-CBc. Adaptado de Marchi-Salvador et al. (2008).

Apesar desses estudos, como podemos ver, ainda restam dúvidas sobre qual a conformação oligomérica da crotoxina bem como de suas subunidades isoladas. Além disso, o sítio exato responsável pela expressão da atividade neurotóxica permanece desconhecido (Sampaio *et al.*, 2010). Por conta disto, neste trabalho, apresentaremos nas próximas seções dados que podem contribuir no entendimento destas questões.

4.1 Resultados e discussão

4.1.1 Cristalização da crotoxina B de *Crotalus durissus collilineatus* nativa e complexada com inibidores vegetais

Os cristais da crotoxina B de *Crotalus durissus collilineatus* (Figura 17) pertencem ao grupo espacial tetragonal $P4_32_12$ com parâmetros de cela unitária $a = b = 84,86 \text{ \AA}$, $c = 65,67 \text{ \AA}$. O

conjunto de dados possui 93.6 % de completudeza a 2,2 Å, com um R_{merge} de 10,3 % (Tabela 02).

Cálculos de coeficiente de Matthews indicaram a presença de dois monômeros na unidade assimétrica. Após o refinamento da estrutura (Figura 18), ela apresentou valores de R_{cryst} e R_{free} e estequiometria dentro da média comparada com outras estruturas refinadas a esta resolução (Tabela 03).



Figura 17: Cristais da crotoxina B de *Crotalus durissus collilineatus*.

Tabela 2: Estatísticas de coleta e processamento de dados da crotoxina B de *Crotalus durissus collilineatus*

Números entre parênteses representam a faixa de mais alta resolução.

Cela Unitária (Å)	a = b = 84,56, c = 65,67
Grupo espacial	P4 ₃ 2 ₁ 2
Resolução (Å)	50-2,2 (2,3-2,2)
Reflexões únicas	12135 (1509)
Completeza(%)	92,2 (93,6)
R_{merge}^a	10,3 (53,7)
Fonte de radiação	Radiação Síncroton (Linha MX2, LNLS)
Temperatura da coleta de dados (K)	100
I/σ(I) médio	10,2 (1,97)
Redundância	2,0 (2,0)
Coefficiente de Matthews V_M (Å ³ Da ⁻¹)	2,11
Monômeros na unidade assimétrica	2
Conteúdo de solvente (%)	41,8

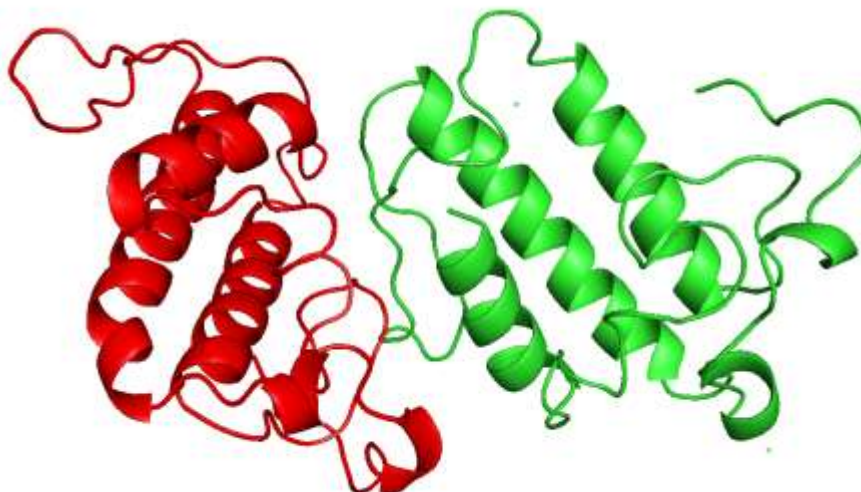
^a $R_{\text{merge}} = \sum hkl (\sum_i (|I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle|)) / \sum hkl_i \langle I_{hkl} \rangle$, onde $I_{hkl,i}$ é a intensidade de uma medida individual da reflexão com os índices de Miller h, k and l, e $\langle I_{hkl} \rangle$ é a intensidade média de cada reflexão. Calculado para $I > -3\sigma(I)$. Dados processados pelo programa *HKL 2000* (Otwinowski & Minor, 1997).

Tabela 3: Estatísticas finais do refinamento da crotoxina B de *Crotalus durissus colillineatus*

Números entre parênteses representam a faixa de mais alta resolução.

Resolução (Å)	50-2,2 (2,3-2,2)
Reflexões únicas	12135 (1509)
Completeza(%)	92,2 (93,6)
$R_{\text{cryst}}^{\text{a}}$	25,58
$R_{\text{free}}^{\text{b}}$	21,94
Número de átomos não-hidrogênio	
Proteína	1970
Água	128
Cloro	2
Valor médio de Fator de Temperatura (Å ²) ^c	36,85
Gráfico de Ramachandran (%) ^d	
Resíduos nas regiões mais favoráveis	92,5
Resíduos nas regiões permitidas	5,8
Resíduos nas regiões não permitidas	1,7

^a $R_{\text{cryst}} = \sum hkl (||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}||) / |F_{\text{obs}}|$, onde $|F_{\text{obs}}|$ e $|F_{\text{calc}}|$ são as amplitudes dos fatores de estrutura observados e calculados. ^b R_{free} é equivalente ao R_{cryst} , mas calculado com base em 5% do total de obtidas. ^c Calculado pelo programa REFMAC [Murshudov *et al.*, 1997]. ^d Calculado pelo programa Rampage [Lovell *et al.*, 2003].

**Figura 18: Representação em cartoon da estrutura final da crotoxina B de *Crotalus durissus colillineatus*.**

Atualmente, com esta estrutura finalizada, está sendo possível realizar comparações estruturais dessa proteína com a crotoxina B de *Crotalus durissus terrificus*, com o complexo crotoxina recentemente publicado (Marchi-Salvador *et al.*, 2008), bem como com neutoroxinas de venenos de diversas serpentes a fim de se obter maiores informações a respeito da relação estrutura-função destas proteínas. Em breve, um artigo relatando as informações estruturais obtidas com estes estudos será redigido e submetido a uma revista internacional.

Paralelamente, houve inúmeras tentativas de se co-cristalizar a crotoxina B de *Crotalus durissus colillineatus* com diferentes inibidores vegetais, utilizando diversos quites comerciais de soluções de cristalização. Esses inibidores são derivados de compostos encontrados em plantas medicinais utilizadas pela medicina popular no tratamento antiofídico (Mors *et al.*, 2000; Soares *et al.*, 2005). Algumas tentativas de cristalização a partir da técnica de *microseeding* utilizando cristais da própria proteína resultaram em alguns cristais que ao serem submetidos à difração de raios X não difrataram ou eram cristais de sal. Novas tentativas vêm sendo realizadas, na esperança de no futuro se conseguir obter estruturas cristalográficas dessa proteína com esses inibidores. Além disso, também foram realizadas tentativas de co-cristalização desses inibidores com a crotoxina B de *Crotalus durissus terrificus*, mas sem sucesso. Atualmente, novas tentativas de co-cristalização vêm sendo realizadas com o intuito de se obter cristais adequados para a difração de raios X

4.1.2 Expressão heteróloga e experimentos de mutação sítio dirigida com a crotoxina B de *Crotalus durissus terrificus*

Apenas bactérias *E. coli* da linhagem BL21(DE3) transformadas com o pET-28a(+) contendo a isoforma CBa₂ da crotoxina B de *Crotalus durissus terrificus* foram capazes de expressar esta proteína, como podemos atestar no gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15% que mostra a sua expressão em três colônias testadas (Fig. 19). Para avaliar a solubilidade da

isoforma expressa, foram testados 6 diferentes tampões e nenhum foi capaz de fazer com que se obtivesse a proteína de maneira solúvel.

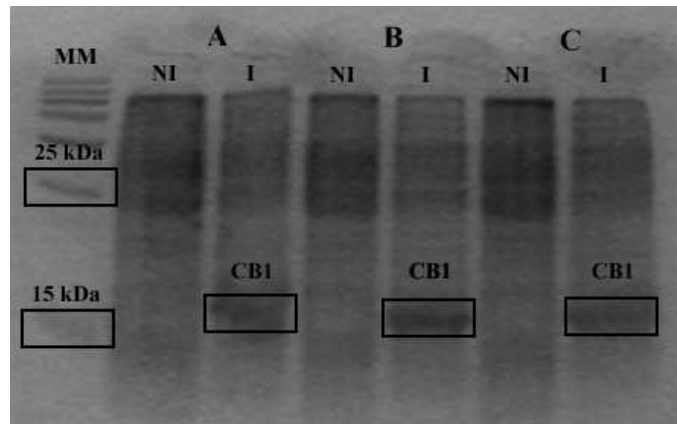


Figura 19: Expressão heteróloga em pequena escala da crotoxina B de *Crotalus durissus terrificus* verificada por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15%. *MM*: Marcador Molecular; *A, B, C*: Três diferentes colônias de bactérias previamente selecionadas; *NI*: Colônia que não induzida a expressar a proteína de interesse; *I*: Colônia induzida a expressar a proteína de interesse pela adição de IPTG 100 mM.

Em seguida, a expressão desta isoforma foi repetida em larga escala (500 ml de cultura), obtendo-se os mesmos resultados, tendo a proteína expressa dentro de corpos de inclusão. A expressão da proteína em larga também foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15% e pela técnica de *western blotting* (Figura 20).

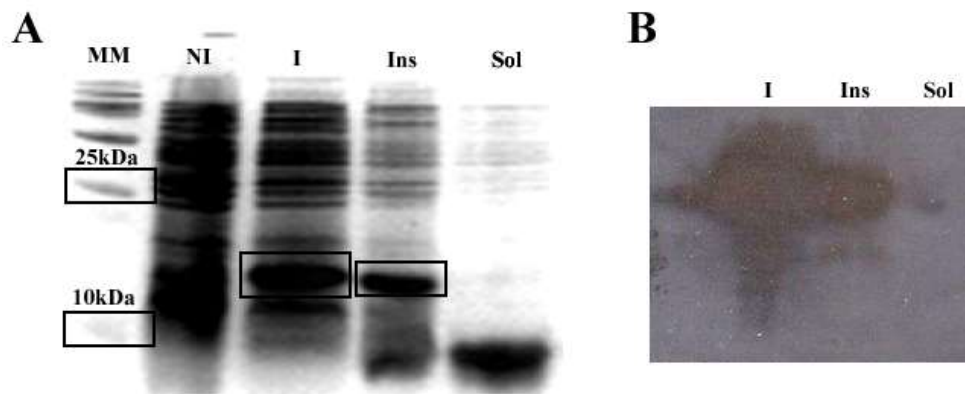


Figura 20: Expressão heteróloga em larga escala da crotoxina B de *Crotalus durissus terrificus*. (A). Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15%. (B) Western blotting. *MM*: Marcador Molecular; *NI*: Colônia que não induzida a expressar a proteína de interesse; *I*: Colônia induzida a expressar a proteína de interesse pela adição de IPTG 100 mM; *Ins*: Porção insolúvel após a lise da membrana células das bactérias; *Sol*: Porção solúvel após a lise da membrana células das bactérias.

Após a lise por sonicação, a porção solúvel foi descartada e a insolúvel ressuspensa em 8 M uréia, 20 mM Tris HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 1 mM β -mercaptoetanol. O extrato celular então, foi então aplicado a uma coluna de afinidade HisTrapTMHP (GE Healthcare) contendo

5,0 ml de resina níquel-agarose, acoplada a um cromatógrafo (AKTA Purifier – GE Healthcare) que foi submetida a um gradiente linear contínuo de 10 a 500 mM de Imidazol para a eluição da proteína de interesse. Foram obtidas frações contendo a CBa₂ da crotoxina B de *Crotalus durissus terrificus* pura a partir da concentração de 250 mM de Imidazol no gradiente, como podemos atestar no gel de poliacrilamida 15% (Fig. 21). Essas frações também foram verificadas pela técnica de *western blotting* que revelou que realmente aquelas frações continham a proteína de interesse purificada. Atualmente, experimentos de *refolding* vêm sendo conduzidos com algum sucesso e em breve, poderemos verificar se a neurotoxicidade induzida da crotoxina B recombinante é similar à da crotoxina B isolada diretamente do veneno bruto através de registros da contração muscular e medidas eletrofisiológicas na junção neuromuscular. Dessa maneira, poderão ser experimentos de mutação sítio-dirigida. Além disso, vêm se realizando os mesmos experimentos de expressão e purificação da isoforma CBc da crotoxina B de *Crotalus durissus terrificus*.

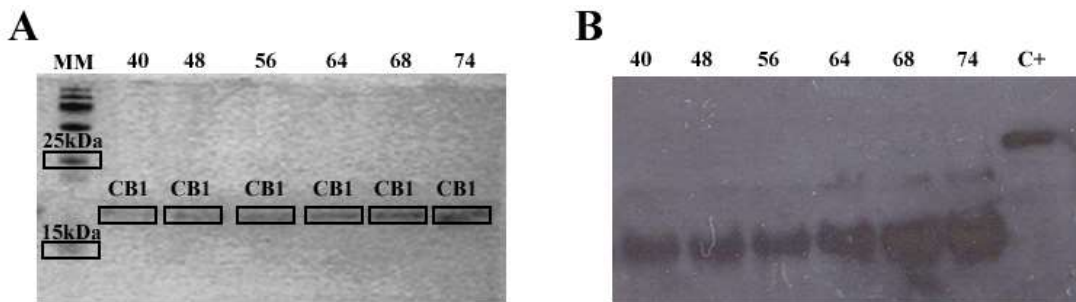


Figura 21: Purificação por cromatografia de afinidade da isoforma 1 da crotoxina B de *Crotalus durissus terrificus*. (A) Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15%; (B): *Western blotting*. MM: Marcador molecular; 40, 48, 56, 64, 68, 74: Frações eluídas partir do gradiente linear de imidazol, C+: Controle positivo para o *western blotting*

Os experimentos de mutação sítio dirigida serão realizados utilizando o quite de mutação QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis (Stratagene). Com base em neurotoxinas de serpentes asiáticas (Priyateli *et al.*, 2008) foram escolhidos oito aminoácidos de cada isoforma que serão mutados para alanina, com o intuito de se avaliar a sua função na atividade da proteína já que a alanina possui uma cadeia lateral muito curta e sem nenhuma carga. Todos

os *primers* carregados com a mutação desejada já foram desenhados, solicitados à empresa Amershan Biosciences e já se encontram à nossa disposição.

4.1.3. Experimentos de raios X à baixo ângulo e espectroscopia de fluorescência

Os dados de espalhamento de raios X e a função de distribuição de distâncias, $p(r)$, obtida após o uso da transformada inversa de Fourier nas curvas de espalhamento da crotoxina A (CA), crotoxina B (CB) e o complexo crotoxina são mostradas na Figura 22.

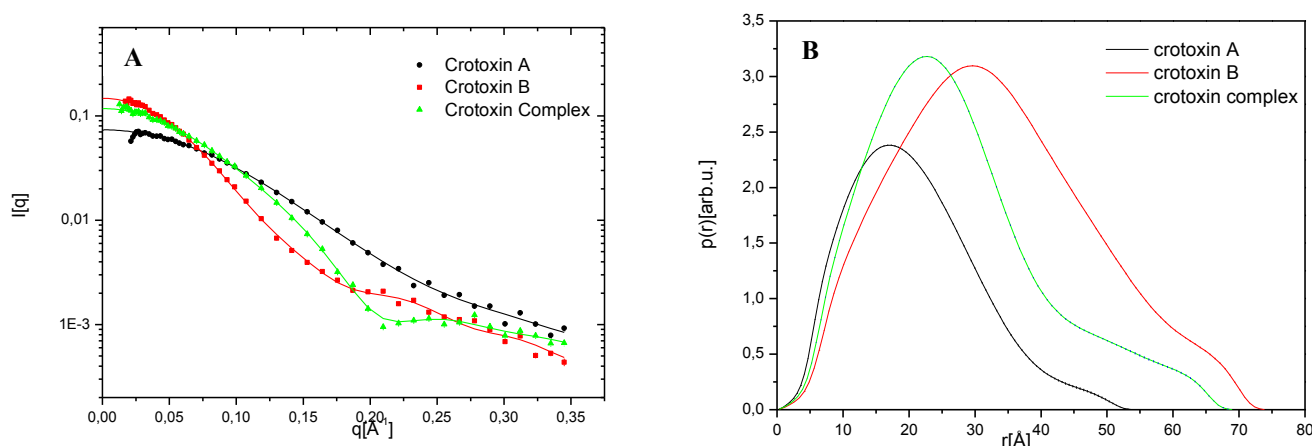


Figura 22: (A) Curvas de espalhamento de raios X à baixo ângulo das amostras de crotoxina (em verde), crotoxina A (CA; em preto) e crotoxina B (CB; em vermelho). (B) Função de distribuição de distâncias, $p(r)$, das amostras de crotoxina (em verde), crotoxina A (CA; em preto) e crotoxina B (CB; em vermelho).

A função de distribuição $p(r)$ indica uma dimensão máxima de $\sim 55 \text{\AA}$ para a crotoxina A, $\sim 75 \text{\AA}$ para crotoxina B e $\sim 70 \text{\AA}$ para o complexo crotoxina. O raio de giro (R_g) obtido pela CA foi de $16.35 \pm 0.05 \text{\AA}$ e uma massa molecular de 22 ± 4 kDa. Já o R_g obtido por CB foi de $25.69 \pm 0.03 \text{\AA}$ e uma massa molecular de 42 ± 8 kDa. Por fim, o complexo crotoxina apresentou um R_g de $21.37 \pm 0.05 \text{\AA}$ e uma massa molecular de 35 ± 7 kDa. Esses dados mostram que: i) a CA isolada pode formar oligômero em solução, provavelmente numa conformação trimérica, já que sua massa avaliada por gel de eletroforese em condições desnaturantes é de 8 kDa (Bouchier *et al.*, 1991); ii) CB isolada também pode formar oligômeros em solução, como previamente observado por Marchi-Salvador *et al.* (2008); iii) a crotoxina pode ser formada por mais que uma única molécula de CA e uma de CB, diferentemente do proposto por Faure *et al.*

(2011), já que o complexo obtido por ela teria uma massa de ~ 22 kDa e foi obtido por SAXS um complexo de 35 ± 7 kDa.

Com base nisso, utilizando o software Crysol (Svergun *et al.*, 1995) foi verificado se as estruturas cristalográficas da crotoxina e da crotoxina B teriam um bom ajuste sobre as curvas de SAXS obtidas (Figura 23).

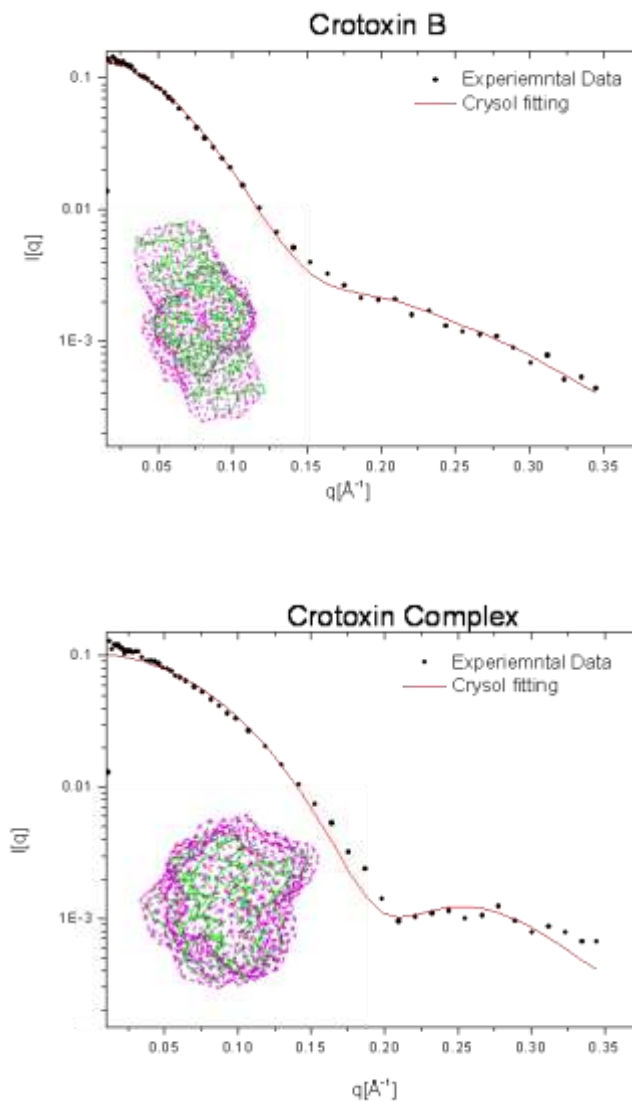


Figura 23: Sobreposição das curvas obtidas a partir dos dados de SAXS (experimental data) sobre as curvas teóricas de SAXS das estruturas cristalográficas (Crysol fitting) utilizando o software Crysol. Abaixo da curva, a comparação dos envelopes protéicos calculados a partir da curva de SAXS (em rosa) e a partir da estrutura cristalográfica (em verde).

A análise da figura 23 mostra que uma boa similaridade entre a curva de SAXS obtida experimentalmente da crotoxina B e a geradas pelo Crysol a partir da estrutura cristalográfica obtida por Marchi-Salvador *et al.* (2008) (PDB ID 2OQG) com quatro monômeros na unidade

assimétrica. Portanto, esses dados indicam que após a dissociação de CA, as moléculas de CB podem oligomerizar-se, formando tetrâmeros com relevância biológica. Já a curva de curva de SAXS obtida experimentalmente do complexo crotoxina não apresenta similaridade tão boa com a calculada pelo Crysol a partir da estrutura cristalográfica obtida por Faure *et al.* (2011) (PDB ID 3R0L), indicando diferenças entre a estrutura observada em solução e a obtida por cristalografia. Esses dados, reforçam que o complexo crotoxina pode ser formado por mais de uma única molécula de CA e uma de CB. Esses dados ainda se encontram em fase final de análise que quando finalizada gerará um grande número de novas informações a respeito dessa potente neurotoxina.

A fim de entender melhor a interação entre CA e CB para a formação da crotoxina, realizou-se experimentos de intensidade de fluorescência emitida pelos triptofanos de CA, CB e da crotoxina (Figura 24).

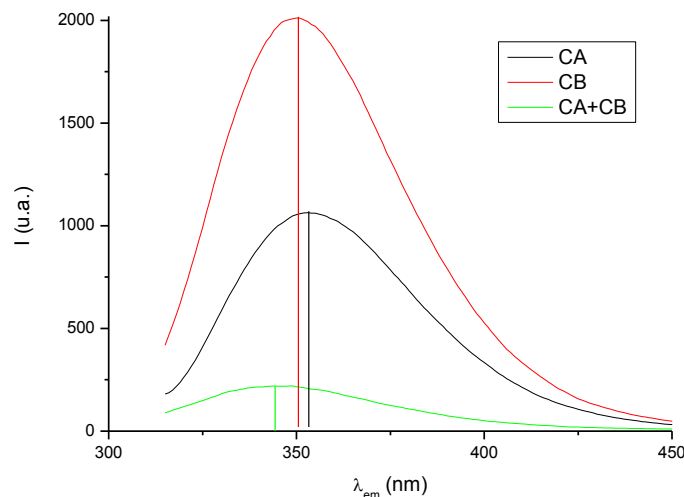


Figura 24: Intensidade de fluorescência emitida pelos resíduos de triptofano da crotoxina (verde), bem como de suas subunidades isoladas CA (preto) e CB (vermelho).

Como se pode ver na figura 24, o sinal de fluorescência emitida pelos triptofanos é maior nas subunidades isoladas do que no complexo crotoxina. Além disso, no crotoxina há um deslocamento do máximo de fluorescência emitida para um comprimento de onda menor do

que das subunidades isoladas, indicando uma mudança no ambiente intermolecular dos resíduos de triptofano. A CA possui apenas um triptofano (W35) e a CB possui três (W31; W70; W90). Na estrutura da crotoxina (Figura 25), vemos que o resíduo de triptofano de CA (W35) e dois de CB (W31 e W70) encontram-se na interface CA/CB, enquanto que o W90 de CB está exposto ao solvente.

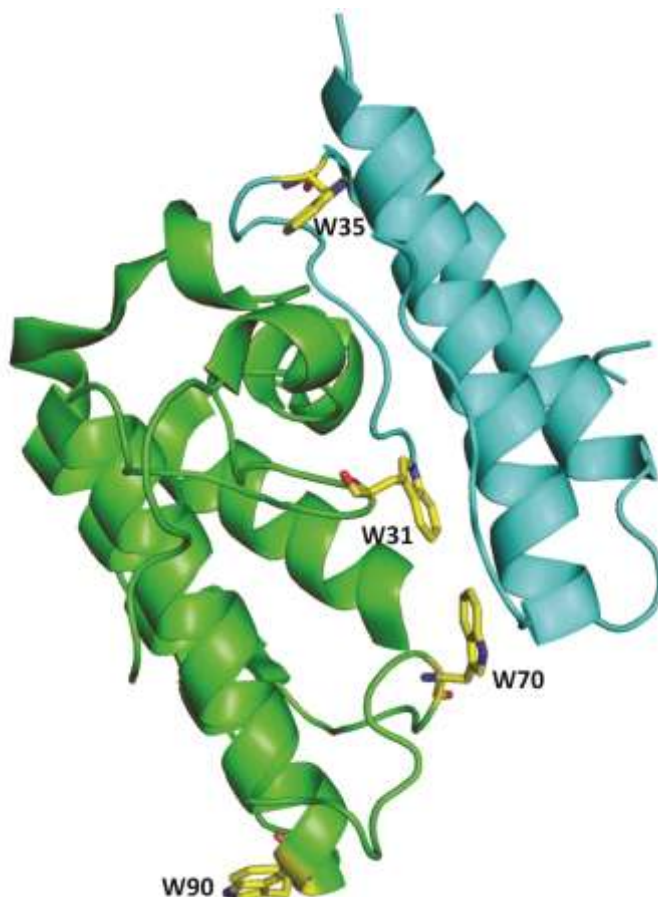


Figura 25: Representação em *cartoon* da estrutura cristalográfica da crotoxina (PDB ID 3R0L), onde a CA está representada em azul ciano e a CB em verde. Os resíduos de triptofano estão representados em *sticks*.

Na estrutura tetramérica da CB, os W31 e W70 encontram-se no interior da molécula, enquanto o W90 também se encontra exposto ao solvente (Figura 26).

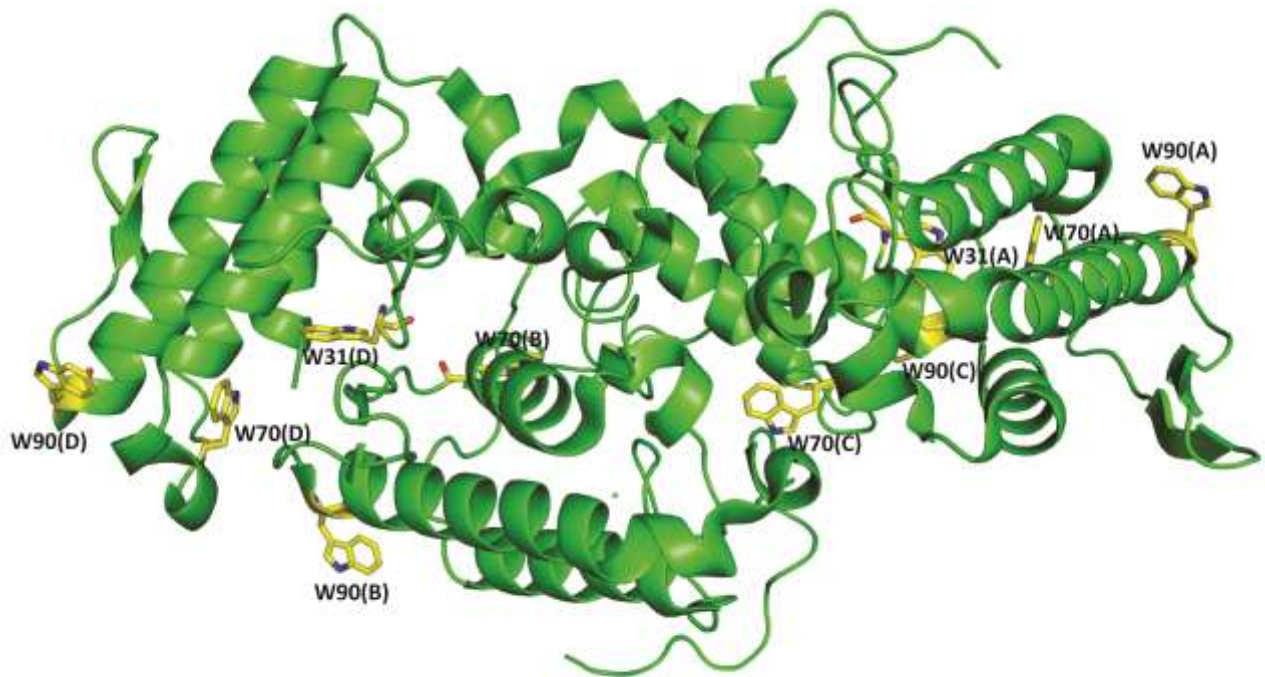


Figura 26: Representação em *cartoon* da estrutura cristalográfica tetramérica da CB de *Crotalus durissus terrificus* (PDB ID 2QOG). Os resíduos de triptofano estão representados em *sticks*.

A tabela 4 mostra a área de acessibilidade ao solvente dos resíduos de triptofano da estrutura da crotoxina e CB quando complexados (CA/CB e o tetrâmero CB) e quando os monômeros/subunidades são isolados. Nesta tabela, pode-se observar que no caso da estrutura cristalográfica da crotoxina, a complexação de CA com CB para a formação da crotoxina, há uma diminuição da área de acessibilidade ao solvente dos resíduos de triptofano de ambas as subunidades, com exceção do W90, que como se vê na estrutura cristalográfica do complexo crotoxina, continua exposta ao solvente (Figura 25). No caso da formação de tetrâmeros da molécula de CB, ocorre o mesmo fenômeno. A comparação da área de acessibilidade ao solvente dos resíduos de triptofano entre a CB em sua forma monomérica e tetramérica, mostra que a formação do tetrâmero reduz a área de acessibilidade do solvente dos triptofano, com exceção também do W90, que permanece exposto ao solvente.

Tabela 4: Cálculo da área de acessibilidade ao solvente dos resíduos de triptofano (\AA^2) das estruturas cristalográfica da crotoxina (PDB ID 3R0L) e de CB (PDB ID 2QOG) e das subunidades (no caso da crotoxina) ou monômeros (no caso de CB) isolados. Esses valores de área foram calculados pelo programa AreaImol do pacote de programas CCP4i (Potterton *et al.*, 2004).

				Estrutura cristalográfica	Monômero/subunidade isolado
Crotoxina (PDB ID 3R0L)	CA	W35	19,4	148,7	
		W31	33,0	147,4	
	CB	W70	43,1	122,3	
		W90	131,6	131,6	
Crotoxina B (PDB ID 2QOG)	Cadeia A	W31	28,4	116,0	
		W70	30,5	81,7	
		W90	129,3	129,3	
	Cadeia B	W31*	83,7	84,1	
		W70	44,9	132,0	
		W90	118,9	118,9	
	Cadeia C	W31*	84,4	86,7	
		W70	36,3	138,1	
		W90	135,4	135,4	
	Cadeia D	W31	20,4	103,1	
		W70	22,7	72,3	
		W90	125,0	125,0	

*Resíduos que não possuem densidade eletrônica para a sua cadeia lateral.

Desse modo, os dados obtidos por fluorescência reforçam os dados obtidos por SAXS que apontam que a relação CA/CB deve ser diferente de 1:1, provavelmente 2:1. A análise dos dados de espectroscopia de fluorescência mostram uma severa redução da exposição dos resíduos de triptofano na formação do complexo crotoxina em relação à CB tetramérica que possui alta emissão de fluorescência desses resíduos. Entretanto, a análise da área da acessibilidade ao solvente dos triptofanos das estruturas cristalográficas da crotoxina e da CB mostram resultados semelhantes, onde o W90 está exposto ao solvente em ambas as estruturas. Dessa forma, a(s) outra(s) moléculas de CA devem se ligar na região do W90 da molécula de

CB, justificando assim a grande redução da emissão de fluorescência da crotoxina em relação às subunidades isoladas.

O deslocamento para a esquerda do máximo de fluorescência emitida pelos triptofanos no complexo crotoxina em relação à crotoxina B (Figura 24), indica mudanças no ambiente intermolecular dos resíduos de triptofano após a complexação da crotoxina B com a crotoxina A. Analisando as estruturas cristalográficas do complexo crotoxina (PDB ID 3R0L) e da crotoxina B (PDB ID 2QOG), essa mudança no ambiente dos triptofanos é observado apenas no W31. Não há mudança no ambiente do W70 e não é possível realizar essa análise para o W90 já que ele está exposto ao solvente em ambas as estruturas cristalográficas. Com relação ao W31, na estrutura da crotoxina ele se encontra num ambiente com um menor número de moléculas de água e realizando um número maior de interações hidrofóbicas do que os resíduos W31 dos monômeros A e D da estrutura de CB (Figura 27) (não há densidade eletrônica para a cadeia lateral desse resíduo nos monômeros B e C, impossibilitando esta análise).

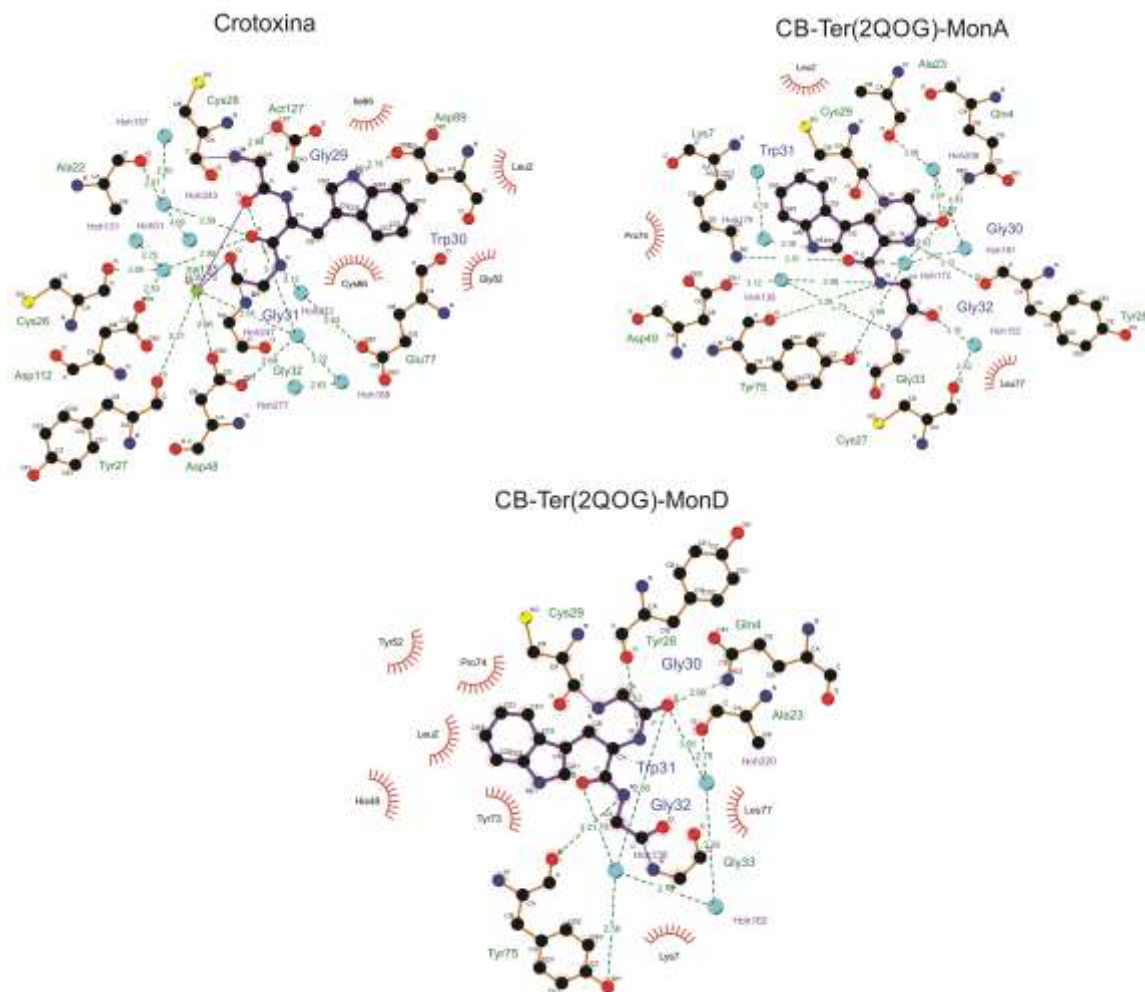


Figura 27: Diagrama das interações hidrofóbicas estabelecidas (representadas pelas pestanas vermelhas) pelo W31 na estrutura cristalográfica da crotoxina (PDB ID 3R0L) e nos monômeros A e D das estrutura cristalográfica de CB (PDB ID 2QOG). As ligações de hidrogênio do W31 com moléculas de água também estão representadas (linhas tracejadas em azul, distância em Å). Figura gerada pelo programa Dimplot (Wallace *et al.*, 1996).

Com o intuito de se verificar o tamanho da crotoxina e de suas subunidades isoladas, foram realizados experimentos de anisotropia de fluorescência a partir da fluorescência emitidas pelos triptofanos (Figura 28)

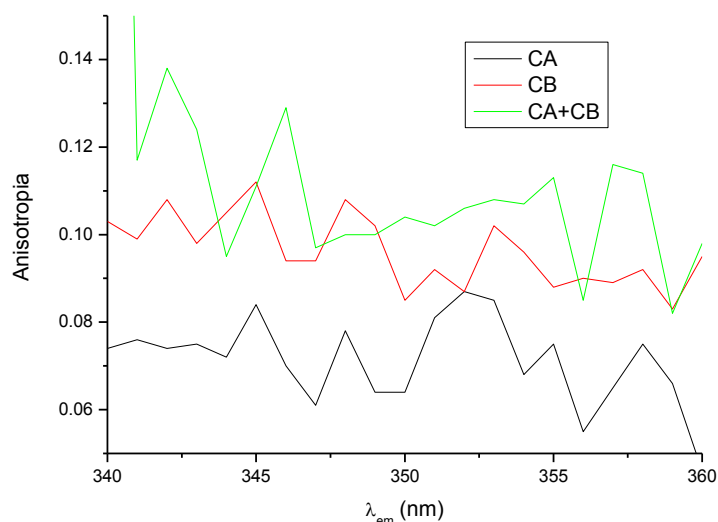


Figura 28: Anisotropia de fluorescência dos resíduos de triptofano da crotoxina (verde), CB (vermelho) e CA (preto).

A figura 28 nos mostra que a CA apresenta um valor médio de anisotropia de 0,074 e de 0,0962 e 0,11 para CB e crotoxina, respectivamente. Assim, como no SAXS, a anisotropia de fluorescência mostra valores semelhantes da crotoxina e CB são bastante similares, indicando tamanhos similares dessas duas proteínas. Como o tetrâmero de CB é observado em solução através das técnicas de SAXS e DLS, esses resultados indicam que a crotoxina em solução é maior do que a obtida por cristalografia por Faure *et al.* (2011), sugerindo, mais uma vez, uma relação CA/CB maior do que 1:1.

A comparação da estrutura cristalográfica da crotoxina B de *Crotalus durissus colillineatus* (discutida no item 4.1.1), com a CB de *C.d. terrificus* mostra que a CB de *C. d. colillineatus* apresenta apenas dois monômeros na unidade assimétrica, enquanto que a CB de *C. d. terrificus* apresenta quatro monômeros. Dessa maneira, a estrutura dimérica (de *C. d. colillineatus*) mostra que além do W90, o W70, também apresenta-se exposto ao solvente (Figura 29) e conseqüentemente, com maiores valores de área de acessibilidade ao solvente do que o tetrâmero formado pela CB de *C.d. terrificus* (Tabela 5). Entretanto, é possível dímero possa ser um artefato de cristalização e a estrutura em solução ser também tetramérica. Quando o tetrâmero de CB de *C.d. terrificus* é separado em dímeros (A/C; B/D), o W70 também se

encontra exposto ao solvente em ambos os dímeros e, conseqüentemente, com maiores valores de área de acessibilidade ao solvente.

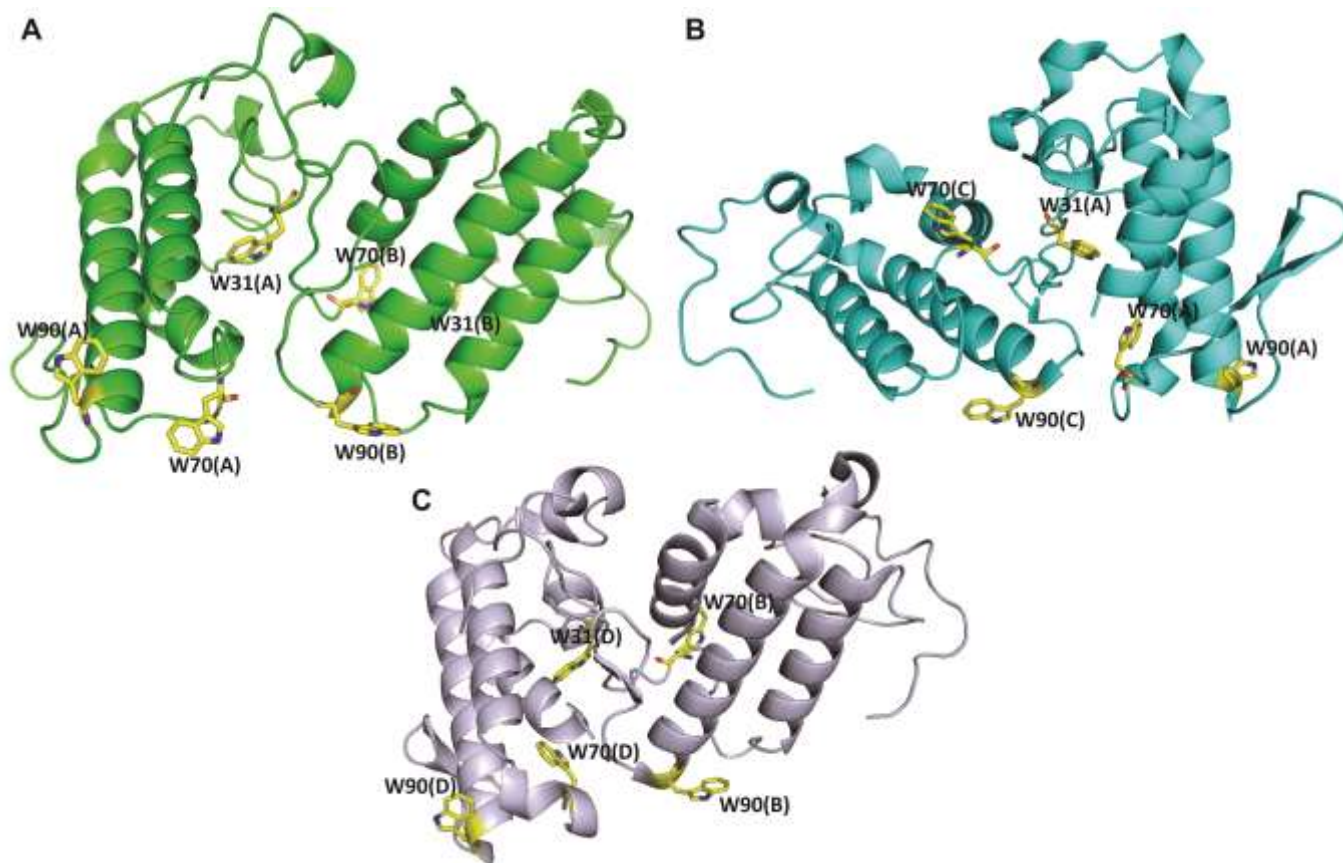


Figura 29: Representação em cartoon da estrutura cristalográfica da (A) CB de *Crotalus durissus coliligneatus*; (B) dímero A/C da estrutura cristalográfica da CB de *Crotalus durissus terrificus* (PDB ID 2QOG); (C) dímero B/D da estrutura cristalográfica da CB de *Crotalus durissus terrificus* (PDB ID 2QOG). Os resíduos de triptofano estão representados em *sticks*.

Tabela 5: Cálculo da área de acessibilidade ao solvente dos resíduos de triptofano (\AA^2) das estruturas cristalográfica da CB de *Crotalus durissus colillineatus*, dos dímeros que compõem a estrutura cristalográfica da CB de *Crotalus durissus terrificus* (PDB ID 2QOG) e dos monômeros isolados. Esses valores de área foram calculados pelo programa Arealmol do pacote de programas CCP4i (Potterton *et al.*, 2004).

				Estrutura dimérica	Monômero isolado	
Crotoxina B de <i>C. d. colillineatus</i>	Dímero A/B	Cadeia A	W31	24,4	108,7	
			W70	109,4	128,8	
			W90	161,8	161,8	
	Dímero A/B	Cadeia B	W31	221,3	224,0	
			W70	106,1	120,7	
			W90	132,0	132,0	
	Crotoxina B (PDB ID 2QOG)	Dímero A/C	Cadeia A	W31	28,4	116,0
				W70	30,5	81,7
				W90	129,3	129,3
Dímero B/D		Cadeia C	W31*	86,7	86,7	
			W70	138,1	138,1	
			W90	135,4	135,4	
		Cadeia B	W31*	84,1	84,1	
			W70	132,0	132,0	
			W90	118,9	118,9	
Cadeia D	W31	20,4	103,1			
	W70	22,7	72,3			
	W90	125,0	125,0			

*Resíduos que não possuem densidade eletrônica para a sua cadeia lateral.

Com o intuito de se ter maior clareza se o dímero de CB de *C. d. colillineatus* é realmente um artefato de cristalização foram realizadas experimentos de fluorescência estática e anisotropia com esta proteína (Figura 30). De fato, o perfil de fluorescência estática e os valores de anisotropia da CB de *C. d. terrificus* e *C. d. colillineatus* são bastante similares (valores médios de anisotropia: 0,0962 e 0,0992, respectivamente), indicando, portanto, que essas proteínas devem ter a mesma conformação em solução. Como indicado por SAXS e DLS e pela própria estrutura cristalográfica, a CB de *C. d. terrificus* possui uma conformação tetramérica, indicando, portanto, que essa característica deve ser também observada na CB de *C. d. colillineatus* e que o dímero observado em sua unidade assimétrica é um artefato cristalográfico.

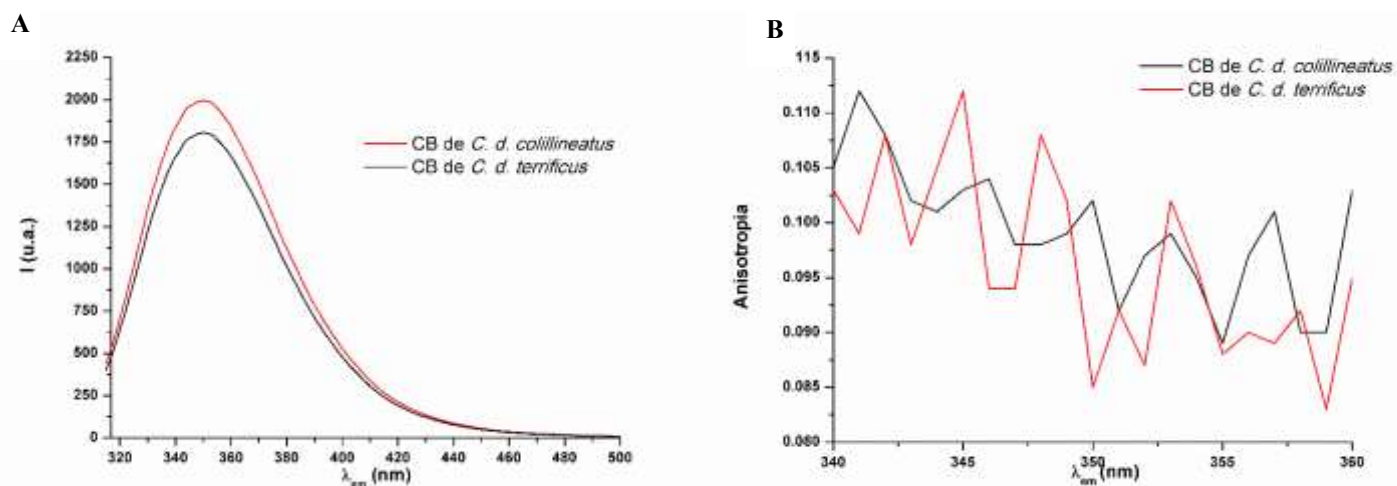


Figura 30: Intensidade de fluorescência emitida pelos resíduos de triptofano (A) e anisotropia de fluorescência (B) da crotoxina B de *Crotalus durissus terrificus* (vermelho) e de *Crotalus durissus colillineatus* (preto).

Capítulo 5
Lys49-PLA₂s – Miotoxinas desprovidas de atividade catalítica

Em 1984, foi isolada pela primeira vez uma PLA₂ do veneno da serpente *Agkistrodon piscivorus piscivorus* que era incapaz de se ligar ao íon Ca²⁺ e apresentavam uma substituição natural do ácido aspártico por uma lisina na posição 49 (Maraganore et al., 1984; Holland et al., 1990). Estas proteínas foram batizadas então de Lys49-PLA₂s, ou fosfolipases A₂ homólogas, em contrapartida às fosfolipases catalíticas, conhecidas como Asp49-PLA₂s. Posteriormente, esta classe de proteínas foi encontrada no veneno de um grande número de serpentes da Ásia e da América e atualmente, aproximadamente 50 sequencias de aminoácidos de Lys49-PLA₂s estão depositadas no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e 27 estruturas cristalográficas, em formas nativa e complexadas, estão depositadas no *Protein Data Bank* (PDB). Além disso, outras variações de PLA₂s com alanina, arginina, asparagina, cisteína, glutamina e serina na posição 49 têm sido identificadas recentemente (Liu et al., 1992; Polgar et al., 1996; Pan et al., 1998; Bao et al., 2005; Jabeen et al., 2006; Mebs et al., 2006).

Os primeiros estudos realizados com estas proteínas mostraram que as Lys49-PLA₂s eram cataliticamente inativas devido a sua incapacidade de se ligar o íon Ca²⁺ e, conseqüentemente, incapaz de estabilizar o intermediário tetraédrico formado na reação catalítica das Asp49-PLA₂ (Maraganore et al., 1984). Estudos estruturais suportaram essa hipótese, mostrando que o ε-grupo amino da Lys49 ocupa exatamente a posição do íon Ca²⁺ nas Asp49-PLA₂ (Holland et al., 1990; Scott et al., 1992; Arni & Ward, 1996) (Figura 31). Além disso, experimentos de mutação sítio-dirigida com PLA₂s suína (Van Den Bergh et al., 1988) e bovina (Li et al., 1994) mostraram que o mutante Asp49Lys sofre uma severa redução em sua habilidade de ligar Ca²⁺ com uma concomitante perda da atividade catalítica.

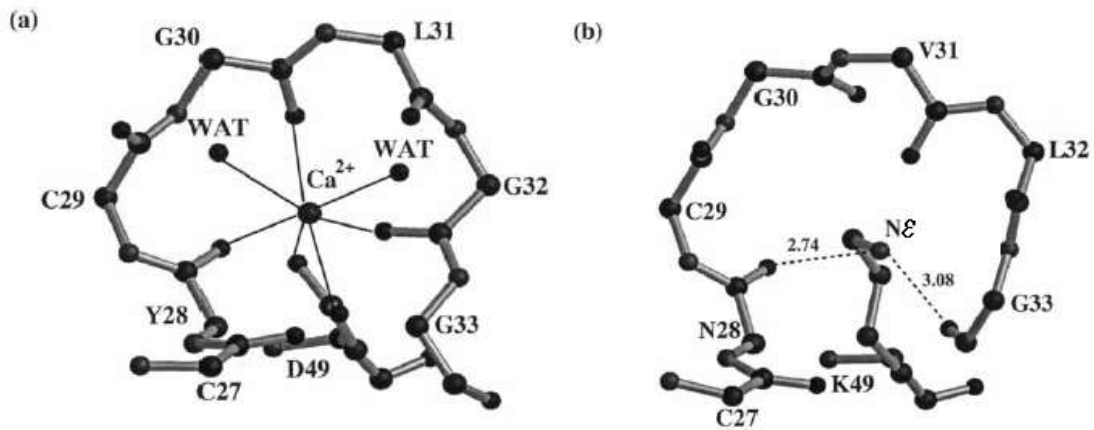


Figura 31: a. Região do loop ligação do íon Ca^{2+} de uma PLA_2 cataliticamente ativa de *N. naja naja* (Asp49- PLA_2). **b.** Região análoga à região de ligação do Ca^{2+} de uma miotoxina II (Lys49- PLA_2) cataliticamente inativa de *Bothrops asper*. Figura adaptada de Arni & Ward (1996)

Apesar desta aparente inatividade catalítica destas moléculas, alguns estudos *in vitro* mostraram que as Lys49- PLA_2 ainda apresentam uma pequena atividade catalítica (Liu *et al.*, 1990; Yoshizumi *et al.*, 1990; Rodrigues-Simioni *et al.*, 1995; Shimohigashi *et al.*, 1995; Mancin *et al.*, 1997). Entretanto, estes estudos foram criticados porque foram realizados com proteínas purificadas do veneno bruto e, por essa razão, possíveis traços de contaminação de Asp49- PLA_2 s podem ter sido responsáveis pela atividade enzimática residual observada. Além disso, experimentos com a bothropstoxina I (BthTX-I) de *Bothrops jararacussu* recombinante mostraram que ela era incapaz de realizar catálise em substratos artificiais *in vitro*, ao contrário da proteína purificada diretamente do veneno (Ward *et al.*, 2001). Por outro lado, apesar desta inatividade catalítica das Lys49- PLA_2 s contra substratos artificiais *in vitro*, foi observado em alguns experimentos uma grande liberação de ácidos graxos naturais após exposição de culturas de células marcadas radioativamente às Lys49- PLA_2 s (Soares *et al.*, 2002). Apesar destas evidências, é importante enfatizar, como os próprios autores deste trabalho fazem, a impossibilidade de determinar se esta liberação de ácidos graxos é causada por uma possível (e improvável) ação catalítica das Lys49- PLA_2 s ou por uma ativação indireta de lipases celulares causada por um influxo intracelular de Ca^{2+} .

Experimentos de mutação sítio dirigida com Lys49-PLA₂s mostraram que o mutante Lys49Asp permanece sem atividade catalítica, demonstrando que outras alterações estruturais, além da simples substituição Asp49Lys, é responsável pela ausência de atividade enzimática (Ward *et al.*, 2002). O estudo estrutural de uma Lys49-PLA₂ do veneno de *Bothrops pirajai* complexada com ácido graxo propôs que a Lys122 (conservada em todas as Lys49-PLA₂s, mas rara em Asp49-PLA₂s) interagiria com o carbonil da Cys29, hiperpolarizando a ligação peptídica entre os aminoácidos Cys29 e Gly30 (Lee *et al.*, 2001). Esta forte interação provocaria um aumento da afinidade pela cabeça do fosfolípido, impedindo a liberação da molécula de ácido graxo produzida por uma hidrólise inicial, interrompendo o ciclo catalítico, e, portanto, tornando as Lys49-PLA₂s cataliticamente inativas. Entretanto, recentemente, Fernandes *et al.* (2010) observou que esse resíduo é extremamente flexível, com elevado fator de temperatura (*B-factor*) de sua cadeia lateral, muitas vezes com a ausência de densidade eletrônica acima de $1,2\sigma$ de corte ou interagindo com diversos outros resíduos. Estes mesmos autores observaram que além do ácido aspártico na posição 49, um resíduo de tirosina na posição 28, conservada em todas as Asp49-PLA₂s também seria essencial para a atividade catalítica dessas enzimas, já que ela seria responsável pela estabilização do *loop* de ligação do Ca²⁺ através de uma ligação de hidrogênio do oxigênio O γ do resíduo de tirosina com o com o grupo amina do resíduo de glicina localizado na posição 35 (Figura 32). No caso das Lys49-PLA₂s, o resíduo conservado na posição 28 é um resíduo de asparagina, não formando a ligação de hidrogênio com a Gly35, distorcendo o *loop* de ligação de Ca²⁺ e impedindo a ligação desse cofator e portanto, a atividade catalítica desta classe de proteínas (Fernandes *et al.*, 2010).

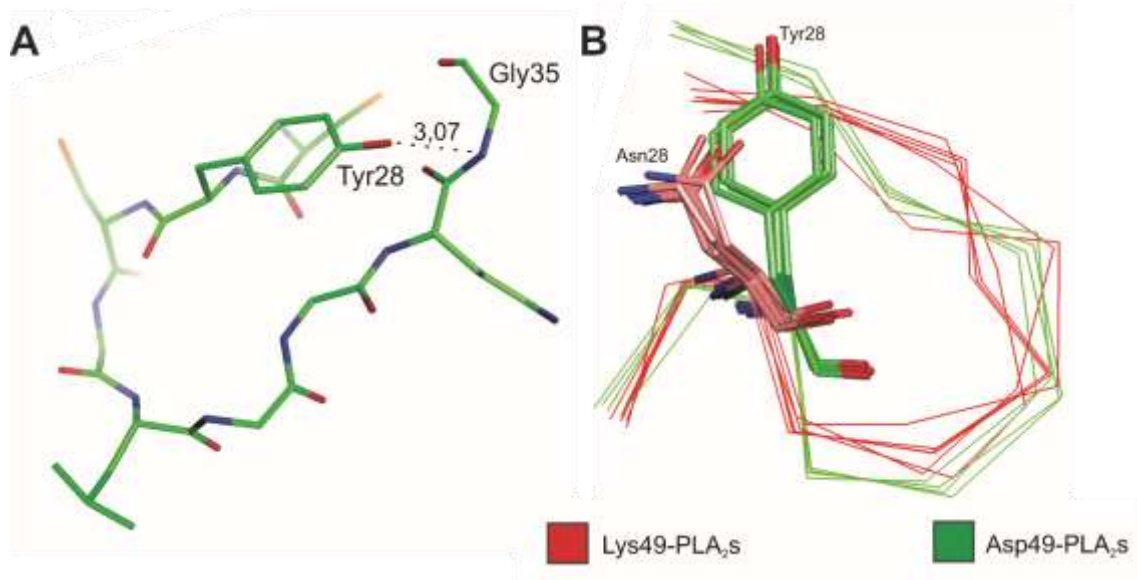


Figura 32: (A) Interação entre o $O\gamma$ da Tyr28 e o grupo amino da Gly35 que estabiliza o loop de ligação de Ca^{2+} das estruturas das Asp49-PLA₂s. (B) Sobreposição dos Ca das Asp49-PLA₂s (em verde) e das Lys49-PLA₂s (vermelho) com destaque em sticks dos resíduos Tyr28 e Asn28. Figura adaptada de Fernandes *et al.* (2010).

Apesar da ausência de atividade catalítica, as Lys49-PLA₂s, com exceção do resíduo Asp49, conservam todos os outros resíduos que participam da hidrólise de fosfolipídios (His48, Tyr53 e Asp99). Além disso, são responsáveis pela indução de mionecrose através de um mecanismo de dano à membrana Ca^{2+} -independente, que não é eficientemente neutralizado pela soroterapia, podendo levar a perda permanente de tecido e amputação (Gutierrez & Lomonte, 1995). Este efeito miótoxico foi observado pela primeira vez em 1986 utilizando ensaios de liberação de creatina quinase no plasma sanguíneo e técnicas histológicas (Gutierrez *et al.*, 1986). Anos depois, Lomonte, Tarkowski *et al.* (1994) observaram uma ação citolítica da miotoxina II de *Bothrops asper* em uma grande variedade de tipos celulares em cultura, incluindo mioblastos de músculo esquelético (Lomonte *et al.*, 1994). Graças a capacidade do polissacarídeo heparina de inibir a atividade miotóxica da BthTX-I (Lomonte *et al.*, 1994), Lomonte *et al.* (1994) propuseram então que a região responsável por este efeito miótoxico deveria ser uma região que combinasse aminoácidos básicos e hidrofóbicos. Posteriormente, diversos experimentos utilizando peptídeos sintéticos demonstraram que a região 115-129, rica

em aminoácidos básicos e hidrofóbicos, mostrou capacidade de se ligar à heparina e de exercer atividade miotóxica, com destaque para a necessidade de um resíduo hidrofóbico na posição 121 para desorganização da membrana (Nunez *et al.*, 2001; Lomonte, Angulo & Santamaria, 2003). Dessa maneira, para o rompimento da membrana muscular, seria necessária a formação de interações eletrostáticas entre os resíduos catiônicos da porção C-terminal das Lys49-PLA₂s e porções carregadas negativamente dos fosfolipídios da membrana (Lomonte, Angulo & Calderon, 2003). Experimentos de mutação sítio dirigida também apontaram a porção C-terminal como responsável pela expressão da atividade miotóxica ao mostrarem que a substituição dos resíduos Tyr117, Arg118, Tyr119, Lys122, e Phe125 por Ala resultam em significativa redução desta atividade (Ward *et al.*, 2002; Chioato *et al.*, 2007). Além desses experimentos, estudos estruturais também reforçaram que a região C-terminal é responsável pela expressão da miotoxicidade. Ambrosio *et al.* (2005) propuseram que a retenção da molécula de ácido graxo no “sítio ativo” das Lys49-PLA₂s, descrita por Lee *et al.* (2001), promoveria um grande aumento na exposição dos aminoácidos hidrofóbicos do C-terminal frente ao solvente, provocando, portanto, um aumento na interação entre as Lys49-PLA₂s e a membrana celular (Ambrosio *et al.*, 2005). dos Santos *et al.* (2009), por sua vez, propuseram um sítio miotóxico exclusivo para Lys49-PLA₂s de venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, formado por um resíduo da região N-terminal (Lys20) e dois resíduos da porção C-terminal (Lys155 e Arg118) (dos Santos *et al.*, 2009). Recentemente, foi identificado um novo grupo de proteínas, as Arg49-PLA₂s, que possuem uma substituição natural na posição 49 do Asp por uma Arg e, da mesma maneira que as Lys49-PLA₂s, são desprovidas de atividade catalítica mas são capazes de induzir mionecrose através de um mecanismo Ca²⁺ independente pouco conhecido (Mebs *et al.*, 2006; Murakami *et al.*, 2008).

Diversos experimentos mostraram que as Lys49-PLA₂s são proteínas diméricas, como análises espectroscópicas, espalhamento de raios X a baixo ângulo, espalhamento de luz

dinâmico e eletroforese, mesmo após aquecimento e na presença de β -mercaptoetanol (da Silva Giotto *et al.*, 1998; Arni *et al.*, 1999; Soares, Guerra-Sá, *et al.*, 2000; Murakami *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2010). Além disso, a dissociação dos monômeros por diminuição do pH leva a supressão da habilidade de romper lisossomos (de Oliveira *et al.*, 2001) e uma diminuição de 50% na atividade de dano célula muscular esquelética e ao tecido muscular maduro (Angulo *et al.*, 2005). Apesar das mais variadas técnicas biofísicas demonstrarem que as Lys49-PLA₂s são dímeros em solução, existe um grande discussão sobre qual seria a conformação dimérica que representaria o dímero biológico já que a observação da rede cristalina das Lys49-PLA₂s não se permite apontar de maneira inequívoca qual seria o dímero biológico. Pela observação da rede cristalina das estruturas de Lys49-PLA₂s percebe-se que há duas possibilidades de dímeros. Uma delas, conhecida como “dímero convencional”, adotada em diversas estruturas de Lys49-PLA₂s já elucidadas, relaciona os monômeros por um eixo de ordem dois perpendicular à região dos *B-wings*, sendo estabilizada por interações desta região e das hélices N-terminais, envolvendo resíduos conservados nas Lys49-PLA₂s: Gln11, Glu12, Trp77 e Lys80 (Figura 23). Recentemente, no entanto, as estruturas cristalográficas da BaspTX-II complexada com suramina (Murakami *et al.*, 2005) e da PrTX-I e BthTX-I complexadas com alfa-tocoferol (dos Santos *et al.*, 2009) mostraram que se estas estruturas fossem resolvidas utilizando como modelo o “dímero convencional”, uma porção das moléculas de suramina e alfa-tocoferol não interagiriam com nenhuma porção da proteína, ficando exposta ao solvente. Dessa maneira, estas estruturas foram resolvidas em uma conformação dimérica conhecida como “dímero alternativo”, onde as moléculas de suramina e alfa-tocoferol ficam totalmente inseridas no dímero e, portanto, não expostas ao solvente (Figura 33).

Além disso, análises destas conformações diméricas com o programa *on line* PISA (http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html) (Krissinel & Henrick, 2007), que analisa os contatos da interface proteica das possibilidades de simetria cristalográfica e calcula qual

interface tem maior probabilidade de ocorrer em solução, mostram que o dímero alternativo apresenta maior probabilidade de ocorrer em solução, já que apresenta maior área de interface e menores valores de energia livre para as interfaces hidrofóbicas. Por fim, dos Santos *et al.* (2009) mostrou que a região responsável pela expressão da miotoxicidade (sítio miotóxico/C-terminal) só consegue estar lado a lado na conformação “dímero alternativo”. Dados de espalhamento de raios X a baixo ângulo também mostram que a conformação “alternativa” é tida como a que melhor representa o envelope protéico das Lys49-PLA₂s (Murakami *et al.*, 2007).

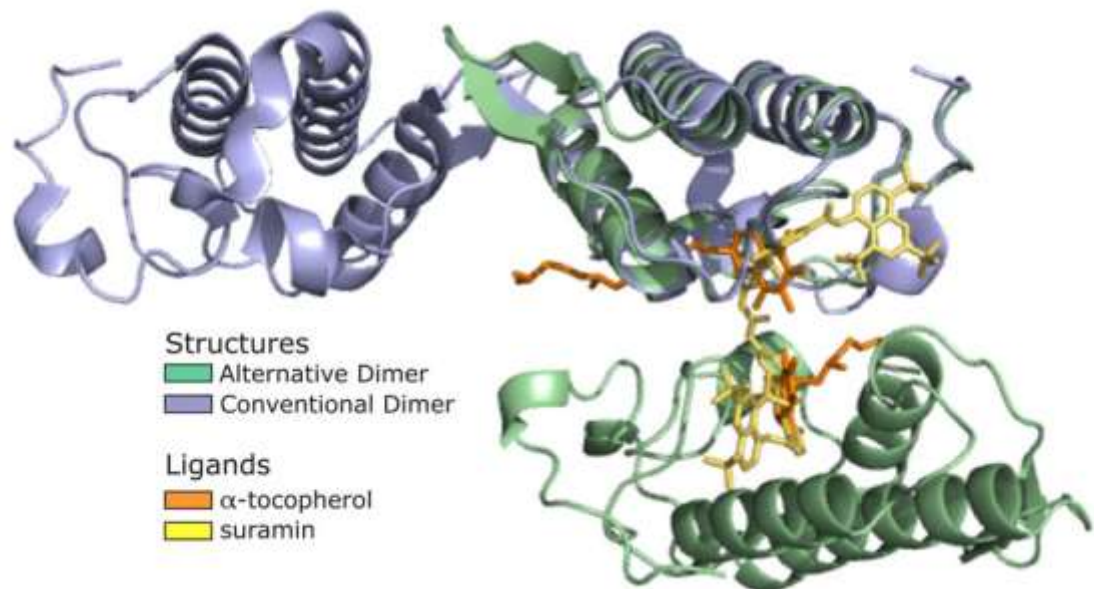


Figura 33: Duas conformações oligoméricas possíveis para as Lys49-PLA₂s: o dímero alternativo (em verde) e o dímero convencional (azul). Suramina (amarelo) e α-tocoferol (laranja) estão mostrados interagindo com o dímero alternativo.

Por conta destas incertezas em relação à conformação dimérica correta das Lys49-PLA₂s, diversas propostas sobre como estas proteínas perturbariam a integridade da membrana muscular foram realizadas. Recentemente, algumas destas propostas se baseiam na idéia que estas proteínas poderiam atuar através de receptores na membrana (Yamazaki *et al.*, 2005; Fujisawa *et al.*, 2008; Cintra-Francischinelli *et al.*, 2009). Entretanto, a maior parte das

propostas do mecanismo de ação das Lys49-PLA₂s se baseia na ação direta destas proteínas sobre a membrana através de interações eletrostáticas. A primeira proposta foi realizada por Lomonte *et al.* (1994) baseada no fato que a ligação de heparina a um peptídeo sintético formado pelos resíduos da porção C-terminal (115-129) inibia a atividade citolítica deste peptídeo, levando a construção da hipótese que essa região seria responsável pela atividade de dano à membrana das Lys49-PLA₂s. A modelagem computacional da miotoxina ACL (monomérica) de *Agkistrodon laticinctus laticinctus* sugeriu que a conservação parcial de alguns resíduos (Lys7, Glu12, Thr13, Lys16) associada a alguns resíduos específicos de lisina (Lys78, Lys80, Lys116, Lys117) poderiam constituir a região pela atividade miotóxica desta classe de proteínas (Selistre-de Araújo *et al.*, 1996). Em seguida, estudos espectroscópicos e cristalográficos da BthTX-I, mostrou que esta proteína poderia adotar em duas diferentes conformações do dímero convencional, “aberta” e “fechada” (da Silva-Giotto *et al.*, 1998). Uma transição da forma “aberta” para a forma “fechada” sobre a membrana alvo produziria um deslocamento da região C-terminal que resultaria no rompimento da camada fosfolípídica e conseqüentemente, na perda da integridade da membrana (da Silva-Giotto *et al.*, 1998). Esse modelo foi posteriormente mais elaborado por Lomonte *et al.* (2003), onde, baseando-se no dímero convencional, propôs que resíduos catiônicos das porções N e C terminais iniciariam fracas interações eletrostáticas com sítios aniônicos que seriam posteriormente fortalecidas pelas contribuições de aminoácidos hidrofóbicos e aromáticos da região C-terminal que também penetrariam e desorganizariam a bicamada fosfolípídica. Ambrosio *et al.* (2005) obtiveram a estrutura cristalográfica de uma ACL de *Agkistrodon contortrix latincitus*, nativa e com uma densidade eletrônica interpretada como ácido láurico, disposto de duas diferentes formas, com apenas uma molécula na unidade assimétrica e, por conta disso, não realizando nenhum comentário sobre a oligomerização destas proteínas, propôs que a interação da Lys122 com a ligação peptídica Cys29-Gly30 na presença de algum ligante no canal hidrofóbico destas proteínas levaria a uma maior exposição de um

hydrophobic knuckle na porção C-terminal, que seria responsável pela perturbação da membrana. Posteriormente, Bortoleto-Bugs *et al.* (2007) considerando que o dímero convencional seria a conformação oligomérica correta das Lys49-PLA₂s propuseram que uma região chamada Interfacial Recognition Site (IRS), que se ligaria à fosfolipídios aniônicos na membrana que levariam a mudanças severas na estrutura da proteína, que levariam à uma maior exposição de superfícies hidrofóbicas que aumentariam a interação proteína/membrana. Estas alterações na estrutura levariam na reorganização dos fosfolipídios, em vez de sua remoção (Bortoleto-Bugs *et al.*, 2007).

Por fim, em oposição a esse modelo, dos Santos *et al.* (2009), reforçando que o dímero alternativo seria o único modelo possível para uma ação das Lys49-PLA₂s, propuseram um sítio formado pelos resíduos Lys20, Lys115 e Arg118, o chamado “sítio miotóxico”, que seria responsável pela perturbação da membrana. Esses resíduos foram escolhidos como responsáveis pela expressão da atividade miotóxica pois, eles estão localizados em proximidade uns aos outros e em muitas estruturas de Lys49-PLA₂s, eles estabelecem diversas ligações de hidrogênio com íons sulfato, que como observado anteriormente por Bahnson (2005), a interação entre os íons sulfato e a proteína se daria de maneira bastante semelhante à interação entre a proteína e a membrana, já que íons negativos bivalentes, como o sulfato, poderiam mimetizar grupos aniônicos fosfatidil da bicamada lipídica. No caso das Asp49-PLA₂s, essa ligação com a membrana ajudaria a estabilização da enzima para a catálise do fosfolipídio (Bahnson, 2005).

Como podemos ver, apesar do grande número de estruturas resolvidas e trabalhos já realizados, ainda restam muitas questões a respeito do mecanismo de ação das Lys49-PLA₂s.

5.1 Resultados e discussão

5.1.1 Estruturas cristalográficas da BbTX-II e MTX-II, duas Lys49-PLA₂s isoladas do veneno de *Bothrops brazili* – Proposta de um novo mecanismo de ação das Lys49-PLA₂s botrópicas.

Os cristais de Brazilitoxina-II (BbTX-II) e MTX-II (Figura 33) difrataram a aproximadamente 2,1 Å (Figura 34). Os dados estatísticos da coleta de dados de difração de raios X dos cristais destas duas proteínas podem ser visualizados na tabela 6. Um artigo referente à obtenção de cristais e análise preliminar dos dados de difração destas duas proteínas e de mais uma Asp49-PLA₂ (BbTX-III) isolada do veneno dessa mesma serpente foi publicado em uma revista internacional da área (Anexo 01). A Tabela 7 mostra as estatísticas finais do refinamento de ambas as estruturas (Figura 35).

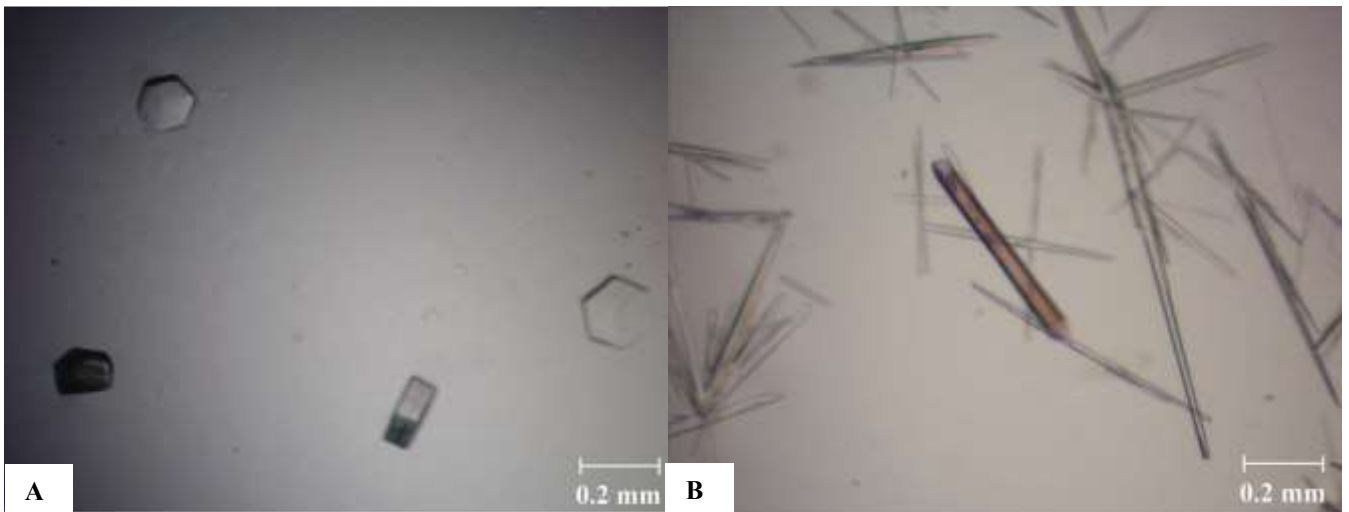


Figura 34: Cristais de (A) Brazilitoxina-II. (BbTX-II) e (B) MTX-II, Lys49-PLA₂s isoladas do veneno de *Bothrops brazili*.

Tabela 6: Estatísticas de coleta e processamento de dados da Brazilitoxina-II (BbTX-II) e MTX-II isoladas do veneno de *Bothrops brazili*.

Números entre parênteses representam a faixa de mais alta resolução.

	BbTX-II	MTX-II
Cela Unitária (Å)	$a=b=56,43, c=129,082$	$a=39,01, b=71,41, c=44,42, \theta=102,50^\circ$
Grupo Espacial	$P3_12_1$	$P2_1$
Resolução (Å)	40-2,05 (2,12-2,05)	20-2,08 (2,15-2,08)
Reflexões únicas	15053 (1514)	13821 (1396)
Completeza (%)	96,0 (98,8)	96,4 (97,5)
R_{merge}^\dagger (%)	6,5 (63,0)	12,9 (35,3)
Fonte de radiação	Synchrotron (MX1 station, LNLS)	
Temperatura da coleta de dados (K)	100	
$I/\sigma(I)$	15,73 (2,02)	6,63 (2,05)
Redundância	3,9 (3,8)	2,8 (2,8)
Coefficiente de Matthews V_M (Å ³ Da ⁻¹)	2,12	2,16
Moléculas na ASU	2	2
Conteúdo de solvente (%)	41,99	43,02

$\dagger R_{\text{merge}} = \sum hkl(\sum_i (|I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle|) / \sum hkl, i \langle I_{hkl} \rangle)$, onde $I_{hkl,i}$ é a intensidade de uma medida individual da reflexão com os índices de Miller h, k and l , e $\langle I_{hkl} \rangle$ é a intensidade média de cada reflexão. Calculado para $I > -3\sigma(I)$. Dados processados pelo programa HKL 2000 (Otwinowski & Minor, 1997).

Tabela 7: Estatísticas finais do refinamento da Brazilitoxina-II (BbTX-II) e MTX-II de *Bothrops brazili*.

	BbTX-II	MTX-II
Cela Unitária (Å)	$a=b=56,43; c=129,08^\circ$	$a=39,01; b=71,41; c=44,42; \theta= 102.5^\circ$
Grupo Espacial	$P3_12_1$	$P2_1$
Resolução (Å)	32,3-2,11 (2,19-2,11) ^a	20-2,08 (2,15-2,08) ^a
Reflexões únicas	13825 (1363) ^a	13752 (1365) ^a
Completeza (%)	96,07 (97,64) ^a	95,87 (95,25) ^a
R_{merge}^b	6,3 (49,0) ^a	12,9 (35,3) ^a
$I/? (I)$	14,40 (3,23) ^a	5,29 (1,78) ^a
R_{cryst}^c (%)	19,36	19,27
R_{free}^d (%)	24,43	23,62
Número de átomos não-hidrogênio ^e		
Proteína	1788	1837
Moléculas de PEG	-	3
Sulfato	-	5
Águas	191	251
RMS (ligações) ^e	0,004	0,006
RMS (ângulos) ^e	0,83	0,86
Fator temperatura médio (Å ²) ^e	47,50	28,90
Ramachandran favoráveis (%) ^e	96	97
Ramachandran outliers (%) ^e	0	0
Clashscore	5,30	8,63
MolProbity Overall Score	1,54	1,78

^a Números entre parênteses representam a faixa 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 com os índices de Miller h, k e l , e $\langle I_{hkl} \rangle$ é a intensidade média de cada reflexão. Calculado para $I > 3\sigma(I)$.

^c $R_{\text{cryst}} = \sum hkl(|F_{\text{obs}} - |F_{\text{calc}}||) / \sum |F_{\text{obs}}|$, onde $|F_{\text{obs}}|$ e $|F_{\text{calc}}|$ são as amplitudes dos fatores de estrutura observados e calculados.

^d R_{free} é equivalente ao R_{cryst} , mas calculado com base em 5% do total de reflexões obtidas. ^e Calculado pelo programa Phenix (Adams *et al.* 2002)

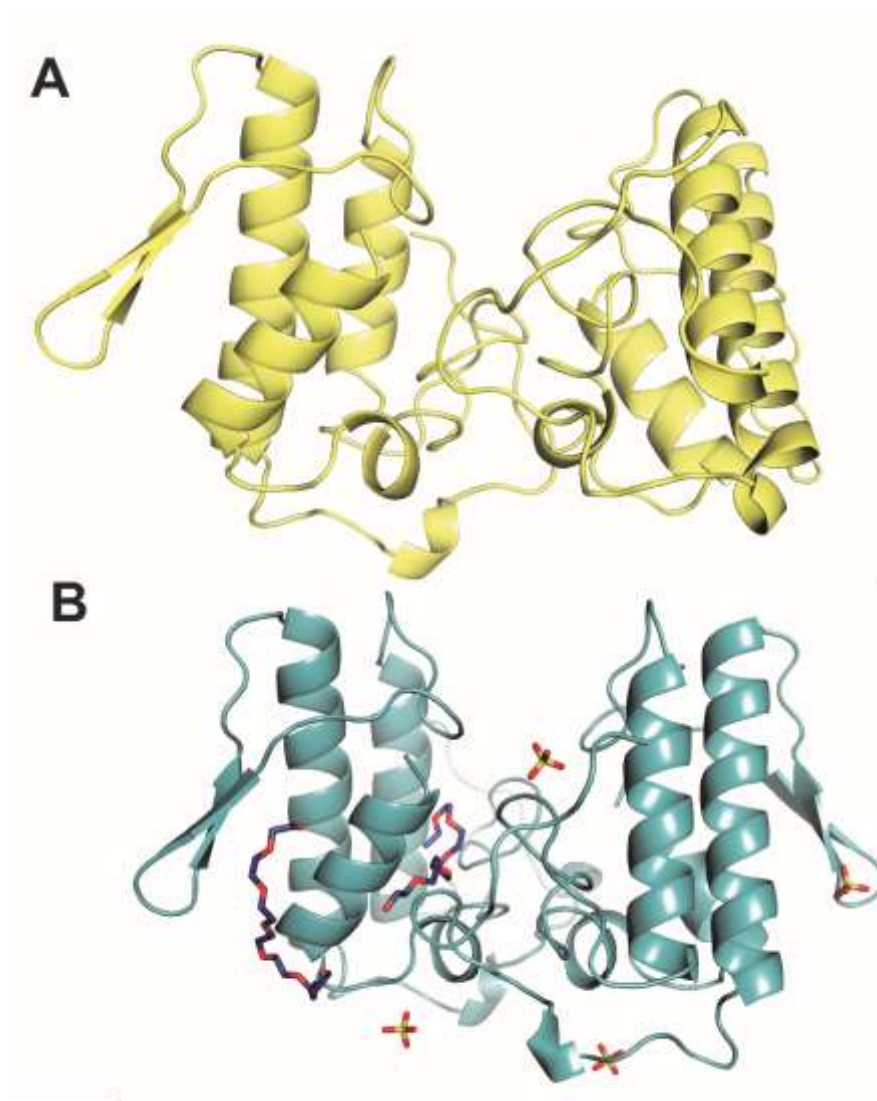


Figura 35: Representação em *cartoon* da estrutura cristalográfica das proteínas (A) Brazilitoxina-II (BbTX-II) e (B) MTX-II isoladas do veneno de *Bothrops brazili*. As moléculas de PEG e sulfato presentes na estrutura da MTX-II estão mostrados em sticks.

As estruturas cristalográficas da BbTX-II e MTX-II apresentam dois monômeros na unidade assimétrica e foram refinadas no modelo de dímero alternativo (Figura 35). De fato, como já observado para outras estruturas de Lys49-PLA₂s, ambas as estruturas apresentam maiores valores de área de interface e de ganho de energia livre de solvatação (Δ^iG) na conformação do dímero alternativo, como analisado pelo software *on line* PISA (http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html) (Krissinel & Henrick, 2007). O dímero da MT-II na conformação convencional apresenta uma área de interface de 380,3 Å² e $\Delta^iG = 1,3$ Kcal/mol, enquanto que na conformação alternativa apresenta uma área de interface de 524,5

\AA^2 e $\Delta^iG = -12,4$ Kcal/mol. O dímero da BbTX-II, por sua vez, na conformação convencional apresenta uma área de interface de $498,4 \text{ \AA}^2$ e $\Delta^iG = 0,6$ Kcal/mol, enquanto que na conformação alternativa apresenta uma área de interface de $512,6 \text{ \AA}^2$ e $\Delta^iG = -9,3$ Kcal/mol.

A estrutura da BbTX-II apresenta-se na forma nativa, enquanto que a da MT-II apresenta uma molécula de PEG em seu canal hidrofóbico, além da presença de quatro íons sulfato. A presença de ligantes no canal hidrofóbico das Lys49-PLA₂s produz, conforme anteriormente observado (dos Santos *et al.*, 2009), a reorientação espacial de um dos monômeros, levando a formação de uma ligação de hidrogênio entre os O γ das Tyr119 de cada um dos monômeros. Essa reorientação de um dos monômeros é, segundo dos Santos *et al.* (2009) essencial para a expressão da atividade miotóxica porque coloca a região C-terminal e o sítio miotóxico lado a lado. De modo a quantificar a reorientação de um dos monômeros, esses autores criaram um modelo baseado no grau de abertura (θ_A) e no grau de torção (θ_T) entre os monômeros (Figura 36). Segundo estes mesmos autores, as Lys49-PLA₂s nativas apresentam um θ_T e θ_A de aproximadamente, 60° e 7° , respectivamente, enquanto que as toxinas que apresentam ligantes em seu canal hidrofóbico (chamadas de apo ou complexadas apresentam um θ_T entre 40° - 52° e um θ_A entre 15° - 28° . No caso da BbTX-II e da MTX-II (que possui uma molécula de PEG no canal hidrofóbico), os ângulos calculados são, respectivamente, $\theta_T=59^\circ$ e $\theta_A=7^\circ$; $\theta_T= 41^\circ$ e $\theta_A= 29^\circ$, portanto, aproximadamente dentro da faixa de valores previamente observados.

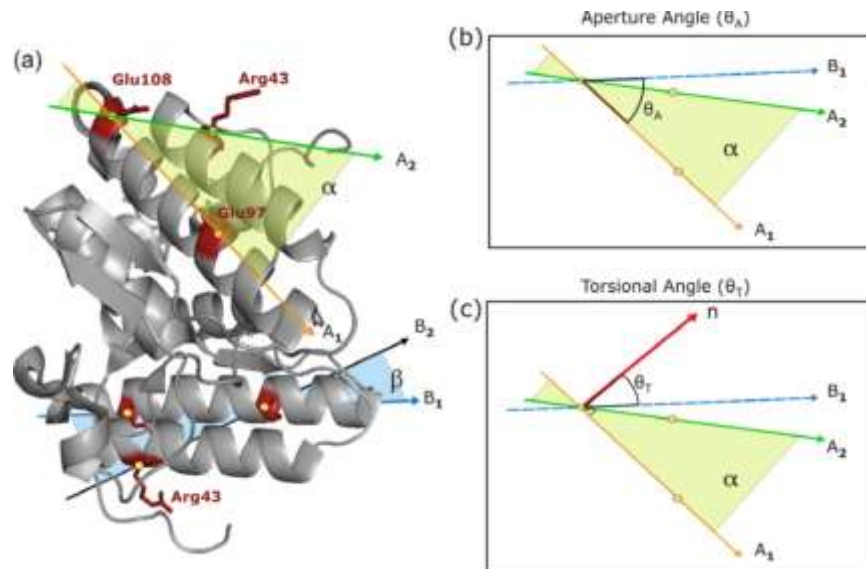


Figura 36: Modelo para caracterização estrutural das mudanças oligoméricas sofridas pelas Lys49-PLA₂s complexadas usando dois ângulos: θ_A (ângulo de abertura) indica o valor de abertura entre os monômeros definido pelo vetores A1 (laranja) e B1 (azul); θ_T (ângulo de torção) indica o ângulo de torção entre os planos α (bege) e β (azul) ocupado pelas α -hélices h2 e h3 dos monômeros A e B, respectivamente. Figura adaptada de dos Santos *et al.* (2009).

Como já observado, vários autores já propuseram diversos mecanismos de ação baseado em interações eletrostáticas entre resíduos, especialmente da região C-terminal e a membrana alvo. Dentre todos, apenas o proposto por dos Santos *et al.* (2009) considera o dímero alternativo como o dímero biológico correto das Lys49-PLA₂s. Estes autores propuseram que um sítio formado pelos resíduos Lys20, Lys115 e Arg118, o chamado “sítio miotóxico”, que seria responsável pela perturbação da membrana por conta da interação desses resíduos com íons sulfato. Na estrutura cristalográfica da MTX-II, que apresenta um PEG no canal hidrofóbico, identifica-se íons sulfatos interagindo com os resíduos Lys115 e Arg118, de maneira similar a outras Lys49-PLA₂s (Figura 37). Na estrutura da MTX-II, a interação do sulfato com a Lys20, que é observada nas estruturas analisadas por dos Santos *et al.* (2009), não está presente pois a MTX-II possui um resíduo de alanina na posição 20.

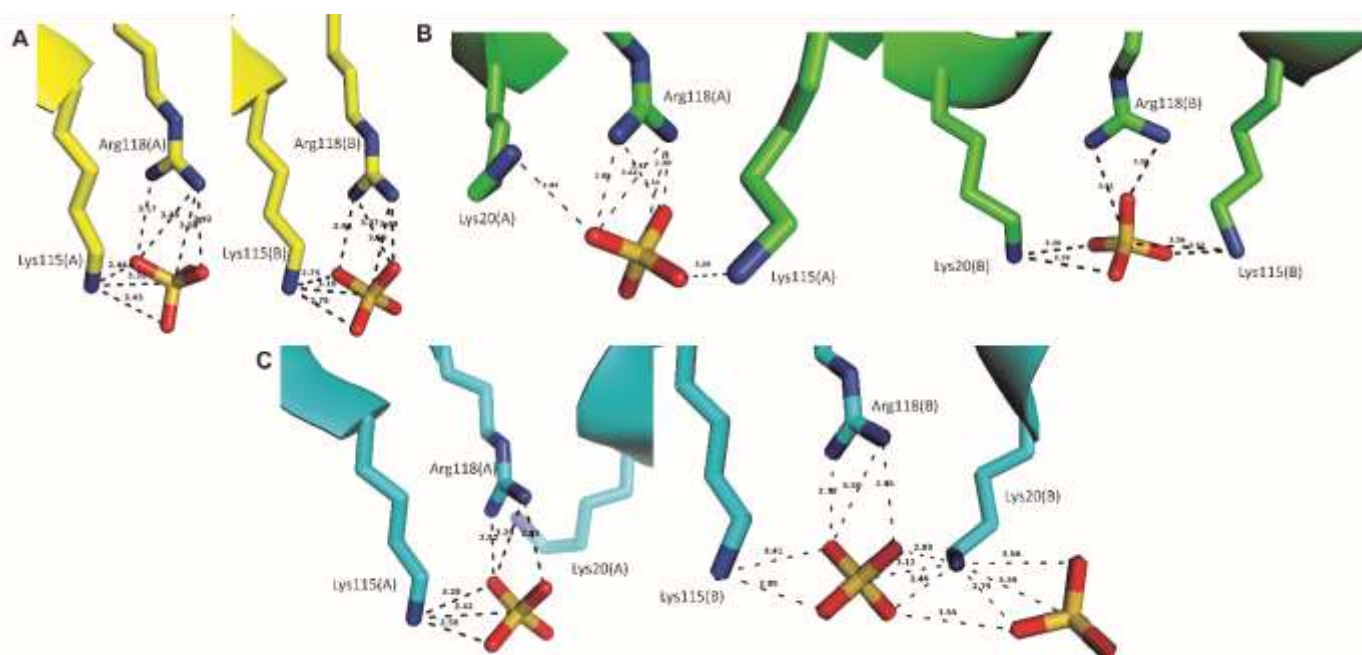


Figura 37: Interação dos resíduos Lys20, Lys115 e Arg118 com íons sulfatos nas estruturas de Lys49-PLA₂s complexadas (A) MTX-II; que apresenta uma molécula de PEG no canal hidrofóbico; (B) Bn-IV (de *B. newwiedi*) complexada com ácido mirístico (PDB ID 3MLM); (C) PrTX-I (de *B. pirajai*) complexada com α -tocoferol (PDB ID 3CYL).

Entretanto, um problema relevante dessa hipótese do sítio miotóxico é a baixa probabilidade de resíduos carregados se inserirem na porção hidrofóbica da membrana. Por conta disso, neste trabalho se propõe que esse sítio (Lys20-Lys115-Arg118) está mais relacionado a ancoragem na membrana que sua desestabilização propriamente, de maneira similar ao que ocorre nas Asp49-PLA₂s. Dessa maneira, o sítio miotóxico será chamado a partir de agora de Sítio de *Docking* na Membrana (*Membrane-Docking Site*, MDoS), que da mesma maneira que o sítio miotóxico anteriormente proposto, ele pode ser complementado por outros resíduos carregados, como Lys80, Lys122 e Lys127. Neste trabalho, observou-se através da comparação entre as estruturas da MTX-II e da BbTX-II que a presença de um ligante no canal hidrofóbico provoca uma maior projeção dos resíduos que compõem o MDoS em direção ao solvente (Figura 38).

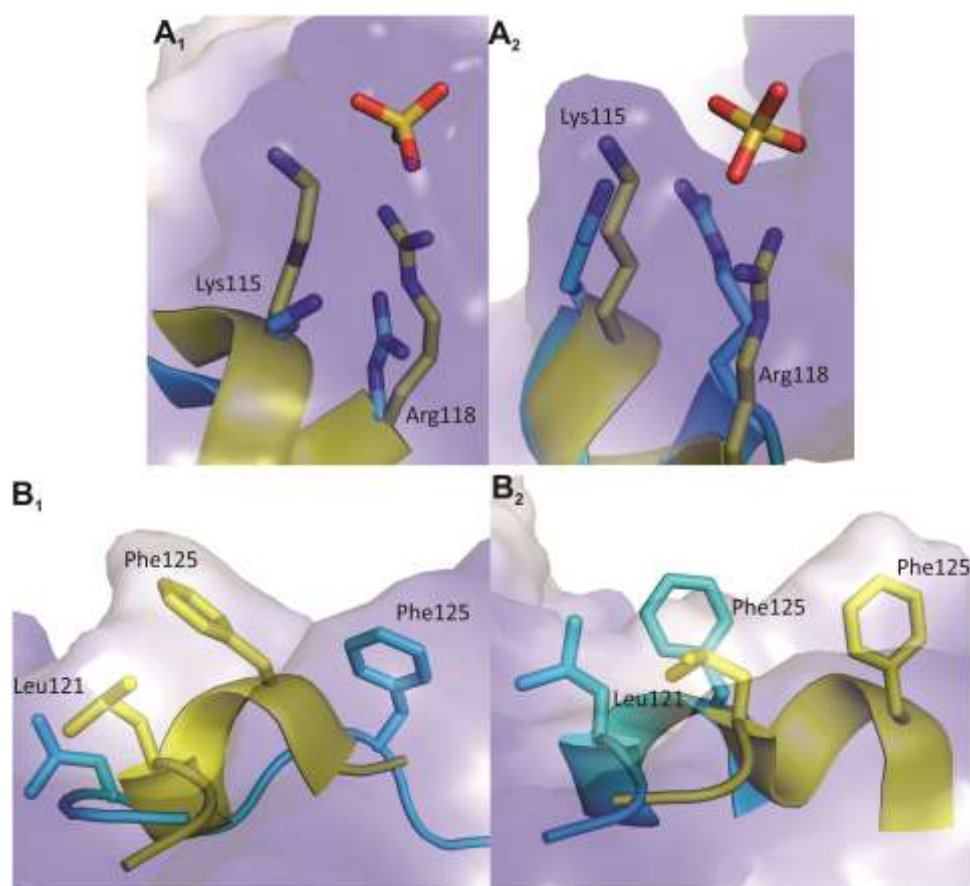


Figura 38: Comparação estrutural entre as regiões do sítio de *docking* na membrana (MDos) (A) e do sítio de desestabilização da membrana (MDiS) entre as estruturas cristalográficas da MTX-II complexada com PEG 4000 (Lys49-PLA₂ em sua forma ativa; em amarelo) e da BbTX-II (Lys49-PLA₂ em sua forma inativa; em azul). Os números 1 e 2 subscritos referem-se aos monômeros A e B, respectivamente.

Propostas anteriores, baseadas no dímero convencional ou em estruturas monoméricas apontam para a participação de aminoácidos hidrofóbicos na expressão da atividade miotóxica (Ambrosio *et al.*, 2005). O alinhamento da região C-terminal das sequências de Lys49-PLA₂s mostra um alto nível de conservação de aminoácidos hidrofóbicos nessa região, especialmente resíduos de Leu, Pro e Phe nas posições 121, 124 e 125 (Figura 39). Em relação as Lys49-PLA₂s botrópicas, pode-se ver a presença de um resíduo de Leu e um de Phe, nas posições 121 e 125, respectivamente, em 98% das sequências encontradas nos NCBI Protein Data Bank (Figura 39).

		121	125
Bothropic Lys49	MT-II	: HLRPECKEA-DPC	
	BbTX-II	: HLRPLCKEA-DAC	
	PrTX-I	: HLRPECKEA-DDC	
	PrTX-II	: HLRPECKEA-DDC	
	BthTX-I	: HLRPECKEA-DAC	
	BnSP-7	: HLRPECKEA-DPC	
	MjTX-I	: YLRPECKEA-RDC	
	MjTX-II	: YLRPECKEA-DPC	
	Bn-IV	: HLRPECKEA-DPC	
	BaTX	: YLRPLCKEA-DAC	
	blK-PLA2	: HLRPECKEA-DPC	
	PLA2K49	: FTRPLCKEADAAC	
	M1-3-3	: YLRPECKEA-DPC	
	Myo-II	: YLRPLCKEA-DAC	
	Myo-IV	: YLRPECKEA-EPC	
	MyoI	: YLRPECKEA-DAC	
	GodMT-I	: HMRPECKEA-DAC	
	GodMT-II	: YLRPLCKEA-DAC	
	Acutohaemo	: HLRPSCKEATSECC	
	DAV-K49	: TVRFLEKAP-ESC	
	Anum-1	: YLRPLCKEA-DDC	
	Cax-K49	: YLRFLCKEP-DTC	
	APP-K-49	: YLRFLCKEP-DTC	
	BP-I	: YLRPECKEA-DTC	
	BP-II	: YLRPECKEA-DTC	
	BP-III	: YLRPECKEA-DTC	
	Prcmutoxin	: TMRFLCKAP-ESC	
	PeBP_R_I	: TVRFLEKAP-ESC	
	Ts-K49	: NLRLECKEATSECC	
	Bsc-K49	: TMRMECKEP-DAC	
	R6K49	: YLRVLCRKP-DAC	
	Tpu-K49	: NLRLECKEATSECC	
Acl-MT1	: YLRPECKEP-ETC		
Tbo-K49	: NLRLECKEATSECC		
CTs-K49	: NLRLECKEATSECC		

Figura 39: Alinhamento da região C-terminal das sequências de Lys49-PLA₂s depositadas no NCBI Protein Data Bank, com destaque para as Lys49-PLA₂s isoladas de venenos botrópicos.

Uma análise da posição das cadeias laterais desses dois resíduos na estrutura da MTX-II e de outras Lys49-PLA₂s complexadas, vê-se que esses resíduos encontram-se em contato próximo, praticamente perpendiculares um ao outro, expostos ao solventes e de maneira simétrica no outro monômero (Fig. 40). Considerando, portanto, o alto nível de conservação desses resíduos e a posição de suas cadeias laterais nas estruturas dessas proteínas, propõe-se que esse seja, de fato, o sítio responsável pela miotoxicidade dessas proteínas e por isso será chamando a partir de agora de Sítio Hidrofóbico de Desestabilização da Membrana (*Hydrophobic Membrane-Disruption Site*, MDiS). De fato, experimentos de mutação sítio dirigida mostraram que o mutante Phe125Ala possui menor atividade miotóxica que a BthTX-

I selvagem (Chioato *et al.*, 2007) e o mutante Phe125Trp apresentou o mesmo nível de miotoxicidade (Ferreira *et al.*, 2008). Esses resultados reforçam a importância de um aminoácido hidrofóbico na posição 125 para a expressão da atividade miotóxica. Além disso, experimentos utilizando peptídeos sintéticos da porção C-terminal demonstraram que a presença de um aminoácido hidrofóbico na posição 121 é essencial para a expressão da atividade miotóxica (Nunez *et al.*, 2001). Cabe ressaltar que de acordo com escalas de hidrofobicidade calculada por diferentes autores (Kyte & Doolittle, 1982; Wimley & White, 1996), Leu e Phe estão sempre entre os resíduos com os maiores índices de hidrofobicidade. Além disso, Leu e Phe são os aminoácidos com os maiores coeficientes de permeabilidade à membrana (Naoi *et al.*, 1977), sendo a permeabilidade desses resíduos até cem vezes maior que aminoácidos carregados (Chakrabarti *et al.*, 1992). Neste trabalho, observou-se pela comparação das estruturas cristalográficas da MTX-II e da BbTX-II que a presença de um ligante no canal hidrofóbico provoca uma maior projeção dos resíduos que compõem o MDiS em direção ao solvente (Figura 38). Além disso, a presença da molécula de PEG no canal hidrofóbico provoca uma redução da área de superfície enterrada (*buried area surface*) dos resíduos que compõem o MDiS (Leu121 e Phe125), expondo-os ao solvente (Tabela 8).

Por fim, os sítios MDoS e MDiS podem estar presentes em outra classe de fosfolipases homólogas, as Ser49-PLA₂s, onde o sítio MDiS seria formado pelos resíduos Phe123 e Trp125 e o sítio MDoS pelos resíduos Asn114, Lys115 e Lys116, que poderiam ser complementado pela Lys127 (Figura 40).

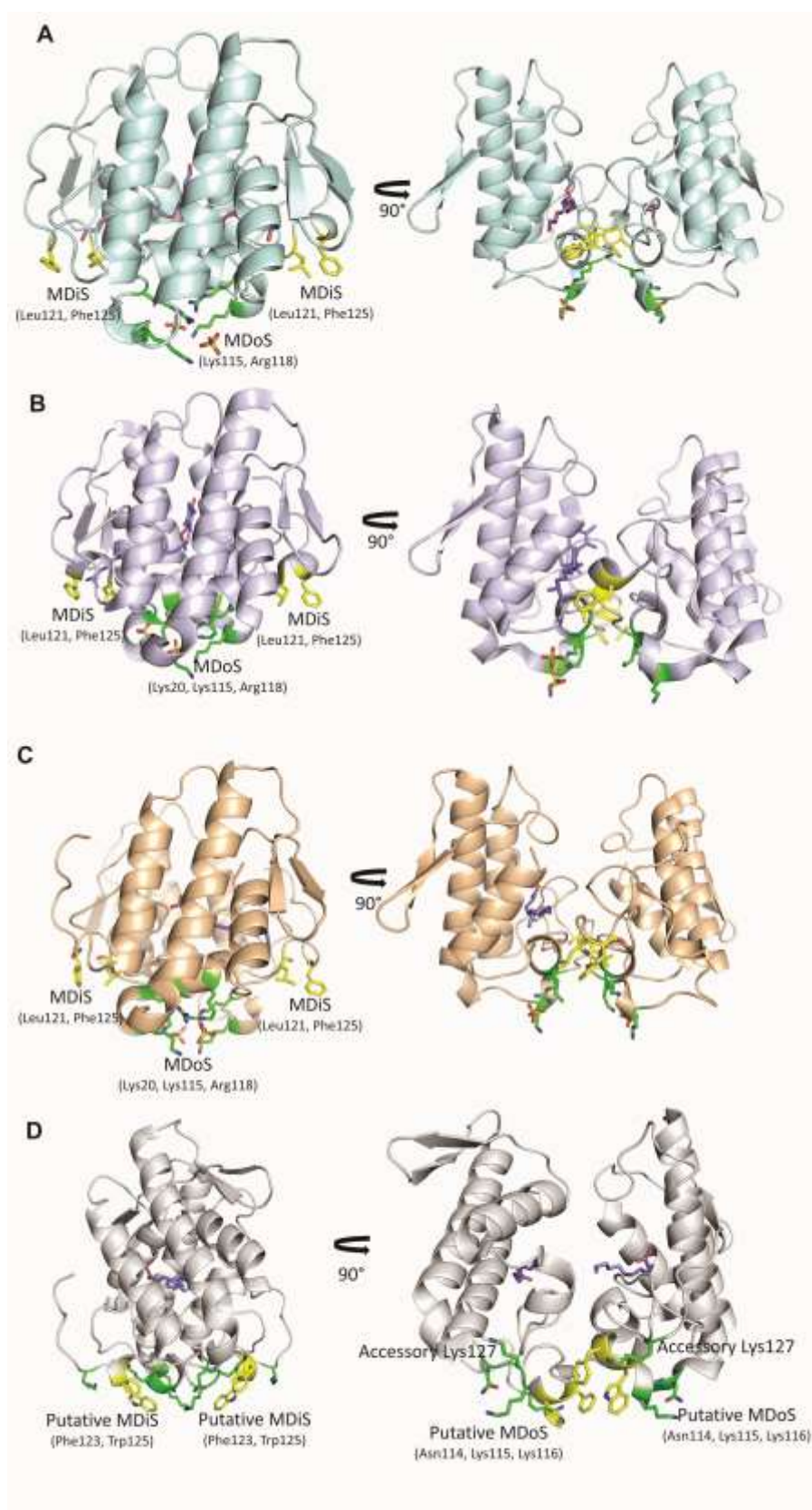


Figura 40: Localização dos sítios MDoS (Sítio de *Docking* na Membrana) e MDiS (Sítio Hidrofóbico de Desestabilização da Membrana), nas estruturas cristalográficas de (A) BbTX-II complexada com PEG 4000; (B) Bn-IV complexada com ácido mirístico (PDB ID 3MLM); (C) PrTX-I complexada com α -tocoferol (PDB ID 3CYL); (D) Ecarpholin S, uma Ser49-PLA₂ de *Echis carinatus* complexada com ácido láurico (PDB ID 2QHD)

Tabela 8: Área da superfície enterrada (*Buried Surface Area*) dos resíduos que compõem o sítio de desestabilização da membrana (MDiS; Leu121 e Phe125) nas estruturas apo (ausência de ligantes no canal hidrofóbico) e complexadas (presença de ligantes no canal hidrofóbico). BthTX-I: Bothropstoxin I do veneno de *Bothrops jararacussu* venom (PDB ID: 3HZD); PrTX-I: Piratoxin I do veneno de *Bothrops pirajai* (PDB ID: 2Q2J); BbTX-II: Brazilitoxina II do veneno de *Bothrops brazili* (PDB ID 4K09); BnSP-7: Lys49-PLA₂ do veneno de *Bothrops pauloensis* (PDB ID 1PA0); BthTX-I-PEG4K: BthTX-I complexada com PEG4000 (PDB ID 3IQ3); BthTX-I- α T: BthTX-I complexada com alfa tocoferol (PDB ID 3CXI); BthTX-I-BPB: BthTX-I modificada quimicamente pelo brometo de p-bromofenacila (BPB) (PDB ID 3HZW); PrTX-I- α T: PrTX-I complexada com alfa tocoferol (PDB ID 3CYL); PrTX-I-BPB: PrTX-I modificada quimicamente pelo brometo de p-bromofenacila (BPB) (PDB ID 2OK9); MTX-II-PEG4K: MTX-II do veneno de *Bothrops brazili* complexada com PEG4000 (PDB ID 4K06); BnIV-Myristic Acid: Bn-IV do veneno de *Bothrops neuwiedi* complexada com ácido mirístico (PDB ID 3MLM).

		BSA of MDiS (Å ²)
Estruturas apo	BthTX-I	122,78
	PrTX-I	126,38
	BbTX-II	88,84
	BnSP-7	109,58
Estruturas complexadas	BthTX-I-PEG4K	61,15
	BthTX-I- α T	52,64
	BthTX-I-BPB	47,68
	PrTX-I- α T	42,54
	PrTX-I-BPB	68,49
	MTX-II-PEG4K	63,75
	BnIV-Myristic Acid	66,49

Esses dados levam a proposição de um novo mecanismo de ação para as Lys49-PLA₂s, que ocorreria da seguinte maneira (Figura 41):

- I) Entrada de uma molécula hidrofóbica, como um ácido graxo no canal hidrofóbico das Lys49-PLA₂s, que, como anteriormente observado nas estruturas complexadas (PEG, alfa-tocoferol, ácido graxo), levaria a uma reorientação de um dos monômeros. Dessa forma, a proteína passaria do estado inativo, para ativo já que a presença desta molécula provoca o alinhamento dos sítios MDoS e do MDiS no mesmo plano em uma posição simétrica em ambos os monômeros; uma maior projeção em direção ao solvente dos resíduos que compõem esses sítios (Figura 38) e uma maior exposição dos resíduos que compõem o MDiS (Tabela 8). Esse ácido

graxo que provocaria a ativação da Lys49-PLA₂ poderia ser produto da lise da membrana realizada por uma Asp49-PLA₂, o que reforça o sinergismo entre Asp49-PLA₂ e Lys49-PLA₂ na ação do veneno. Estudos anteriores já verificaram a ocorrência desse sinergismo que mostraram que uma quantidade muito pequena de Lys49-PLA₂ seria suficiente para causar um grave dano à membrana muscular na presença de uma Asp49-PLA₂ (Cintra-Francischinelli *et al.*, 2009). Além disso, a retenção de uma molécula no canal hidrofóbico justificaria a conservação do sítio catalítico (com exceção do Asp49) e indicaria uma relação entre “sítio catalítico” e sítio miotóxico, como anteriormente proposto (dos Santos *et al.*, 2009);

- II) Estabilização do dímero, em conformação alternativa, sobre a membrana pela interação do sítio MDoS (Lys20-Lys115-Arg118) com a cabeça aniônica de fosfolípidios da membrana. Como já observado, esse sítio interage com íons sulfatos em diversas estruturas de Lys49-PLA₂s e eles mimetizariam grupos aniônicos fosfatidil da bicamada lipídica;
- III) Desestabilização da membrana pela penetração do sítio MDiS (Leu121-Phe125) na membrana. A inserção dessa região na membrana seria responsável por permitir um influxo descontrolado de íons Ca²⁺ e Na⁺, que causaria mudanças intracelulares irreversíveis, consequentemente, a morte celular que é o resultado final da lesão da membrana muscular causada pelas Lys49-PLA₂s (Gallacci & Cavalcante, 2010).

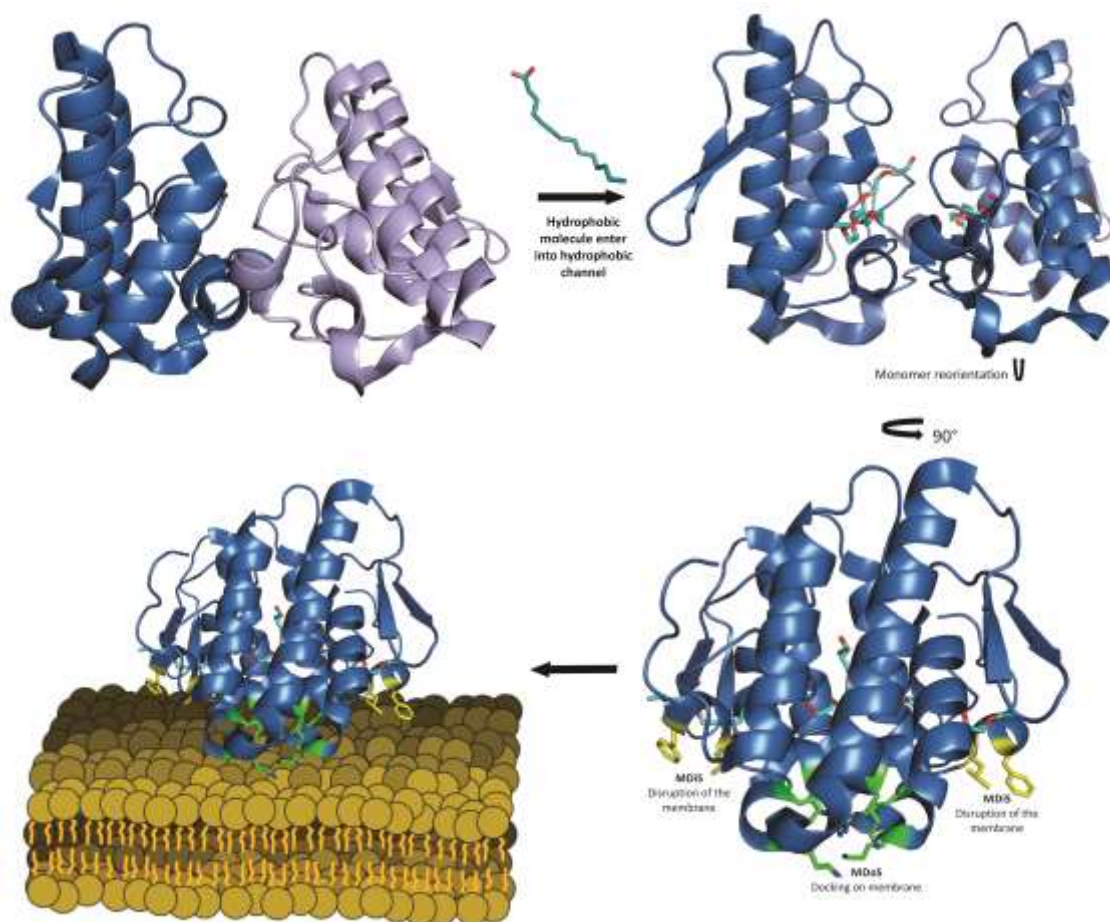


Figura 41: Proposta de mecanismo miotóxico das Lys49-PLA₂s isoladas do veneno de serpentes do gênero *Bothrops*. A Lys49-PLA₂ em seu estado apo é ativada pela entrada de uma molécula hidrofóbica (um ácido graxo, por exemplo) em seu canal hidrofóbico, levando a reorientação de um dos monômeros, como medido anteriormente pelo modelo de graus de abertura e torção entre os monômeros (dos Santos *et al.*, 2009). Essa reorientação alinha a porção C-terminal e a região MDoS (sítio de *docking* na membrana) lado a lado. Além disso, coloca em um mesmo plano de maneira simétrica a região de destabilização da membrana (MDiS) e provoca uma maior exposição ao solvente dos sítios MDoS e MDiS. A região MDoS estabiliza a proteína sobre a membrana através da interação dos resíduos carregados positivamente (Lys20, Lys115 e Arg118) com a cabeça aniônica de fosfolipídios de membrana. Por fim, a região MDiS provoca a destabilização da membrana através da penetração dos resíduos hidrofóbicos que a compõem (Leu121 e Phe125).

Estudos anteriores demonstraram que as Lys49-PLA₂s isoladas do veneno de serpentes do gênero *Bothrops* agrupam-se em um clado monofilético, ou seja, que todas as sequências apresentam uma única sequência ancestral (dos Santos *et al.*, 2011). Este dado dá suporte evolutivo para algumas características exclusivas para as Lys49-PLA₂s, como o papel essencial da formação de dímeros para a expressão da atividade miotóxica e um mecanismo de ação específico. Entretanto, como as Lys49-PLA₂s não botrópicas possui um alto nível de conservação da Lys115 e de outros resíduos de lisina (Lys80, Lys122, Lys127 e Lys28) que

estão expostos ao solvente e poderiam constituir uma região MDoS análoga. Além disso, o alto nível de conservação na porção C-terminal de resíduos hidrofóbicos entre todas as Lys49-PLA₂s (Figura 39) sugere que os passos II e III do mecanismo de ação aqui proposta possa estar conservado entre toda esta classe de proteínas.

Com essa nova proposta, pretende-se compreender com mais clareza a relação estrutura-função das Lys49-PLA₂s e dessa maneira, gerar informações para o desenvolvimento de mecanismos de inibição para estas proteínas. As estruturas da MTX-II e da BbTX-II foram depositadas no Protein Data Bank (PDB) com os códigos de identificação 4K06, e 4K09, respectivamente. Além disso, um manuscrito acerca dos resultados acima mostrados foi recentemente aceito em um renomado periódico científico da área (Anexo 2).

5.1.2 Estruturas cristalográficas da PrTX-I complexada com inibidores vegetais (ácido caféico e ácido aristolóquico) – Explorando novos modos de inibição das Lys49-PLA₂s botrópicas.

Na medicina popular de diversos países em desenvolvimento, diversas espécies vegetais são utilizadas para o tratamento de envenenamento ofídico em comunidades que não possuem acesso imediato ao soro antiofídico (Soares et al., 2005, Samy et al., 2008). Nos últimos anos, um grande número de estudos vem investigando cientificamente os efeitos de algumas dessas plantas no envenenamento ofídico, isolando e caracterizando os seus princípios ativos e elucidado seus possíveis mecanismos de ação (Mors *et al.*, 2000, Soares *et al.*, 2005, Cintra-Francischinelli *et al.*, 2008). Dois dos componentes mais encontrados nas plantas mais utilizadas são o ácido caféico e o ácido aristolóquico. O ácido caféico é um derivado do ácido cinâmico com uma reatividade bioquímica excepcional presente em diversas plantas utilizadas no tratamento antiofídico como *Prestonia coalita*, *Strychnos nux-vomica*, *Taraxacum officinale* e *Vernonia condensate* (Mors et al., 2000, Soares et al., 2005). Além disso, derivados cristalinos

do ácido caféico possuem propriedades antiofídicas quando administrados por via oral ou parenteral (Agoro, 1978).

Foram obtidos cristais da Piratoxina I (PrTX-I), uma Lys49-PLA₂ isolada do veneno de *Bothrops pirajai* co-cristalizada com os inibidores ácido aristolóquico (AA) e ácido caféico (AC) (Figura 42). Os cristais difrataram à alta resolução, 1,96 Å e 1,65 Å, respectivamente (Tabela 9). Os dados estatísticos da coleta de dados de difração de raios X dos cristais dos dois complexos podem ser visualizados na tabela 3. A cristalização do complexo PrTX-I-Ácido Caféico foi relatada em uma publicação em uma revista internacional da área (Anexo 3). A Tabela 10 mostra as estatísticas finais dos refinamentos de ambas as estruturas. Após o refinamento das mesmas, elas apresentaram valores de R_{cryst} e R_{free} , e de estequiometria comparáveis a estruturas já elucidadas nessa mesma faixa de resolução (Tabela 10). A análise destas estruturas foi capaz de revelar importantes dados a respeito do mecanismo de inibição da ação mitotóxica das Lys49-PLA₂s.



Figura 42: Cristais de Piratoxina I (PrTX-I) co-cristalizada com inibidores vegetais. a. PrTX-I-Ácido Caféico; b. PrTX-I-Ácido Aristolóquico.

Tabela 9: Estatísticas de coleta e processamento de dados dos complexos PrTX-I-Ácido Caféico e PrTX-I-Ácido Aristolóquico.

Números entre parênteses representam a faixa de mais alta resolução.

	PrTX-I-Ácido Caféico	PrTX-I-Ácido Aristolóquico
Cela Unitária (Å)	a = 39,2, b = 72,0, c = 44,6, β = 102,8	a = 39,2, b = 72,0, c = 44,6, β = 102,9
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2
Resolução (Å)	37,35-1,65 (1,73-1,65)	25,61-1,96 (2,03-1,96)
Reflexões únicas	27856 (3444)	15978 (1548)
Completeza(%)	94,6 (93,8)	99,7 (99,9)
R _{merge} ^a	6,5 (39,5)	10,1 (53,2)
Fonte de radiação	Radiação Síncrotron (Linha MX2, LNLS)	Radiação Síncrotron (Linha MX2, LNLS)
Temperatura da coleta de dados (K)	100	100
I/σ(I) médio	27,4 (2,34)	14,33 (2,02)
Redundância	2,8 (2,7)	5,1 (4,2)
Coefficiente de Matthews V _M (Å ³ Da ⁻¹)	2,2	1,91
Moléculas na unidade assimétrica	2	2
Conteúdo de solvente (%)	44,2	35,5

^a Rmerge = $\sum hkl(\sum_i(|I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle|) / \sum hkl, i \langle I_{hkl} \rangle)$, onde I_{hkl,i} é a intensidade de uma medida individual da reflexão com os índices de Miller h, k and l, e $\langle I_{hkl} \rangle$ é a intensidade média de cada reflexão. Calculado para I > -3σ(I). Dados processados pelo programa HKL 2000 (Otwinowski & Minor, 1997)

Tabela 10: Estatísticas do refinamento dos complexos PrTX-I-Ácido Caféico e PrTX-I-Ácido Aristolóquico.

	PrTX-I-Ácido Aristolóquico	PrTX-I-Ácido Caféico
Resolução (Å)	25,61-1,96 (2,03-1,96) ^a	37,34-1,65 (1,70-1,65) ^a
Reflexões únicas	15848 (1541) ^a	27814 (2724) ^a
Completeza (%)	99,22 (98,59) ^a	94,47 (92,59) ^a
R _{merge} ^b	6,3 (49,0) ^a	12,9 (35,3) ^a
I/σ médio (I)	14,40 (3,23) ^a	5,29 (1,78) ^a
R _{cryst} ^c (%)	17,30	18,23
R _{free} ^d (%)	23,04	22,87
Número de átomos não-hidrogênio		
Proteína	1749	1849
Ligantes	60	108
Água	174	289
RMS (ligações) ^e	0,007	0,008
RMS (ângulos) ^e	1,14	1,18
Valor médio do Fator de Temperatura (Å ²) ^e		
Proteína	31,00	32,10
Ligantes	54,40	56,40
Solvente	37,10	40,60
Ramachandran favoráveis (%) ^e	98	95
Ramachandran não permitidos(%) ^e	0	0
Clashscore ^f	4,77	11,37

^a Números entre parênteses representam a faixa de mais alta resolução. ^b Rmerge = $\sum hkl(\sum_i(|I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle|) / \sum hkl, i \langle I_{hkl} \rangle)$, onde I_{hkl,i} é a intensidade de uma medida individual com os índices de Miller h, k e l, e $\langle I_{hkl} \rangle$ é a intensidade média de cada reflexão. Calculado para I > 3σ(I). ^c Rcryst = $\sum hkl(|F_{obs} - F_{calc}|) / \sum hkl |F_{obs}|$, onde |F_{obs}| e |F_{calc}| são as amplitudes dos fatores de estrutura observados e calculados. ^d Rfree é equivalente ao Rcryst, mas calculado com base em 5% do total de reflexões obtidas. ^e Calculado pelo programa Phenix (Adams *et al.* 2002)

As estruturas cristalográficas dos complexos PrTX-I-Ácido Aristolóquico (PrTX-I-AA) e PrTX-I-ácido caféico (PrTX-I-AA) apresentam dois monômeros na unidade assimétrica e foram refinadas no modelo do dímero alternativo (Figura 43). Além disso, a estrutura da PrTX-I-AA apresenta uma molécula e a estrutura da PrTX-I-AA apresenta três moléculas de PEG 4000 no canal hidrofóbico, ou seja, como discutido na seção anterior (5.1.1), a PrTX-I aparece em sua forma ativa.

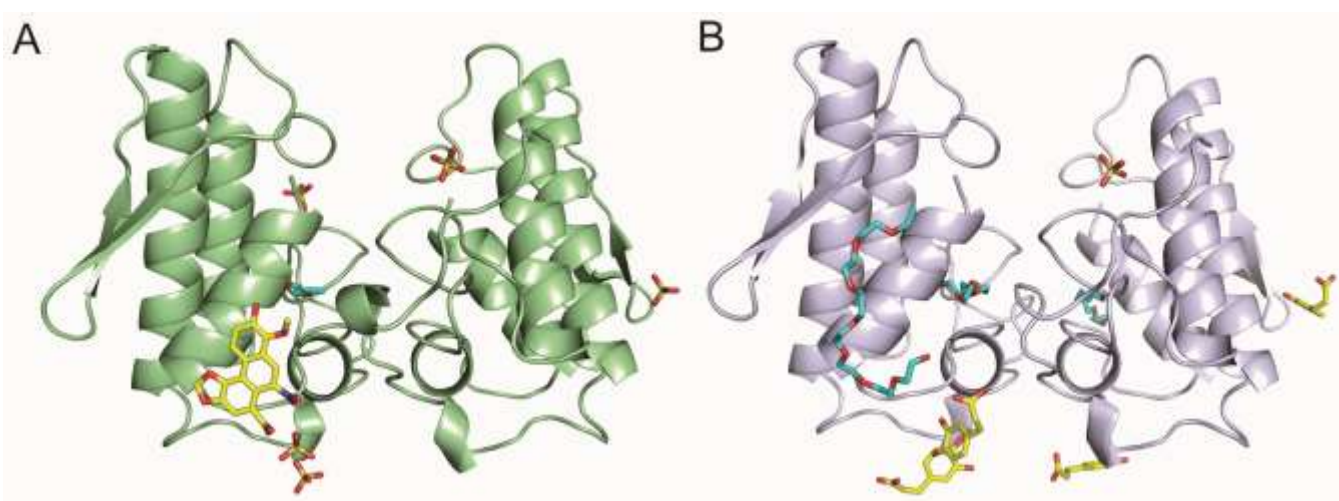


Figura 43: Representação em *cartoon* da estrutura cristalográfica de (A) PrTX-I co-cristalizada com ácido aristolóquico e (B) PrTX-I co-cristalizada com ácido caféico. As moléculas de PEG (azul), sulfato e ácido caféico e ácido aristolóquico (amarelo) estão representados em *sticks*;

A análise do complexo PrTX-I-Ácido Caféico revelou a presença de três moléculas de ácido caféico ocupando a região que em muitas estruturas se observa a presença dos íons sulfato, inclusive interagindo os resíduos anteriormente propostos como sítio miotóxico, e neste trabalho denominados de sítio MDoS (Lys20, Lys115, Arg118) (Figura 44).

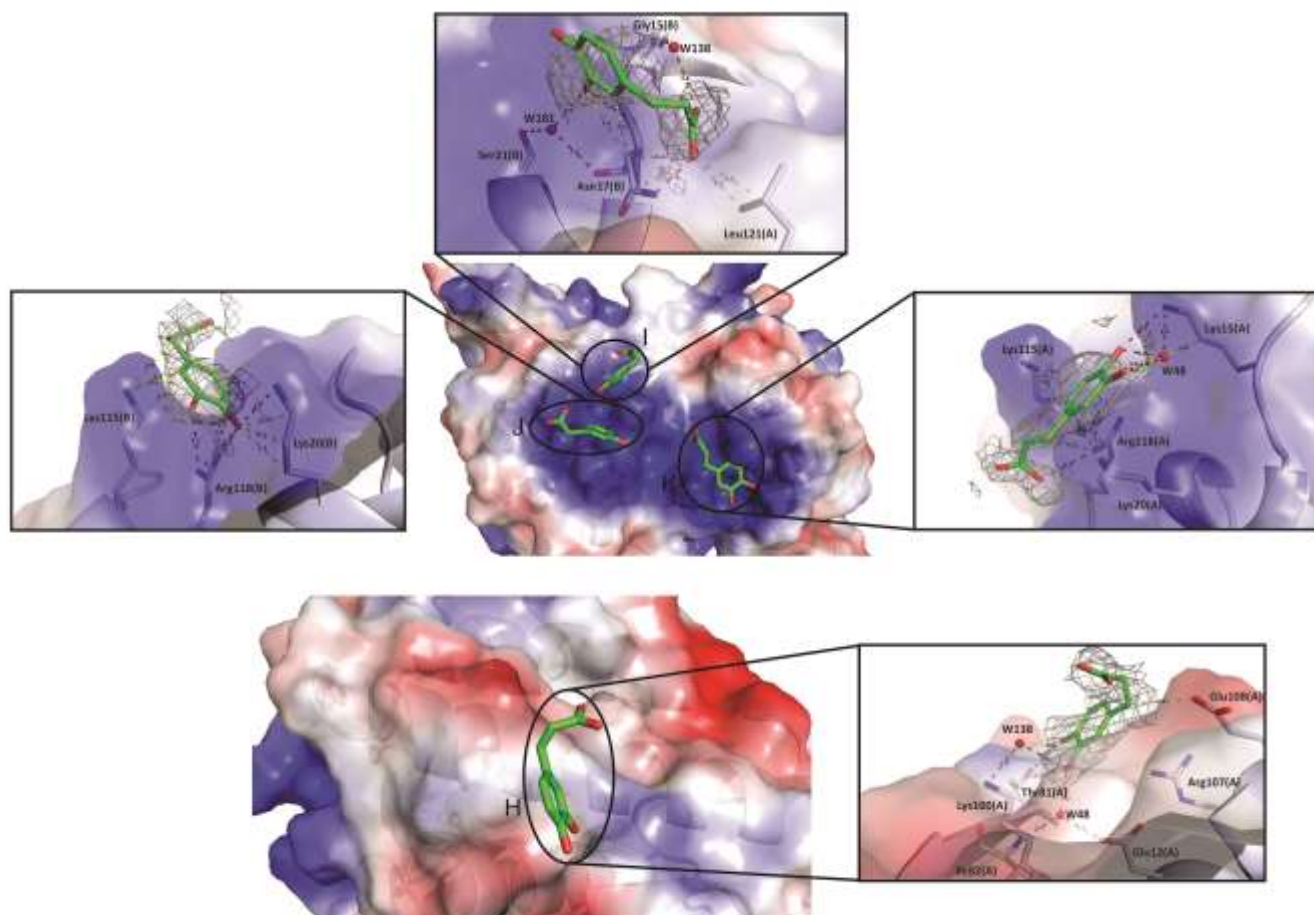


Figura 44: Representação da área de superfície da estrutura do complexo PrTX-I-Ácido Cafêico, mostrando a densidade eletrônica gerada por *omitting-map* das moléculas de ácido cafêico e as suas interações com os resíduos da estrutura PrTX-I-Ácido Cafêico. Distância em Å.

A análise funcional realizada pelo MsC. Fábio Florença Cardoso comparando o dano muscular direto no diafragma de camundongos causado pela PrTX-I e PrTX-I-Ácido Cafêico mostrou que a incubação com o ácido cafêico pode inibir em torno de 34%, na proporção proteína/inibidor 1:1 e 50%, na proporção 1:5, do dano muscular provocado pela PrTX-I (Figura 45). Estes índices foram obtidos pela análise de três campos microscópicos diferentes e o número de fibras com lesão foi representado como porcentagem do número total de fibras (normais + lesadas).

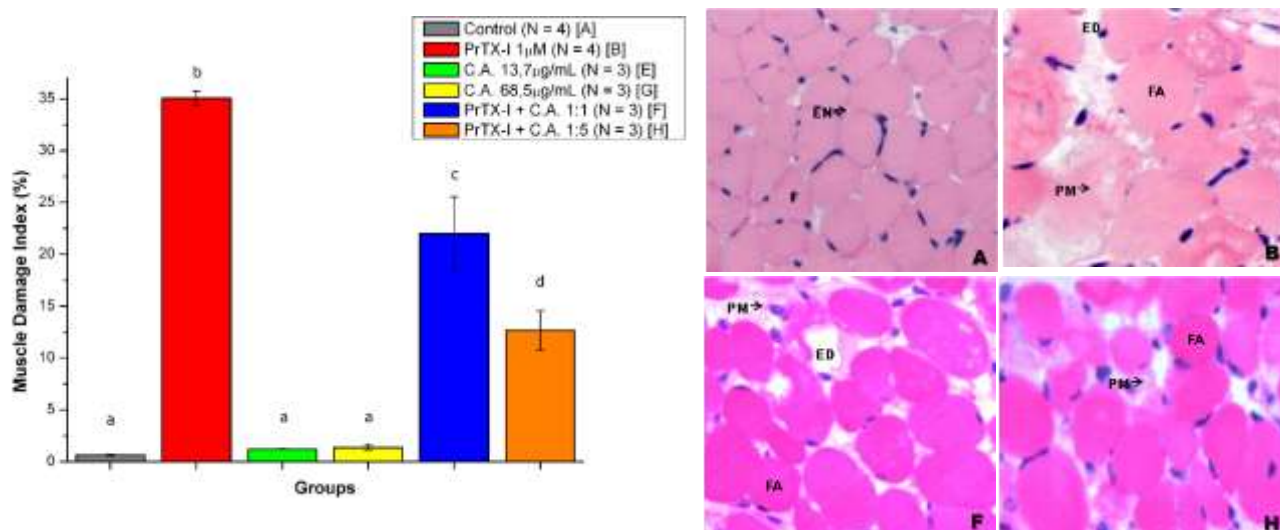


Figura 45: Efeito do ácido caféico sobre o dano muscular causado pela PrTX-I no diafragma de camundongos, com as respectivas fotos das lâminas de microscopia ótica de cada grupo experimental. EN: Endomísio; ED: Edema, FA: Fibras arredondadas; PM: Perda de miofilamentos (n=3).

Deste modo, podemos concluir que a inibição provocada pelo o ácido caféico a ação miotóxica das Lys49-PLA₂s botrópicas se dá porque ele se liga ao sítio MDoS (Lys20-Lys115-Arg118) destas proteínas, dificultando a estabilização da proteína sobre a membrana e, conseqüentemente, o rompimento da membrana pelo sítio MDiS.

A análise do complexo PrTX-I-Ácido Aristolóquico (Figura 46) revelou a presença de uma molécula de ácido aristolóquico no N-terminal, próximo a Lys7, interagindo com os resíduos Leu10 e Gln11 e com um resíduo da porção C-terminal (Leu121). Moléculas de polietilenoglicol 4000 (PEG4K), ácido esteárico e cloro já foram encontradas ligadas à região compreendida pela Lys7, Leu10 e Gln11 nas estruturas da PrTX-I nativa, BthTX-I complexada com PEG 4000 e MjTX-II complexada com ácido esteárico (Watanabe *et al.*, 2005; dos Santos *et al.*, 2009; Fernandes *et al.* 2010).

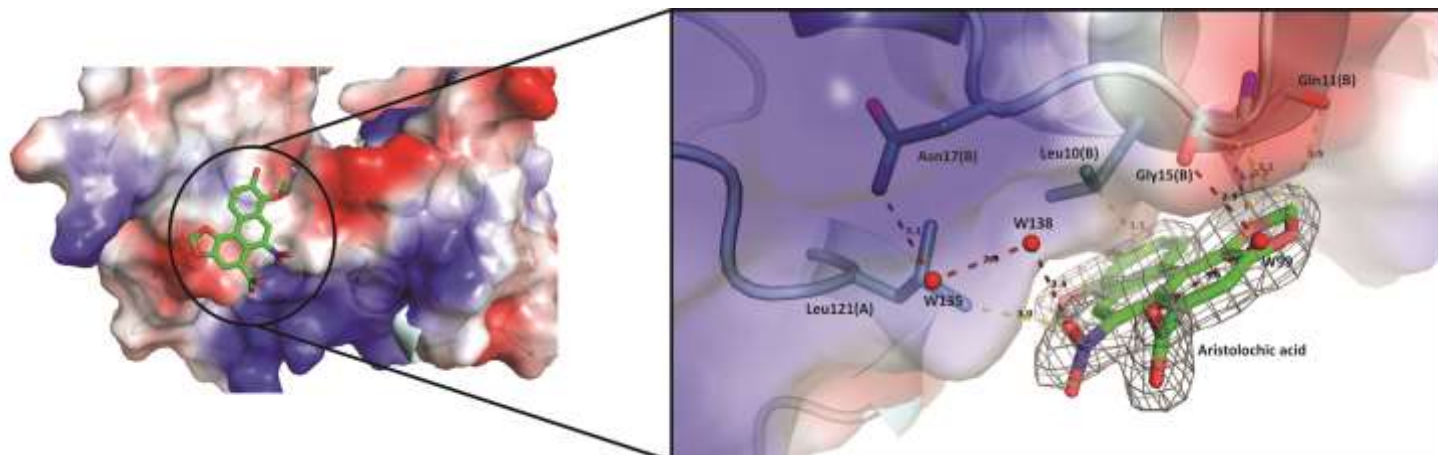


Figura 46: Representação em da área de superfície da estrutura do complexo PrTX-I-Ácido Aristolóquico, mostrando a densidade eletrônica gerada por *omitting-map* da molécula de ácido aristolóquico caféico e as suas interações com os resíduos da estrutura PrTX-I-Ácido Aristolóquico. Distância em Å.

A análise funcional realizada pelo MsC. Fábio Florença Cardoso comparando o dano muscular direto no diafragma de camundongos causado pela PrTX-I e PrTX-I-Ácido Aristolóquico mostrou que a incubação com o ácido aristolóquico pode inibir em torno de 43%, na proporção proteína/inibidor 1:1 do dano muscular provocado pela PrTX-I (Figura 47). Interessantemente, na proporção 1:5, o ácido aristolóquico não provocou nenhuma inibição na ação da PrTX-I. Estes índices foram obtidos através da análise de três campos microscópicos diferentes e o número de fibras com lesão foi representado como porcentagem do número total de fibras (normais + lesadas).

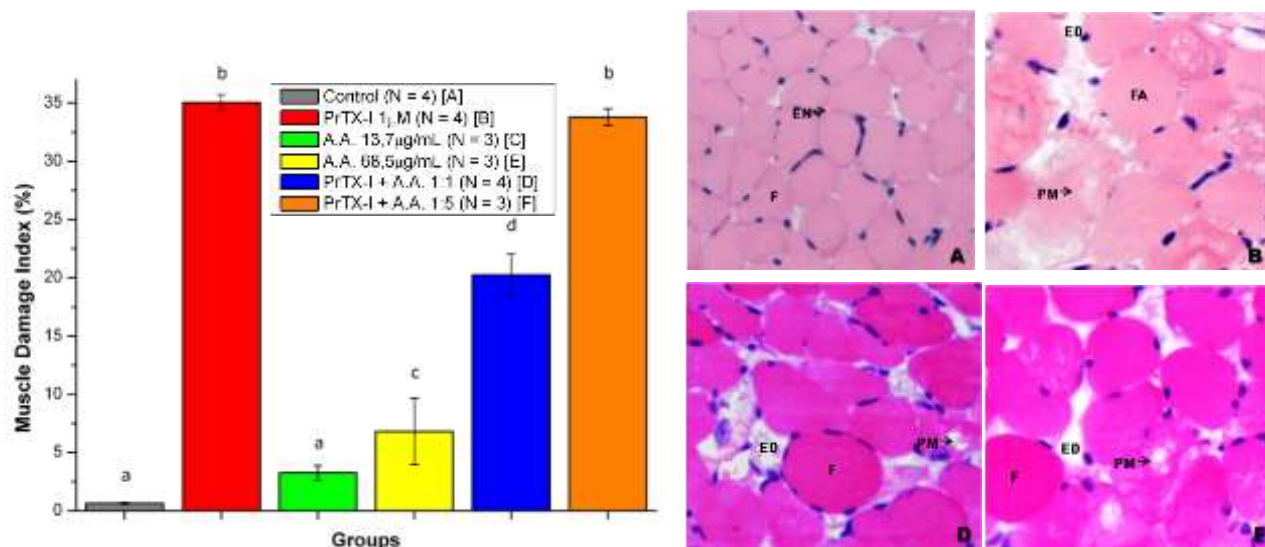


Figura 47: Efeito do ácido aristolóquico sobre o dano muscular causado pela PrTX-I no diafragma de camundongos, com as respectivas fotos das lâminas de microscopia ótica de cada grupo experimental. EN: Endomísio; ED: Edema, FA: Fibras arredondadas; PM: Perda de miofilamentos (n=3).

Desse modo, podemos concluir que a inibição causada pelo ácido aristolóquico sobre ação miotóxica das Lys49-PLA₂s botrópicas se dá pela ligação parcial a um resíduo do sítio HDMS (Leu121) e também ocupa uma região que dificulta o acesso dos sítios MDoS e MDiS à membrana. Atualmente, ambos os complexos obtidos (PrTX-I-Ácido Caféico e PrTX-I-Ácido Aristolóquico) estão em fase final de análise, assim como a redação de um artigo que compila todas as informações fornecidas por estes complexos, que será submetido a uma revista internacional da área.

5.1.3 Estudos estruturais com a Moojenitoxina-I (MjTX-I) isolada do veneno de *Bothrops moojeni* – uma Lys49-PLA₂ que pode adotar diferentes conformações oligoméricas.

A MjTX-I é uma Lys49-PLA₂ isolada do veneno de *Bothrops moojeni*, que após a cristalização e a elucidação da estrutura, interessantemente, apresentou quatro monômeros na unidade assimétrica (Marchi-Salvador *et al.*, 2005), ao contrário de todas as outras Lys49-PLA₂, que sempre apresentaram um ou dois monômeros na unidade assimétrica (Murakami *et al.*,

2007; dos Santos *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2010). Além disso, resultados anteriores de géis de eletroforese em condições não-desnaturantes já mostravam que esta proteína poderia formar oligômeros maiores como trímeros e pentâmeros (Soares, Andrião-Escarso *et al.*, 2000). Inicialmente, após a obtenção do cristal pelo sistema difusão de vapor *hanging-drop* (0,15 M MgCl₂, 32% w/v PEG4000 e 0,1 M Tris HCl pH8,5) (Marchi-Salvador *et al.*, 2005) e dos dados de difração de raios X (coletados na linha MX1-LNLS Brasil) procedeu-se o refinamento completo da estrutura cristalográfica da MjTX-I (Tabela 11; Figura 48), utilizando como modelo para substituição molecular as coordenadas do monômero A estrutura da PrTX-II (PDB ID 1QLL).

Tabela 11: Estatísticas finais de coleta de dados e do refinamento da estrutura cristalográfica da Moojenitoxina-I (MjTX-I).

Cela unitária (Å, °)	a=57,59; b=125,85; c=65,33; β=105,9
Grupo espacial	C2
Resolução (Å)	33,44 – 2,49 (2,55 – 2,49) ^a
Reflexões únicas	15300 (1541) ^a
Completeza (%)	98,0 (98,9) ^a
I/σ (I)	20,64 (4,69) ^a
Redundância	3,1 (3,1) ^a
Moléculas na unidade assimétrica	4
Coefficiente de Matthews V _M (Å ³ Da ⁻¹)	2,12
R _{merge} (%)	5,7 (22,0) ^a
R _{cryst}	25,13
R _{free}	26,27
Número de átomos não-hidrogênio	
Proteína	3544
Água	113
Polietilenoglicol	3
Fator temperature médio (Å ²) ^b	
Total	50,89
Ramachandran plot (%) ^c	
Resíduos em regiões permitidas	95,1
Resíduos em regiões não permitidas	1,8

^a Número em parênteses referem-se a camada de mais alta resolução.

Calculado com o programa CNS (Brunger *et al.*, 1998).

^c Calculado com o programa MolProbity (Chen *et al.*, 2010).

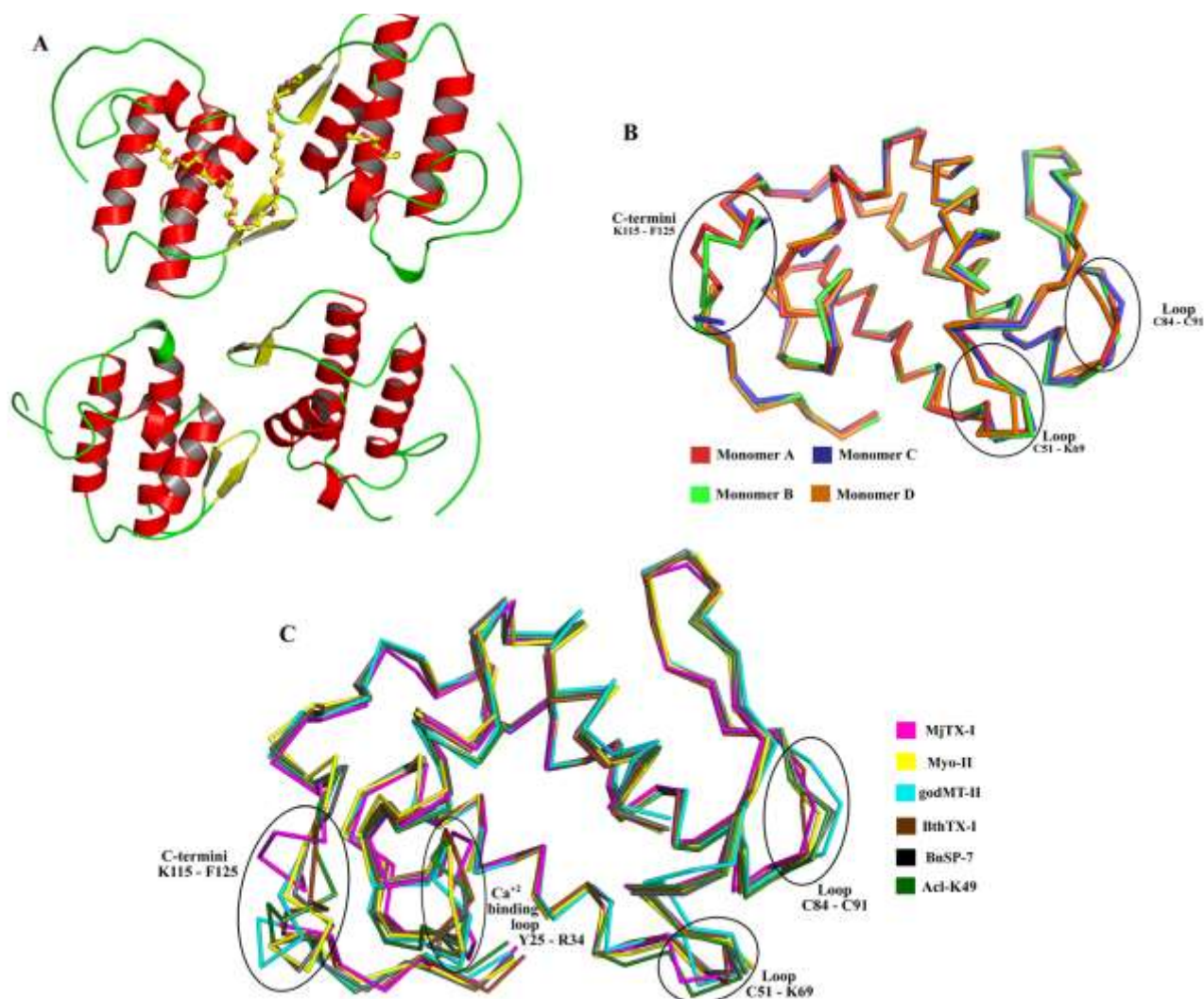


Figura 48: (A) Representação em *cartoon* da estrutura cristalográfica da Moojenitoxina-I (MjTX-I). (B) Sobreposição dos átomos C_{α} dos quatro monômeros que constituem a estrutura da MjTX-I, com destaque para as regiões que apresentam maior r.m.s.d. (C) Sobreposição dos átomos C_{α} dos monômeros A da estrutura cristalográfica da MjTX-I, da BnSP-7 (PDB ID 1PA0), Myo-II (PDB ID 1CLP), do monômero B da estrutura cristalográfica da BthTX-I (PDB ID 3HZD) e das estruturas cristalográficas da godMT-II (PDB ID 1GOD) e Acl-K49 (PDB ID 1S8H).

A sobreposição dos átomos C_{α} da MjTX-I com monômeros de diversas estruturas cristalográficas de Lys49-PLA₂s botrópicas depositadas no Protein Data Bank (PDB) resultaram em um *root square mean deviation* (r.m.s.d.) de aproximadamente 1 Å. Esta mesma sobreposição realizada com Lys49-PLA₂s não botrópicas resulta e um r.m.s.d. de aproximadamente 1.4 Å. A sobreposição dos protômeros da MjTX-I com os monômero da BnSP-7 de *B. pauloensis* (PDB ID 1PA0), Myo-II de *B. asper* (PDB ID 1CLP), BthTX-I de *B. jararacussu* (PDB ID 3HZD), godMT-II de *Cerrophidion godmani* (PDB ID 1GOD) e Acl-K49

de *Agkistrodon contortrix laticinctus* (PDB ID 1S8H) mostrou que as principais diferenças entre estas estruturas estão concentradas na região do *loop* de ligação de Ca^{2+} (Tyr25-Arg34), *loops* Cys51-Lys69 e Cys84-Cys91 e na região C-terminal (Lys115-Phe125) (Figura 48). A sobreposição dos átomos C_α da região C-terminal com as demais proteínas resulta em um r.m.s.d. médio de 1,7 Å, enquanto essa mesma sobreposição realizada com os átomos C_α da região C-terminal da MjTX-I resulta em um r.m.s.d. médio de 2,3 Å. Estes dados mostram que a região C-terminal da MjTX-I apresenta um desvio estrutural maior comparado ao C-terminal de outras Lys49-PLA₂s.

Os quatro monômeros encontrados na unidade assimétrica da cela unitária do cristal de MjTX-I formam dois dímeros similares aos chamados “dímeros convencionais”, encontrados nas demais Lys49-PLA₂s. Estes dímeros são unidos pelas interfaces A/B e C/D, que apresentam um grande número de ligações de hidrogênio, pontes salinas (Tabela 12) e de contatos de van der Waals (Tabela 13) que contribuem significativamente para a estabilização oligomérica. Cabe ressaltar que no caso desta estrutura não foi encontrado a possibilidade de escolha do “dímero alternativo” na unidade assimétrica como encontrado nas demais Lys49-PLA₂s.

Tabela 12: Listagem dos resíduos e átomos envolvidos em ligações de hidrogênio e pontes salinas nas interfaces dos monômeros que constituem a estrutura cristalográfica da MjTX-I.

	Resíduos/átomos envolvidos	Distância (Å)
Ligações de hidrogênio	A: Q11 [O]; B: W77 [NE1]	2.77
	A: E12 [OE2]; B: K80 [NZ]	2.71
	A: E12 [O]; B: W77 [NE1]	3.56
	A: K80 [O]; B: K80 [NZ]	2.76
	A: W77 [NE1]; B: Q11[O]	3.13
	A: K80 [NZ]; B: E12 [OE2]	2.60
	A: W77 [NE1]; B: E12[O]	3.48
	A: K80 [NZ]; B: K80 [O]	2.66
	C: W77 [NE1]; D: Q11[O]	2.95
Pontes salinas	A: E12 [OE1]; B: K80 [NZ]	3.47
	A: E12 [OE2]; B: K80 [NZ]	2.71
	A: K80 [NZ]; B: E12 [OE1]	3.21
	A: K80 [NZ]; B: E12 [OE2]	2.60
	C: E12 [OE1]; D: K80 [NZ]	2.88
	C: E12 [OE2]; D: K80 [NZ]	2.39
	C: K80 [NZ]; D: E12 [OE2]	3.70

Tabela 13: Listagem dos resíduos envolvidos em contatos de van der Waals nas interfaces dos monômeros que constituem a estrutura cristalográfica da MjTX-I.

Interface A/B	Interface A/C	Interface A/D	Interface B/D	Interface C/D
L10 (A)/W77 (B)	N60 (A)*/N114 (C)	D76 (A)*/E87 (D)*	N114 (B)/N60 (D)*	Q11 (C)/G15 (D)
Q11 (A)/W77 (B)	N88 (A)/Y113 (C)	K78 (A)*/E87 (D)*	N114 (B)/C91 (D)	E12 (C)/K80 (D)
Q11 (A)/K80 (B)	P90 (A)/K110 (C)*	E86 (A)/D76 (D)*	K115 (B)/N60 (D)*	W77 (C)/Q11 (D)
E12 (A)/W77 (B)	P90 (A)/G111 (C)	E86 (A)/K78 (D)	K116 (B)/N60 (D)*	W77 (C)/E12 (D)
E12(A)/K80 (B)	P90 (A)/T112 (C)	E86 (A)/V83 (D)		W77 (C)/T13 (D)
T13 (A)/W77 (B)				W77 (C)/G15 (D)
G15 (A)/W77 (B)				W77 (C)/K80 (D)
W77 (A)/L10 (B)				N79 (C)/R107 (D)
W77 (A)/Q11 (B)				K80 (C)/Q11 (D)
W77 (A)/E12 (B)				K80 (C)/E12 (D)
W77 (A)/T13 (B)				K80 (C)/K80 (D)
W77 (A)/G15 (B)				K80 (C)/T81 (D)
W77 (A)/W77 (B)				K80 (C)/R107 (D)
W77 (A)/K80 (B)				T81 (C)/K80 (D)
N79 (A)/R107 (B)				R107 (C)/N79 (D)
K80 (A)/E11 (B)				R107 (C)/K80 (D)
K80 (A)/Q12 (B)				
K80 (A)/W77 (B)				
K80 (A)/K80 (B)				
K80 (A)/T81 (B)				
K80 (A)/R107 (B)				
T81 (A)/K80 (B)				
R107 (A)/N79 (B)				
R107 (A)/K80 (B)				

* Resíduos presentes apenas na sequência primária da MjTX-I (Ver Figura 51).

Com o intuito de se analisar com maiores detalhes o comportamento oligomérico desta proteína, diversos estudos foram realizados com a proteína em solução, incluindo: espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS), espalhamento de luz dinâmico (DLS) e cromatografia analítica de exclusão molecular, que serão apresentados a seguir.

As medidas de SAXS revelaram que a MjTX-I [5,0 mg.ml⁻¹] quando dissolvida em água apresenta um raio de giro (R_g) de $1,67 \pm 0,50$ nm e uma massa de 18 ± 3 kDa. Já quando a amostra de MjTX-I foi dissolvida em tampão 20 mM Tris HCl pH 8,0, apresentou um R_g de $2,62 \pm 0,30$ nm e uma massa $\sim 43,6$ kDa. Estes dados mostram a importância do meio físico-químico para a oligomerização desta proteína. De fato, as curvas teóricas de SAXS (calculadas pelo Crysol) obtidas a partir de um dos monômeros ou do dímero, apresenta um excelente ajuste das curvas experimentais obtidas pela amostra dissolvida em água e em Tris HCl,

respectivamente (Figura 49). Além disso, a sobreposição do modelo *ab initio* gerado a partir dos dados de SAXS com os dímeros convencional e alternativo mostra que a melhor sobreposição é realizada com o dímero convencional (Figura 49). Estes dados mostram que a MjTX-I não formou dímeros alternativos em nossos experimentos.

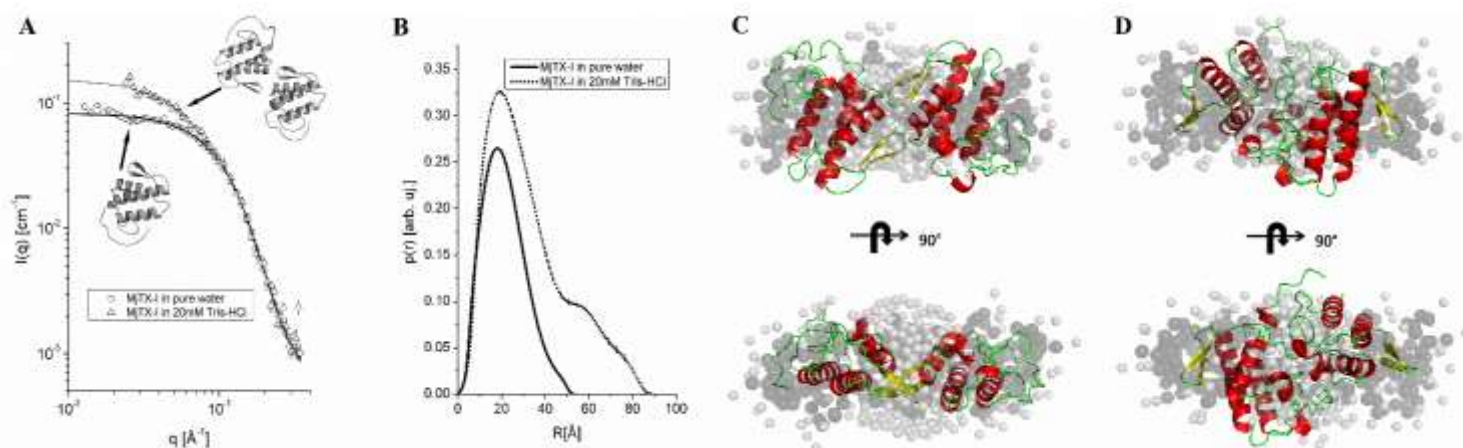


Figura 49: Experimentos de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) da MjTX-I. (A) Curvas teóricas (linhas contínuas) para os estados monomérico e dimérico (calculado pelo software Crysol a partir da estrutura cristalográfica) da MjTX-I e a curva obtida por SAXS (círculos) com a amostra dissolvida em água e em 20 mM Tris HCl. (B) Função da distribuição de distâncias, $p(r)$, após o uso da transformada inversa de Fourier. (C) Sobreposição do dímero convencional (em *cartoon*) com o envelope *ab initio* calculado a partir da curva de SAXS (superfície cinza). (D) Sobreposição do dímero alternativo (em *cartoon*) com o envelope *ab initio* calculado a partir da curva de SAXS.

Os experimentos de DLS também mostraram que a MjTX-I é predominantemente monomérica em água ultra-pura a $1,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, apresentando uma distribuição molecular unimodal (Polidispersividade = 16,5%), com uma massa molecular de aproximadamente 19 kDa, calculada a partir do raio hidrodinâmico (R_H) obtido de 2,1 nm (Tabela 14). Este resultado é baseado no fato que a massa molecular da MjTX-I é aproximadamente 14 kDa. Por outro lado, as medidas de DLS também indicaram uma oligomerização após o aumento gradual na concentração de Tris HCl (mesmo tampão usado nas condições de cristalização) e após duas horas de incubação com esse tampão (Tabela 14). Após a incubação com o Tris HCl, a MjTX-I parece assumir uma forma dimérica a 0,5; 2,0 e 10 mM Tris HCl ($R_H = 2,7 - 2,8 \text{ nm}$; média

de massa molecular $\approx 33 - 37$ kDa), e uma forma tetramérica a 20 mM Tris HCl ($R_H = 3,7$ nm; média de massa molecular ≈ 70 nm).

Tabela 14: Raio hidrodinâmico e porcentagem de polidispersividade obtidos por experimentos de espalhamento de luz dinâmico (DLS) da MjTX-I. Os experimentos foram realizados com a proteína dissolvida em água ultra pura e em diferentes concentração de Tris HCl pH 8,0 (0,5; 2,0; 5,0; 10,0 e 20 mM). No caso das medidas realizadas na presença do tampão, elas foram obtidas após imediatamente a sua adição e duas horas depois. Os círculos em cinza correspondem a conformação oligomérica obtida em cada condição experimental.

	R (nm)	MW (kDa)	% Pd	% Mass	
Water	2,1	19	16,5	99,6	●
0,5 mM	2,1	19	19,3	99,4	●
0,5 mM*	2,7	33	37,6	99,8	●●
2,0 mM	1,9	15	17,6	99,8	●
2,0 mM*	2,8	37	32,3	99,3	●●
10 mM	1,9	15	15,8	99,8	●
10 mM*	2,8	37	28,6	99,8	●●
20 mM	3,7	71	25,3	97,6	●●●

* Após duas horas de adição do Tris HCl

Em seguida, foi realizada uma cromatografia analítica de exclusão molecular com a MjTX-I purificada utilizando uma coluna Superdex 75 10/300 GL (GE HealthcareTM) equilibrada com 20 mM Tris-HCl pH 8,0 a 20°C. A cromatografia de exclusão molecular mostrou uma curva larga de absorvância a 280 nm durante a eluição da MjTX-I da coluna (Figura 49), confirmando a presença de diversas conformações oligoméricas a 20 mM Tris HCl pH 8,0. Baseado na curva de calibração obtida a partir das proteínas padrão e no gel de eletroforese realizado com as frações eluídas é possível se atestar a ocorrência de monômeros, dímeros e tetrâmeros na solução eluída (Figura 50).

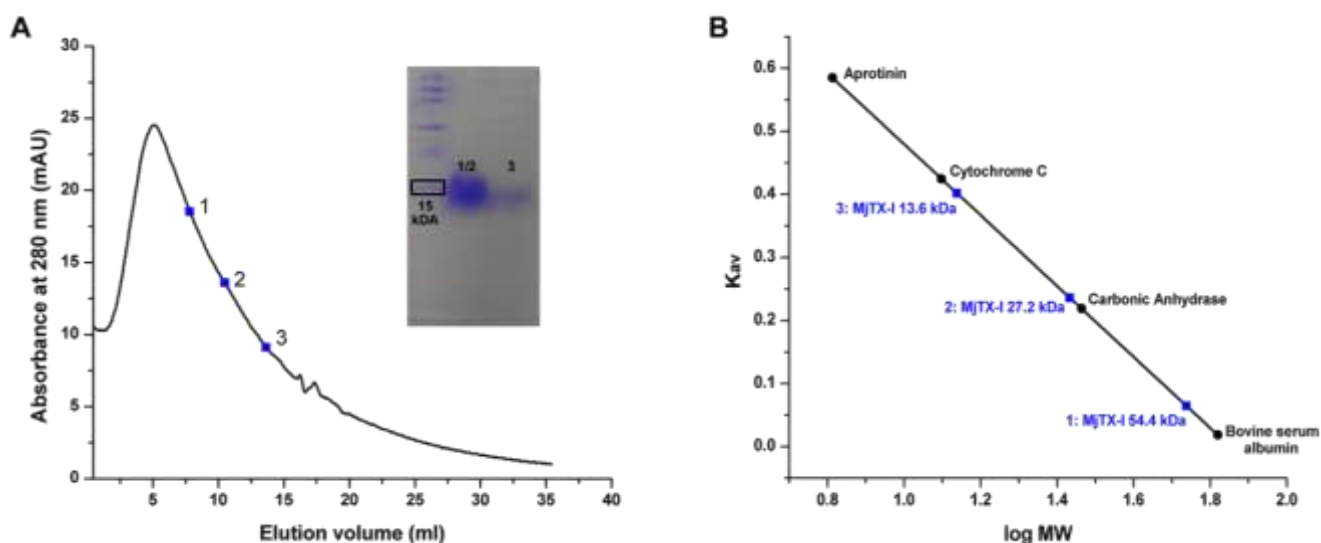


Figura 50: (A) Cromatografia de exclusão analítica da MjTX-I em 20 mM Tris HCl pH 8,0. O gel de eletrorese 13% SDS-PAGE mostra frações da MjTX-I eluídas em diferentes posições do pico obtido. Linha I: marcador molecular da Bio-Rad Laboratories, Inc; Linha II: MjTX-I coletada nos volumes de eluição correspondentes aos pontos 1 e 2 do cromatograma; Linha III: MjTX-I coletada no volume de eluição correspondente ao ponto 3 do cromatograma. (B) Curva de calibração utilizando proteínas padrão de massa molecular conhecida mostra as diferentes conformações oligoméricas da MjTX-I em 20 mM Tris HCl pH 8,0. As proteínas padrão de massa molecular conhecida foram obtidas a partir do quito de calibração para gel filtração de proteínas de baixa massa molecular da empresa Sigma-Aldrich™ que contém os seguintes componentes: blue dextran (2000 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), citocromo C (12.4 kDa), e aprotinina (6.5 kDa).

Os experimentos de DLS e cromatografia de exclusão molecular mostram claramente uma tendência de oligomerização e a ocorrência de diversas conformações oligoméricas desta proteína. Portanto, o arranjo estrutural de quatro moléculas encontrado na unidade assimétrica pode refletir uma conformação oligomérica fisiologicamente relevante. Analisando a estrutura cristalográfica desta proteína (Figura 48; Tabelas 12 e 13), é possível se observar diversas características estruturais que justificam esta oligomerização. Em diversas proteínas oligoméricas tem sido observada uma maior frequência de aminoácidos carregados e polares nas interfaces dos monômeros do que nas regiões internas, enquanto que os resíduos hidrofóbicos são menos comuns nas interfaces (Janin *et al.*, 1988; Tsai *et al.*, 1997; D'Alessio, 1999). A estrutura cristalográfica da MjTX-I apresenta um padrão semelhante com uma alta frequência de resíduos carregados e polares nas interfaces entre os monômeros que compõem a estrutura da MjTX-I. Estas interfaces apresentam 40,7 % de aminoácidos carregados, 39,5% de

aminoácidos polares e 22,2% de hidrofóbicos, enquanto que as regiões internas apresentam 27,8% de aminoácidos carregados, 32,7% de polares e 39,3% de hidrofóbicos. Além disso, oito resíduos polares encontrados nas interfaces dos monômeros A/C, B/D e A/D (~29% do total de resíduos) são encontrados apenas na MjTX-I, não estando presentes em outras Lys49-PLA₂s. Além disso, pelo menos um destes resíduos está presente nessas interfaces na condição de responsável por 50% das interações de van der Waals entre os monômeros destas interfaces (Tabela 13). Estes dados mostram a importância destes aminoácidos exclusivos da MjTX-I e são uma importante característica para a formação de oligômeros desta proteína.

A formação de dímeros convencionais pode ser justificada pela substituição de um resíduo de Tyr por um resíduo de Val na posição 119. A Tyr119 é um resíduo conservado em todas as Lys49-PLA₂s botrópicas, com exceção da MjTX-I, e ela é essencial para a estabilização do dímero alternativo por conta de uma ligação de hidrogênio realizada entre os O γ das Tyr119, uma de cada monômero (dos Santos *et al.*, 2009). Além disso, analisando o alinhamento da sequência de aminoácidos da MjTX-I com as demais Lys49-PLA₂s, podemos observar que na região C-terminal, além da mutação Tyr119Val, a MjTX-I apresenta uma série de outras mutações Tyr117Arg, Lys127Asp, Asp130Arg (Figura 51).

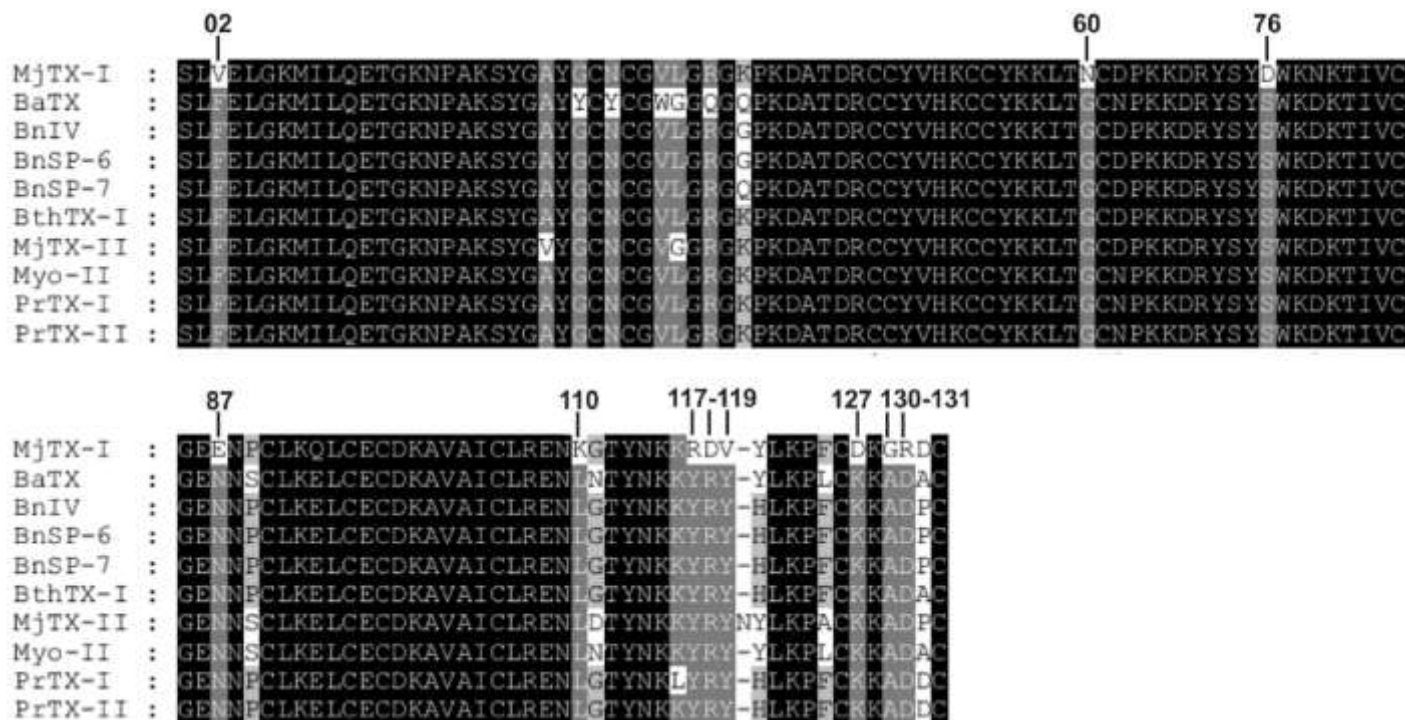


Figura 51: Alinhamento de seqüências de aminoácidos de Lys49-PLA2s do gênero *Bothrops*. Os números destacados acima do alinhamento se referem a posições que possuem aminoácidos conservados em outras Lys49-PLA2s, mas que não se conservam na seqüência da MjTX-I.

Como observado anteriormente, a região C-terminal é uma região diretamente ligado à expressão da atividade miotóxica e estas mutações podem ter um impacto direto à miotoxicidade da MjTX-I. O Dr. Walter L. G. Cavalcante realizou a medida de contração muscular indireta na junção neuromuscular nervo-frênico diafragma de camundongos e foi observado que o bloqueio das contrações indiretas não alcançou 50% ($t_{1/2}$) em 90 minutos com $1\mu\text{M}$ de MjTX-I (Figura 52). Estudos anteriores mostraram que o $t_{1/2}$ para $1\mu\text{M}$ de BthTX-I, PrTX-I e MjTX-II (também isolada do veneno de *Bothrops pirajai*) foi de, respectivamente, $40,3 \pm 3,5$ min; $49,0 \pm 6,9$ min e $35,2 \pm 2,0$ min (Cavalcante *et al.*, 2007). A MjTX-I só conseguiu apresentar valores de $t_{1/2}$ similares quando foi administrada numa concentração de $5\mu\text{M}$ ($29,6 \pm 1,7$ min) (Figura 52).

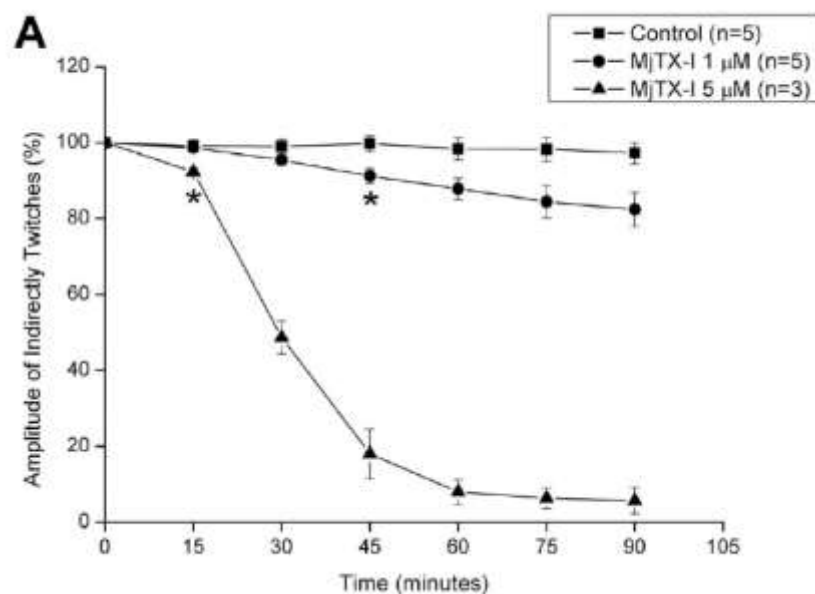


Figura 52: Efeito da MjTX-I sobre a contração muscular evocada indiretamente sobre a junção neuromuscular nervo frênico-diafragma de camundongos. O bloqueio neuromuscular foi produzido após a administração de 1 μM (círculos) e 5 μM (triângulos) em relação ao controle (quadrados). A ordenada representa a % da amplitude da contração em relação à amplitude da contração inicial. A abcissa representa o tempo após a aplicação da MjTX-I/tampão na preparação. As barras verticais representam o desvio em relação à média dos experimentos realizados e o asterisco indica diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$) ($n=3$).

Por fim, com o intuito de se entender a evolução e o parentesco desta intrigante Lys49-PLA₂, realizou-se uma análise filogenética baiesiana utilizando toda as sequências de aminoácido de Lys49-PLA₂s isoladas do veneno de serpentes do gênero *Bothrops* (Figura 53). Esta análise filogenética mostrou que como observado anteriormente, todas as Lys49-PLA₂s botrópicas agrupam-se em um mesmo ramo (dos Santos *et al.*, 2011). Apesar de suas características peculiares, a MjTX-I aparece como grupo irmão da PrTX-I e da PrTX-II, duas Lys49-PLA₂s diméricas isoladas do veneno de *Bothrops pirajai*. Entretanto, se analisarmos a árvore filogenética considerando as distâncias evolutivas de todas as Lys49-PLA₂s em relação ao seu ancestral comum, veremos que a MjTX-I é o ramo mais longo de toda a árvore, ou seja, foi a que mais acumulou diferenças em relação ao ancestral comum de todas as Lys49-PLA₂s. Esta característica evolutiva reflete as característica oligoméricas peculiares da MjTX-I e que deve ser um produto da evolução acelerada destas proteínas (Ogawa *et al.*, 1996).

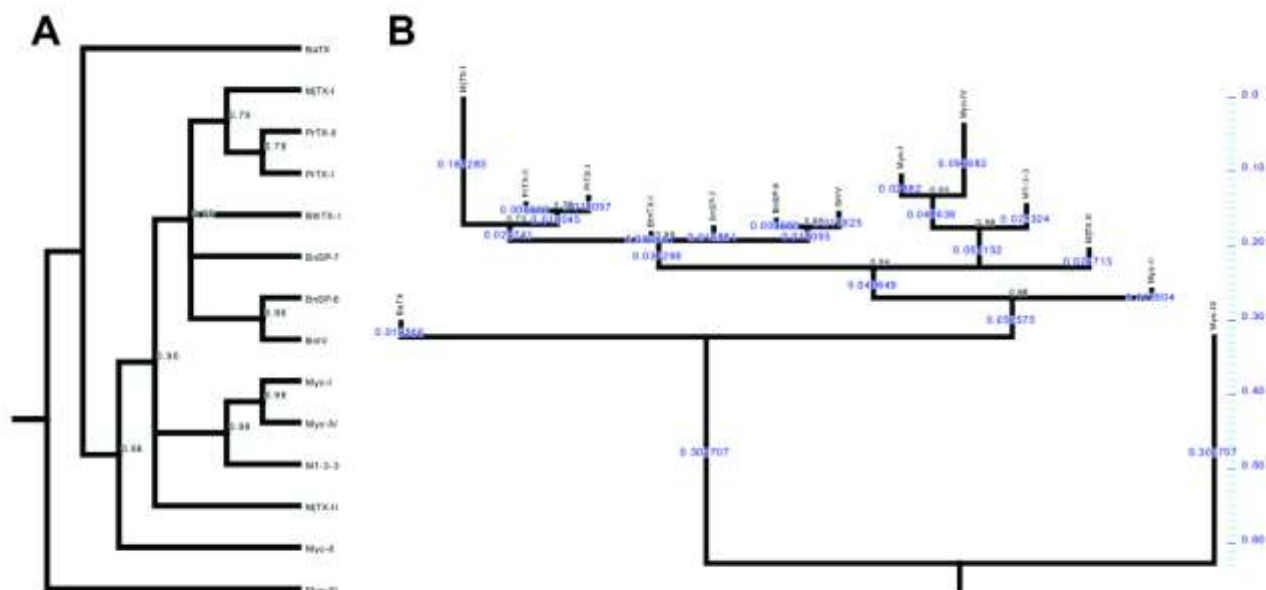


Figura 53: Árvore filogenética baiana de todas as Lys49-PLA₂s isoladas do veneno de serpentes do gênero *Bothrops* depositadas no NCBI protein database visualizada de maneira tradicional (A) e computando os comprimentos dos ramos (em azul) (B). Os valores de probabilidade posterior após 10⁶ ciclos estão indicados nos nós dos ramos. Nós com valores de probabilidade posterior menor que 0,75 foram colapsados. E-value mínimo das sequências foi de 3.10⁻⁴⁷.

A oligomerização de múltiplas e idênticas subunidades é uma maneira simples de se formar estruturas funcionais maiores de maneira geneticamente econômica (Pereira-Leal *et al.*, 2007). Em relação à evolução dos venenos em répteis, os genes encontrados no ancestral comum de todos os toxicoferanos evoluíram para formar venenos cada vez mais complexos, inclusive com a ocorrência de eventos de neofuncionalização, provocados pela associação covalente de toxinas de múltiplas unidades (Fry, 2005; Fry *et al.*, 2009). Neste caso, é possível se supor que as múltiplas conformações oligoméricas da MjTX-I podem ser um estado molecular intermediário desta proteína que em contínua evolução pode adquirir uma nova função como uma resposta a variação ambiental e a adaptação a captura de novas presas. A estrutura cristalográfica da MjTX-I foi depositada no PDB com a ID 3T0R e os dados aqui apresentados foram publicados em uma revista internacional da área (Anexo 04).

Capítulo 6
Inibidores plasmáticos de PLA₂s

Os venenos de serpentes são a principal arma destes animais para busca e apreensão de presas, assim como defesa contra predadores. Entretanto, alguns animais apresentam resistência ao envenenamento ofídico. Esta resistência se dá pela presença de fatores de neutralização proteicos encontrados no plasma sanguíneo destes animais, como os isolados de alguns mamíferos roedores e marsupiais (Fortes-Dias, 2002). Estes inibidores são encontrados também no plasma de diferentes espécies de serpentes, como, por exemplo, os inibidores endógenos de fosfolipases A₂ (PLIs), que devem ocorrer como autoproteção dessas serpentes contra o próprio veneno (Faure, 2000; Fortes-Dias, 2002). Os PLIs são glicoproteínas ácidas não-proteolíticas com massa molecular de 75 a 180 kDa que podem formar estruturas oligoméricas de três a seis subunidades (Fortes-Dias, 2002; Lizano *et al.*, 2003). Esses inibidores são classificados em três classes estruturais, α , β e γ , que podem ser encontrados ao mesmo tempo no veneno de uma mesma espécie de serpente (Lizano *et al.*, 2000). Os α e γ -PLIs foram encontrados em um grande número de espécies de serpentes, ao contrário das β -PLIs que foram encontrados em apenas três espécies de serpentes, sendo duas delas não peçonhentas (Faure, 2000; Fortes-Dias, 2002; Okumura *et al.*, 2002). Cada uma destas classes é caracterizada pela presença de domínios proteicos conhecidos. Os α -PLIs possuem um domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD *domain*) de lectinas do tipo C, que alguns autores afirmam que podem não se ligar à carboidratos (Ohkura *et al.*, 1997; Okumura *et al.*, 1999); os β -PLIs possuem um domínio de repetição de leucinas (LRR *domain*) (Lima *et al.*, 2011) e os γ -PLIs, os mais conhecidos e abundantes, que possuem domínios *three-finger* ricos em cisteínas (Nobuhisha *et al.*, 1998). De acordo com a classe a que o PLI pertence, ele mostra diferentes especificidades às fosfolipases A₂ (Okumura *et al.*, 1999).

Entretanto, o modo como se ligam às fosfolipases A₂ ainda é muito pouco conhecido assim como, a sua conformação oligomérica correta. Assim, na próxima seção (6.1 Resultados e Discussão) serão apresentados os resultados da investigação de dois PLIs: I) de um α -PLI

isolada do plasma de *Bothrops alternatus* (α BaltMIP) (seção 6.1.1) e II) um γ -PLI isolado do plasma de *Crotalus durissus terrificus* (CNF) (seção 6.1.2).

6.1 Resultados e Discussão

6.1.1 α BaltMIP, um inibidor de fosfolipase A_2 isolado do plasma sanguíneo de *Bothrops alternatus*

Do plasma da serpente *Bothrops alternatus* foi isolado um α -PLI, batizado como α BaltMIP que possui 24 kDa em sua forma monomérica e que foi demonstrado apresentar atividades inibitórias contra diversas fosfolipases A_2 de diferentes serpentes da América Latina (Santos-Filho *et al.*, 2011). No intuito de se obter maiores informações a respeito da estrutura tridimensional do α BaltMIP, foi construído um modelo teórico desta proteína a partir de técnicas de *threading* com a realização posterior de simulação de dinâmica molecular, utilizando como molécula *template* a estrutura cristalográfica da cadeia A da proteína D surfactante de pulmão (SP-D) (PDB ID 1PWB). O modelo teórico final do α BaltMIP (Figura 53) calculado após a simulação de dinâmica molecular apresentou uma boa qualidade geral (Z score = - 4,99) e uma excelente qualidade estereoquímica, com 97,9% de resíduos localizados nas regiões permitidas no gráfico de Ramachandran. A análise da estrutura teórica do α BaltMIP revela a presença de um “pescoço” formado por uma hélice alfa longa (*α -helical neck*) e um domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD *domain*), formado por duas hélices alfa e seis folhas beta (Figura 54).

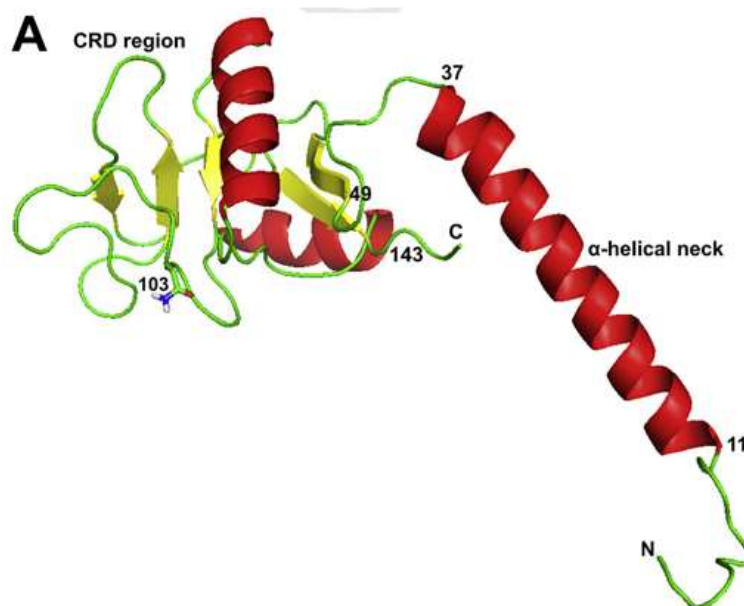


Figura 54: Representação em cartoon do modelo teórico da α BaltMIP obtido após 10 ns de dinâmica molecular. Os resíduos 11-37 e 49-143 correspondem, respectivamente às regiões de α -helical neck e domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD domain). O resíduo Asn103 está representando em *sticks* corresponde ao sítio de glicosilação e é conservado em todas as α -PLIs.

A análise do alinhamento das sequências de aminoácidos do α BaltMIP, de outros α PLIs isolados do plasma de outras serpentes e de proteínas SP-D humana e de camundongo mostra que as sequências de mamíferos apresentam uma inserção na região 97-109 (correspondendo a região 294-306 na sequência humana) (Figura 55). A comparação estrutural entre o modelo teórico final do α BaltMIP e da estrutura cristalográfica da SP-D humana mostra que esta inserção corresponde a um *loop* onde estão localizados os resíduos Asp297 e Glu301, que estão envolvidos na coordenação de dois íons Ca^{2+} (Shrive *et al.*, 2003). Um destes íons é responsável pela coordenação do outro íon Ca^{2+} e de um outro *loop*, que por sua vez, estão diretamente envolvidos na ligação de carboidratos (Shrive *et al.*, 2003). Desta forma, este “*loop* de ligação de Ca^{2+} ”, está ausente nas α PLIs, fortalecendo as hipóteses de Okumura *et al.* (1999) que os α PLIs não se ligam à carboidratos e inibem as fosfolipases A_2 de um modo independente de Ca^{2+} . Estes mesmos autores propuseram que os α PLIs formam trímeros com um poro central que seria responsável pela ligação e inibição das fosfolipases A_2 .

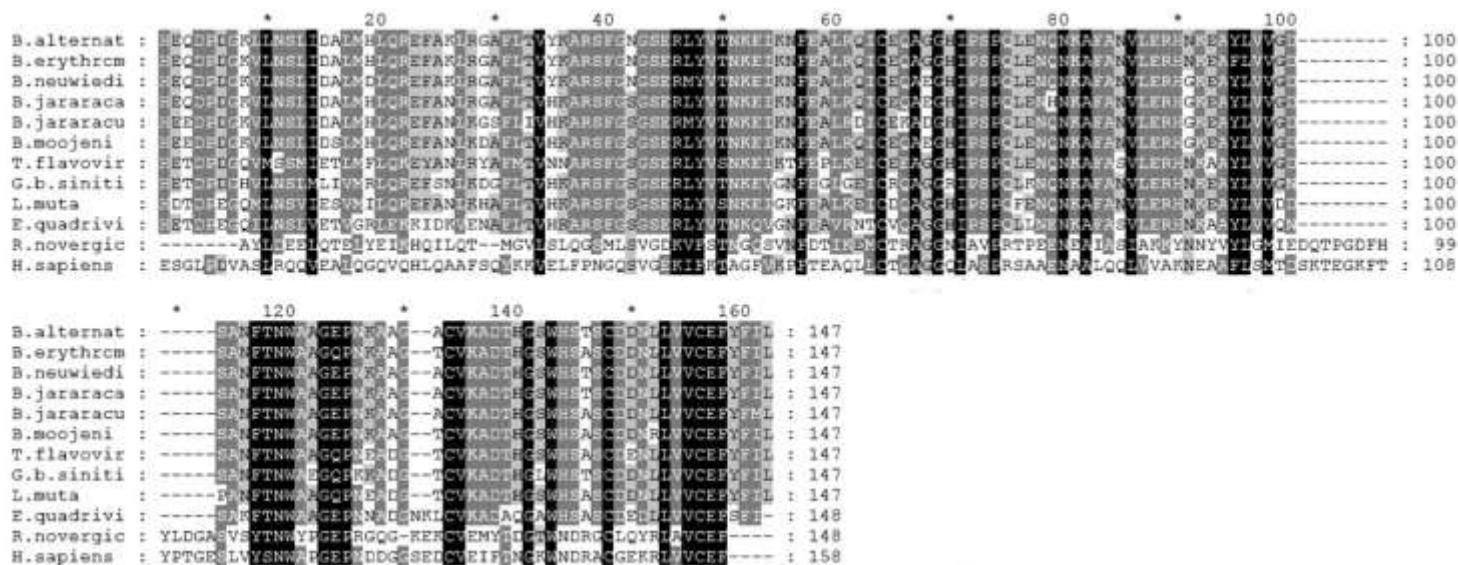


Figura 55: Alinhamento das seqüências de aminoácidos do α -BaltMIP, dos demais α -PLIs disponíveis no NCBI protein data bank e das SP-D humana e de camundongo.

Então, com o intuito de se avaliar a conformação oligomérica do α BaltMIP e as hipóteses destes autores, realizou-se neste trabalho experimentos de espalhamento de luz dinâmico (DLS). Os dados obtidos por DLS obtidos a 4°C e a 10°C mostram uma população de distribuição monomodal, com baixa polidispersividade (3,3% e 13,4%; respectivamente) com raios hidrodinâmicos (R_H) médios de 3,4 nm e 3,6 nm, respectivamente. A fim de se avaliar a formação deste trímero, realizou-se o alinhamento estrutural da estrutura teórica (obtida como monômero após a simulação de dinâmica molecular) do α BaltMIP com os três monômeros da SP-D humana, obtendo-se um trímero de α BaltMIP que foi submetido a um refinamento de *simulated annealing* no programa CNS v.1.1 (Brunger *et al.*, 1998). O resultado deste refinamento foi um trímero com raio aproximado de 3,75 nm, que é bastante próximo ao obtido por DLS (3,4-3,6 nm) (Figura 56). Além disso, como podemos ver, o trímero é estabilizado por interações eletrostáticas na região da *α -helical neck*, formando um poro central que, como proposto anteriormente (Okumura *et al.*, 1999), deve ser mesmo a região de ligação e inibição das fosfolipases A_2 .

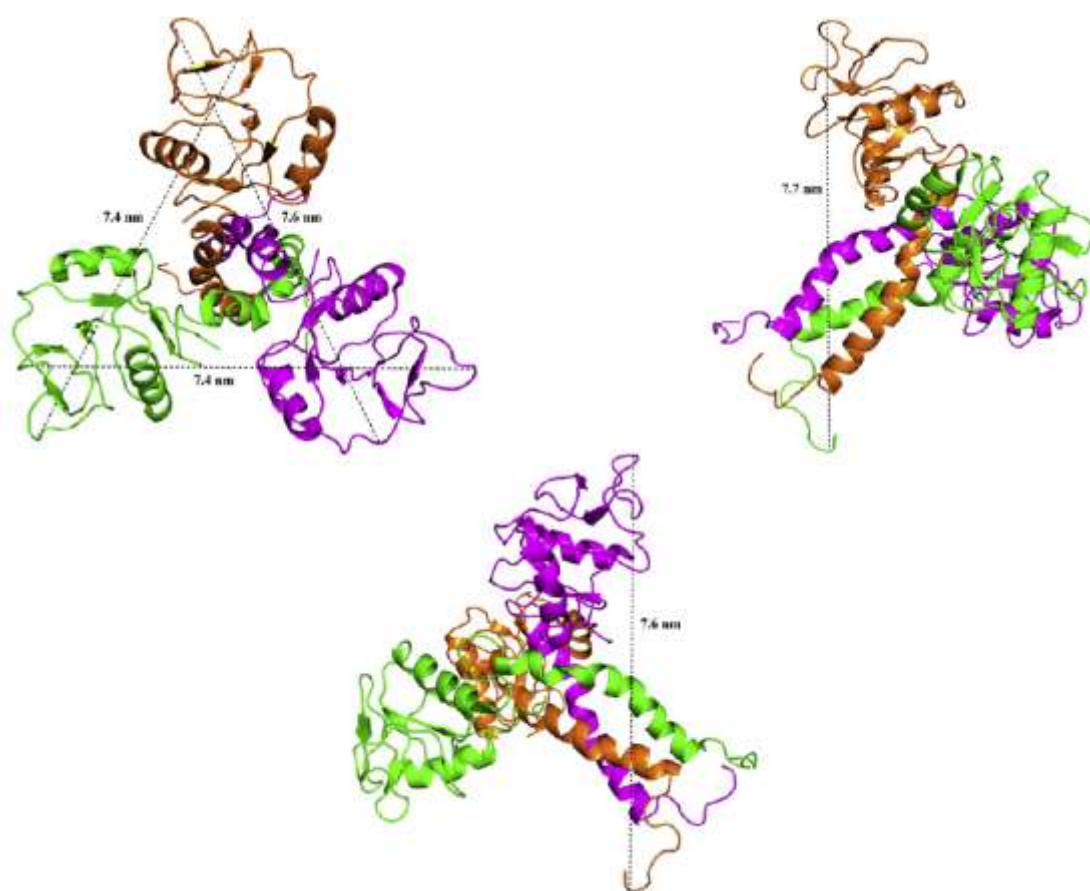


figura 56: Conformação trimérica teórica do α -BaltMIP gerado após um refinamento de simulated annealing do modelo obtido após 10 ns de simulação de dinâmica molecular. Este arranjo trimérico obteve uma diâmetro de aproximadamente de 7,5 nm, bastante próximo do raio hidrodinâmico (3,6 nm) obtido por espalhamento de luz dinâmico.

Como próximos passos, pretende-se cristalizar o α BaltMIP complexada com fosfolipases A₂ afim de se obter informações mais detalhadas a respeito da interação entre estas duas moléculas. Os dados aqui apresentados foram publicados em uma revista internacional da área (Anexo 05).

6.1.2 *Crotalus neutralization factor (CNF)*, um γ -PLI isolado do plasma sanguíneo de *Crotalus durissus terrificus*

Crotalus neutralization factor (CNF) é um γ -PLI isolado do plasma sanguíneo de *Crotalus durissus terrificus* pela primeira vez em 1994 que se ligaria unicamente à crotoxina B (Fortes-

Dias *et al.*, 1994). Quando isolada, o CNF apareceu como um agregado oligomérico de 6-8 monômeros, de 20kDa, que alcançaria a massa de 25 kDa quando glicosilada (Forte-Dias *et al.*, 1994). Com o intuito de se obter maiores informações estruturais dessa proteína e do seu complexo com a crotoxina B (CNF-CB) foram realizados diversos experimentos em solução. Inicialmente, foram realizados experimentos de dicroísmo circular (CD) com o CNF e o complexo CNF-CB para se obter informações estruturais acerca de suas estruturas secundárias (Figura 57).

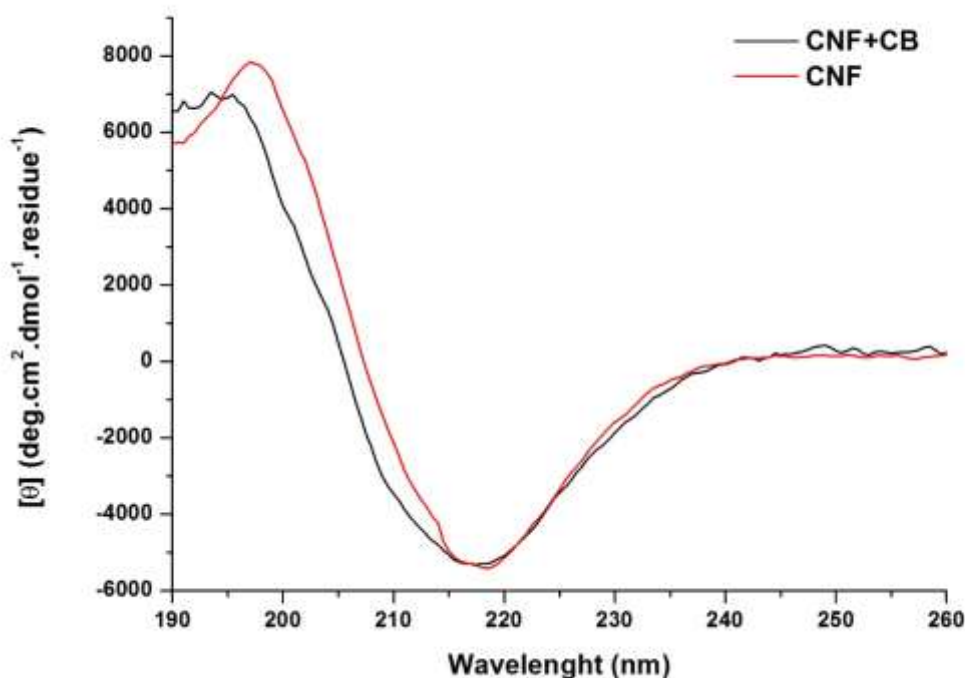


Figura 57: Espectros de dicroísmo circular do *Crotalus neutralization factor* (CNF) isolado do plasma de *Crotalus durissus terrificus* e o do complexo formado pelo CNF com a crotoxina isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (CNF+CB).

A figura 57 mostra que o espectro de dicroísmo circular do CNF possui um valor mínimo de $[\theta]$ a 217 nm e um máximo de $[\theta]$ ao redor de 197 nm, indicando uma proteína rica em folhas beta. O espectro do complexo CNF-CB é bastante similar ao de CNF sozinho, o que é bastante intrigante já que esse complexo é formado por uma proteína rica em folhas beta (CNF) e uma rica em hélices alfa (CB), sendo que o sinal de hélices alfa é sempre muito maior que o das folhas beta por causa do dipolo elétrico formado pelo grupo amina e carbonil a cada 3,6

resíduos. Uma das pequenas diferenças observadas entre as curvas é o deslocamento do valor de $[\theta]$ máximo de ao redor de 197 nm no espectro de CNF para ao redor de 193 nm no espectro de CNF-CB, indicando a presença de hélices alfa por conta da complexação com CB. Entretanto, não se vê nenhuma alteração no sinal obtido a 208 e 222 nm, comprimentos de onda bastante sensíveis a presença de hélices alfa, indicando uma contribuição muito pequena desse elemento de estrutura secundária à curva de CD do complexo CNF-CB. Essa pequena contribuição do sinal de alfa hélices no espectro de CNF-CB, indica uma pequena quantidade de CB nessa amostra, em contraste com um quantidade maior de CNF, sugerindo que a formação do complexo deve empreender uma razão CNF/CB maior do que 1:1.

Além disso, outra diferença observada entre as curvas é que a área no intervalo 210-220 nm é mais larga no espectro de CNF-CB do que no espectro de CNF sozinho. Além disso, o valor de $[\theta]$ a 200nm é menor no espectro do complexo do que no espectro de CNF. Essas diferenças indicam um aumento da quantidade de elementos desordenados, sugerindo portanto que a complexação com CB desenovela algumas regiões de CNF. De fato, a deconvolução das curvas de CD obtidas realizada pelo algoritmo CONTINN (Sreerama & Woody, 2000). disponível no servidor Dichroweb (Whitmore & Wallace, 2008) sugere que CNF possui 44,4% de folhas beta e 50,7% de elementos desordenados e o complexo CNF-CB possui 38,2% de folhas beta e 54,3% de elementos desordenados. Em seguida, foram realizados experimentos de desenovelamento térmico do CNF (Figura 58 e 59) e do complexo CNF-CB (Figura 60 e 61).

O desenovelamento térmico do CNF mostra que este é uma proteína bastante estável já que seu desenovelamento se inicia apenas a partir dos 60°C e só aos 90°C ela atinge o seu nível máximo de desenovelamento (Figura 58). Com o intuito de se monitorar o aparecimento de elementos desordenados, o sinal a 200 nm foi monitorado em função do aumento da temperatura

(Figura 59). Essa análise mostrou um *Transition melting* (T_m) para a CNF de 78,1°C que foi calculado a partir do ponto de inflexão da curva sigmoide no Origin.

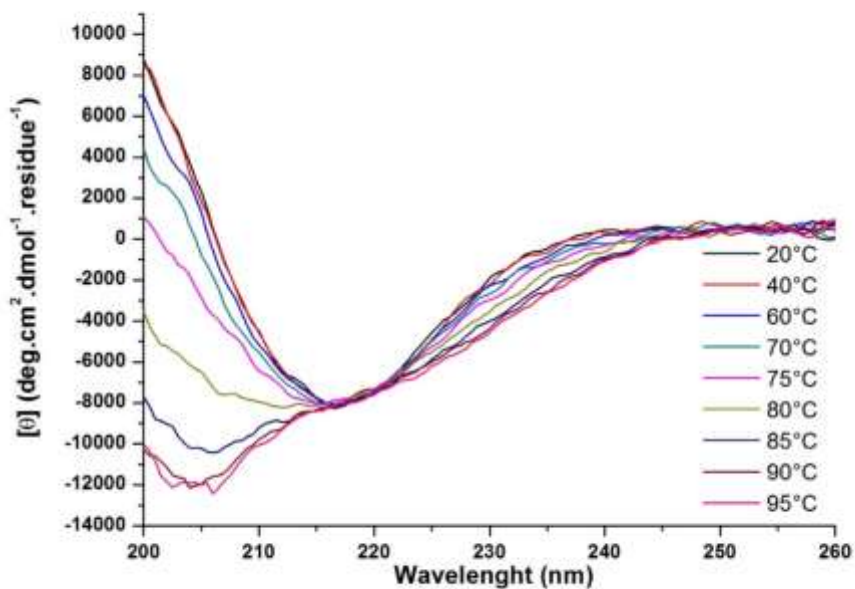


Figura 58: Espectros de dicroísmo circular do *Crotalus neutralization factor* (CNF) em função da temperatura.

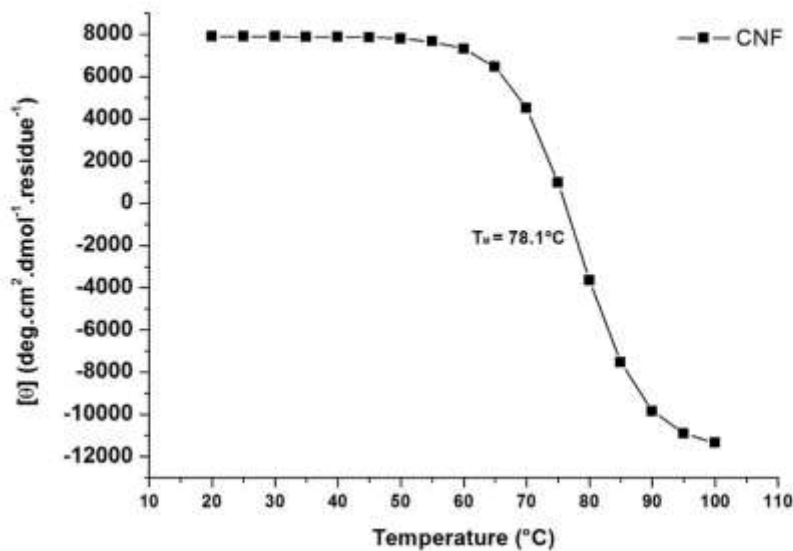


Figura 59: Desenvolvimento térmico do *Crotalus neutralization factor* (CNF) monitorado a 200 nm. Foi obtido um *Transition melting* (T_m) para a CNF de 78,1°C, que foi calculado a partir do ponto de inflexão da curva sigmoide no Origin.

Com relação ao desenovelamento térmico do complexo CNF-CB, ele inicia o seu desenovelamento a partir dos 75°C e só atinge o seu estágio final de desenovelamento a 95°C (Figura 60). Esses dados sugerem que o complexo CNF-CB é mais estável que o CNF sozinho.

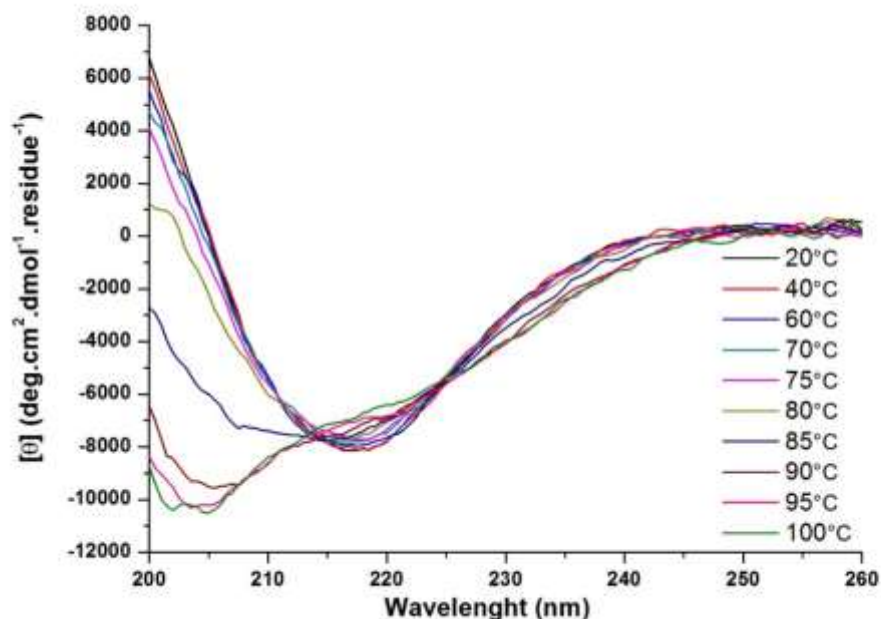


Figura 60: Espectros de dicroísmo circular do *Crotalus neutralization factor* (CNF) complexado com a crotoxina B (CNF-CB).

Do mesmo modo, com o intuito de se monitorar o aparecimento de elementos desordenados, o sinal a 200 nm do complexo CNF-CB foi monitorado em função do aumento da temperatura (Figura 61). Essa análise mostra a ocorrência de dois T_m s ao longo da desnaturação do complexo CNF-CB. O primeiro T_m obtido (47,7°C) (Figura 60) é bastante próximo ao T_m obtido pela desnaturação da CB sozinha, monitorando-se o sinal a 222 nm (50,4°C). Essa diferença de 2,7 °C obtida no T_m obtido poderia significar que a complexação com CNF leva à uma pequena desestabilização de CB. Entretanto, essa diferença pode ser atribuída às diferenças das condições que em os experimentos foram realizados, já que os comprimentos de ondas monitorados são diferentes e a quantidade de CB presente no experimento do complexo CNF-CB é pequena. Já o segundo T_m obtido (83,4°C) (Figura 61) é próximo ao obtido pela desnaturação do CNF sozinho (78,1°C; Figura 59). Dessa forma, a complexação com CB leva

a um aumento de 5,3°C do T_m do CNF. A comparação dos resultados de desnaturação térmica do CNF e do complexo CNF-CB mostra que a complexação de CNF com CB leva a um aumento dos elementos desordenados de CNF, ou seja, desenovela algumas regiões dessa proteína. Além disso, a complexação com CB, leva a um aumento da temperatura para iniciar e atingir o estágio final de desenovelamento de CNF, conseqüentemente, causando um aumento no valor de T_M .

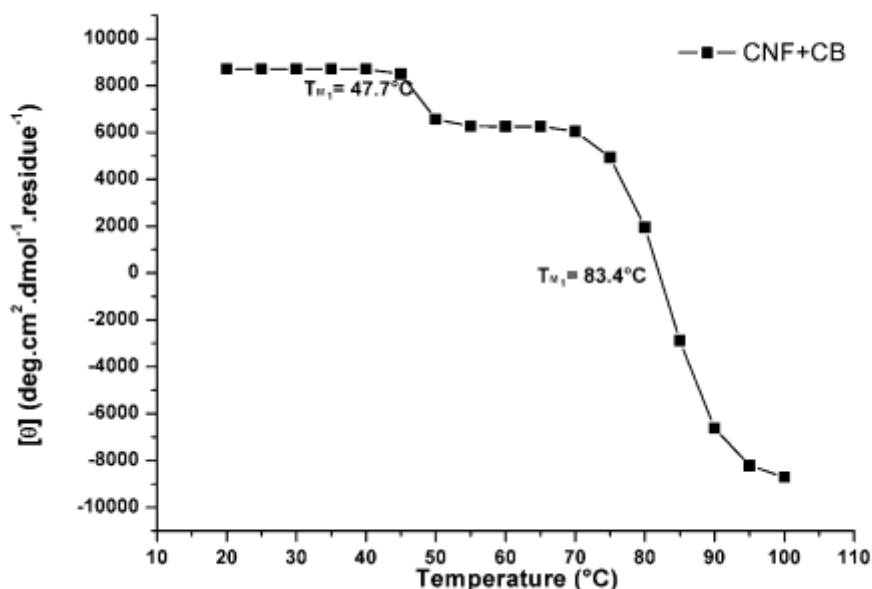


Figura 61: Desenovelamento térmico do *Crotalus neutralization factor* (CNF) complexado à crotoxina B (CNF+CB) monitorado a 200 nm. Foram obtidos dois *Transition meltings* (T_{m1} e T_{m2}) que foram calculados a partir dos pontos de inflexão das curvas sigmoides no Origin.

Com o intuito de se obter maiores informações a respeito da conformação oligomérica dessa proteína, foram realizados experimentos de cromatografia analítica de exclusão molecular, espalhamento dinâmico de luz (DLS) e espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS). Os dados de DLS (Tabela 15) mostram que para todas as temperaturas medidas, as amostras de CNF e CNF-CB apresentam-se como uma amostra unimodal (>99% da massa) e monodispersa (<15% de polidispersividade), com exceção das medidas do complexo CNF-CB acima dos 10°C. Com relação ao raio hidrodinâmico, o CNF apresenta um raio hidrodinâmico (R_h) de $4,4 \pm 0,1$ nm e o complexo CNF-CB, um R_h de $4,5 \pm 0,15$ nm. Esses dados mostram que a complexação com CB não leva a um aumento significativo do tamanho do complexo CNF-CB

em relação ao CNF sozinho. Com relação à estimativa de massa, as amostras com menor polidispersividade indicam uma massa ao redor de 100-110 kDa, para CNF, indicando que essa proteína pode ser um tetrâmero em solução, considerando que o seu monômero na forma glicosilada possui uma massa de 25 kDa.

Tabela 15: Raio hidrodinâmico e porcentagem de polidispersividade obtidos por experimentos de espalhamento de luz dinâmico (DLS) do *Crotalus neutralization factor* (CNF) e do complexo desta proteína com a crotoxina B (CNF+CB) em três diferentes temperaturas.

	Temperatura (°C)	R _h	Massa Molecular Estimada (kDa)	% Polidispersividade	% massa
CNF	4	4,3	101	6,0	99,5
	10	4,4	108	14,4	99,8
	18	4,5	114	16,2	99,7
CNF+CB	4	4,4	107	8,2	99,6
	10	4,6	120	25,9	99,7
	18	4,7	123	16,6	99,7

A cromatografia analítica de exclusão molecular realizada com o CNF em uma coluna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare™) equilibrada com 20 mM Bicarbonato de amônio pH 6,5 a 20°C, mostrou que essa proteína foi eluída com 11,52 ml e que isso corresponde a uma massa de 173 kDa calculada a partir da curva de calibração de proteínas de massa conhecida, indicando um oligômero de aproximadamente de oito moléculas (Figura 62). Entretanto, cabe ressaltar que proteínas glicosiladas muitas vezes apresentam comportamentos anômalos em cromatografias analíticas de exclusão molecular já que glicoproteínas podem ter estruturas mais alongadas que proteínas globulares graças a uma maior hidratação em solução das cadeias de carboidrato em relação às cadeias polipeptídicas (Andrews, 1965).

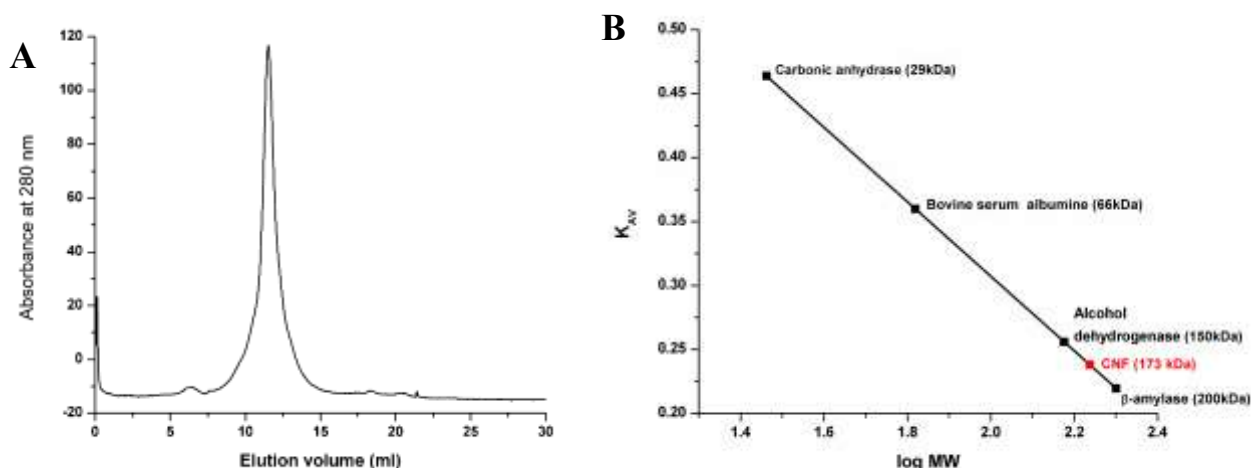


Figura 62: (A) Cromatografia de exclusão analítica da CNF em 20 mM Formato de Amônio pH 6,5. (B) Curva de calibração utilizando proteínas padrão de massa molecular conhecida.

Os dados de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Mário de Oliveira Neto do Departamento de Física e Biofísica do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP mostrou que essa proteína pode ser uma mistura de diferentes oligômeros, já que é possível se obter três raios de giro diferentes a partir da curva de espalhamento obtida do CNF a 5 mg.ml^{-1} (Figura 63).

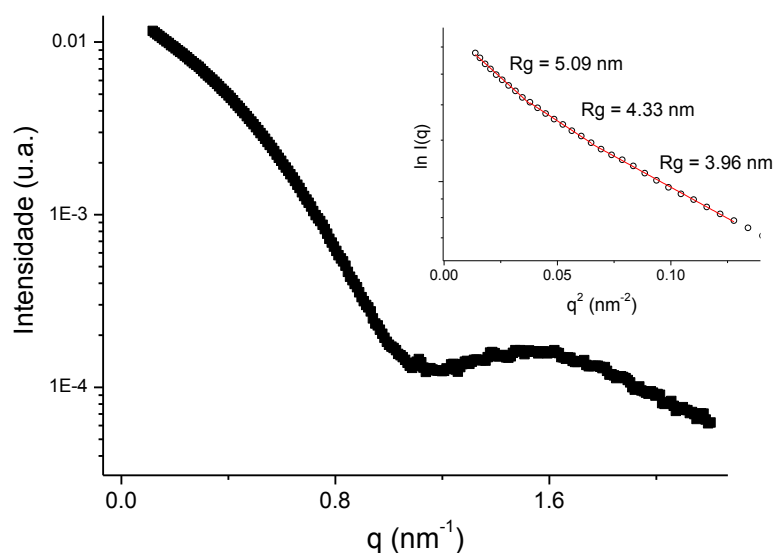


Figura 63: Curva de espalhamento de raios X à baixo ângulo da CNF dissolvida em 20 mM Bicarbonato de Amônio pH 6,5 concentrada a 5 mg.ml^{-1} . O gráfico em vermelho mostra a relação da intensidade do espalhamento em relação ao vetor de espalhamento ao quadrado, onde se pode obter três raios de giro diferentes obtidos de uma mesma amostra de CNF.

De fato, a análise do gel de eletroforese de poliacrilamida 15% em condições não desnaturantes de amostras de CNF de diferentes concentrações (1; 5 e 10 mg.ml⁻¹) mostra a formação de diversos arranjos oligoméricos, incluindo dímeros, tetrâmeros e octômeros da formas glicosilada e dímero da forma não glicosilada (Figura 64).

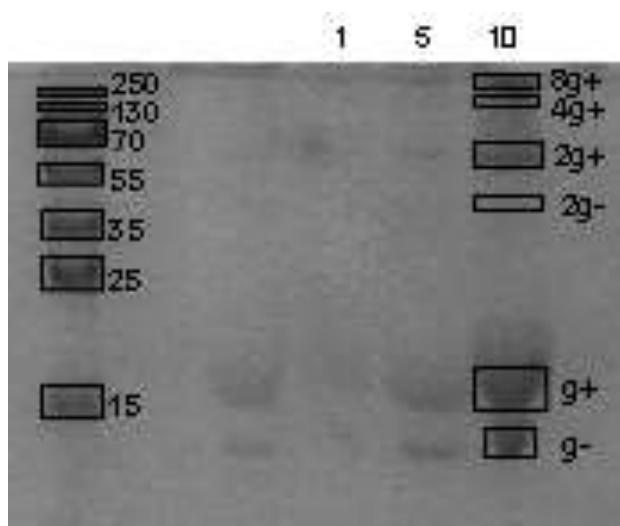


Figura 64: Gel de eletroforese em condições não desnaturantes da CNF de diferentes concentrações (1, 5 e 10 mg.ml⁻¹) mostrando as diferentes condições oligoméricas das formas glicosiladas (g+) e não glicosiladas (g-). A primeira linha à esquerda é a linha dos marcadores de massa molecular.

Além disso, experimentos de anisotropia de fluorescência emitida pelas tirosinas (CNF não possui resíduos de triptofano) mostram que com o aumento da concentração de CNF, o valor de anisotropia também aumenta, indicando, conseqüentemente, um aumento do tamanho das moléculas de CNF em solução (Figura 65). Esse experimento revelou que o CNF nas concentrações de 72, 100 e 140 μ M possui valores médios de anisotropia de, respectivamente, 0,092; 0,105 e 0,118.

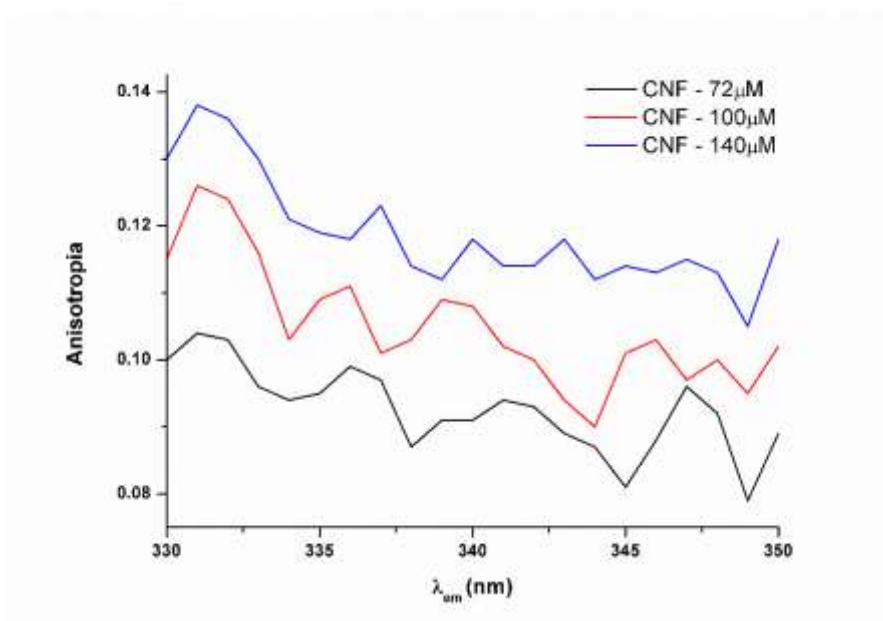


Figura 65: Anisotropia de fluorescência dos resíduos de tirosina do *Crotalus neutralization factor* (CNF) em diferentes concentrações, de 72 μM (preto), 100 μM (vermelho) e 140 μM (azul).

Ainda com relação aos dados obtidos por SAXS, as curvas de intensidade (I_q) em função do vetor de espalhamento q das amostras de CNF e CNF-CB mostram a presença de dois mínimos, indicando que ambas as amostras são esféricas e por isso, devem apresentar uma curva de distribuição de distâncias ($p(r)$) centrossimétrica, como visto no capítulo 2 (Figura 11). Entretanto, só foi possível obter-se uma curva de $p(r)$ dessa forma após a eliminação de 20 (para CNF) e 8 (para CNF-CB) pontos iniciais da curva, que indicavam a agregação das amostras, resultando das curvas de espalhamento e de $p(r)$ mostradas abaixo (Figura 66).

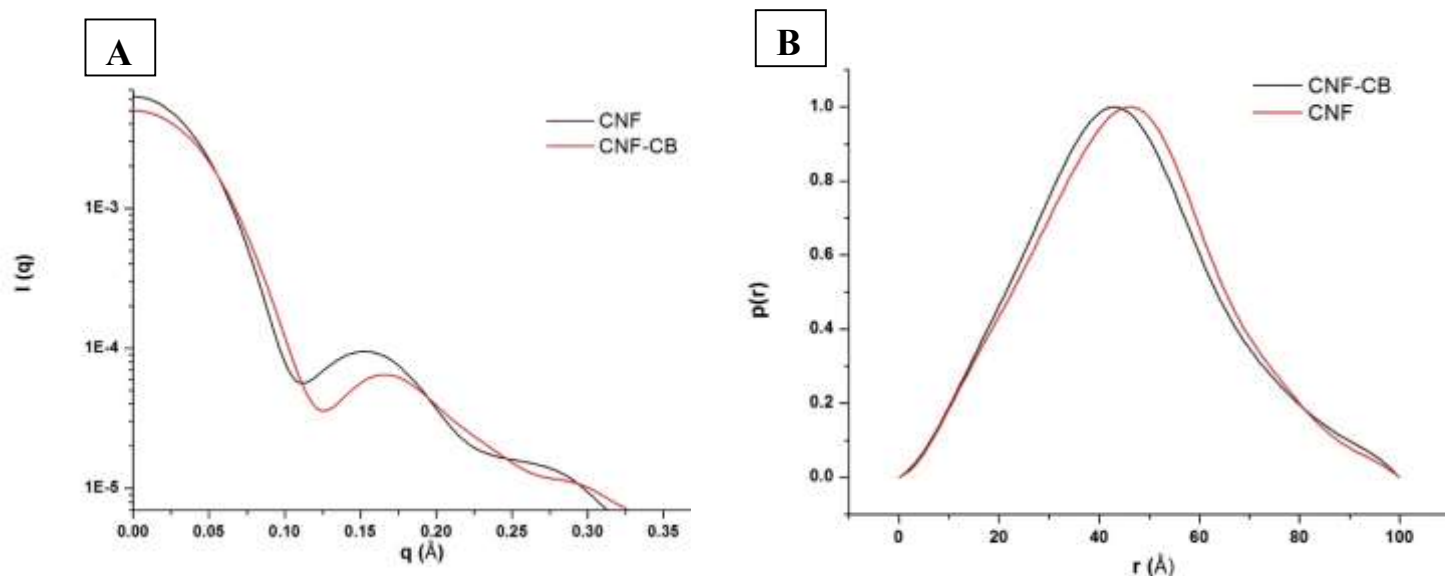


Figura 66: (A) Curva de espalhamento de raios X a baixo ângulo do *Crotalus neutralization factor* (CNF; em preto) e do seu complexo com a crotoxina B (CNF-CB; vermelho) após a retirada dos 20 (para CNF) e 8 (para CNF-CB) pontos iniciais que eram referentes à agregados. (B) Curva de distribuição de distâncias ($p(r)$) para as amostras de CNF (vermelho) e CNF-CB (preto).

A análise das curvas de SAXS obtidas mostram que o CNF e o CNF-CB possuem um raio de giro (R_g) de $34,75 \text{\AA}$ e $34,36 \text{\AA}$, respectivamente. Esses dados corroboram com os dados obtidos por espalhamento dinâmico de luz, mostrando que o tamanho do CNF isolado se mantém praticamente o mesmo após a complexação com a CB. Calculando-se a razão R_g/R_h do CNF e do complexo CNF-CB obtém os valores de, respectivamente, 0,789 e 0,763, mostrando que ambas as amostras são globulares, já que esferas perfeitas apresentam uma razão R_g/R_h de 0.775 (Kokufuta *et al.*, 2007).

Utilizando-se o programa SAXSMow (Fischer *et al.*, 2010), calculou-se a estimativa da massa para cada uma das amostras a partir das curvas de SAXS obtidas. O CNF apresentou uma massa aproximada de 118 kDa, compatível com um tetrâmero, como fora previamente observado por DLS. Já o complexo CNF-CB apresentou uma massa aproximada de 111 kDa, compatível com a estequiometria de 4:1 de CNF:CB, considerando a massa de CNF como 25 kDa como monômero e o de CB de 14 kDa.

O modelo teórico de CNF (Figura 67) criado a partir de técnicas de *threading* com a posterior realização de simulações de dinâmica molecular apresentou uma excelente qualidade estereoquímica, com 97,7% de resíduos localizados nas regiões permitidas no gráfico de Ramachandran. A análise da estrutura teórica da CNF mostra que como previsto por dicroísmo circular, esta proteína é composta por *loop*, elementos desordenados e folhas beta formando diversos domínios *three fingers*, que são bastante característicos das γ -PLIs (Forte-Dias, 2002) (Figura 67).

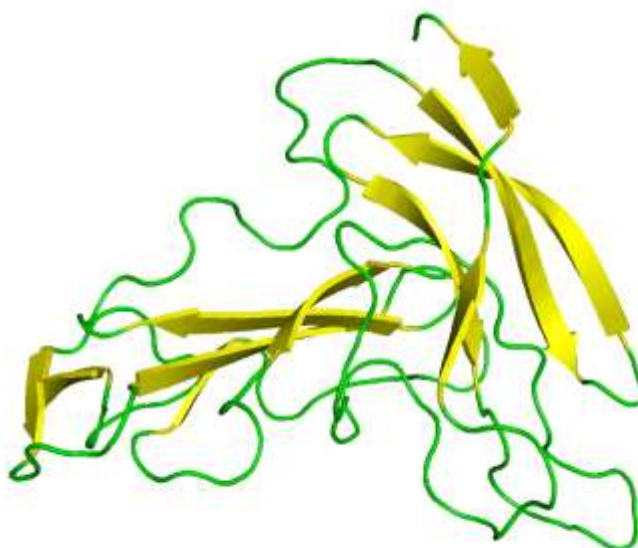


Figura 67: Representação em *cartoon* da estrutura teórica da CNF obtida após 10 ns de dinâmica molecular.

Uma análise mais cuidadosa da estrutura obtida *in silico* mostra que grande parte dos oito resíduos de tirosina presentes na sequência de aminoácidos estão expostos ao solvente (Figura 68). A análise da fluorescência estática emitida pelos resíduos de tirosina mostra que conforme se aumenta a concentração de CNF, se diminui o sinal de fluorescência das tirosinas, indicando que elas ficam menos expostas em maiores concentrações (Figura 69). Esses dados sugerem que a interação entre as moléculas de CNF para a formação de oligômeros maiores se dá através de regiões ricas em tirosina, justificando, portanto, a diminuição do sinal fluorescente. Estudos anteriores com fragmentos de inibidores gama de serpentes do gênero Python mostraram que o fragmento PGLPLSLQNG é capaz de inibir cerca de 90% da atividade fosfolipásica (Twin *et*

al., 2002) e que portanto sugerem que essa a região pela qual o inibidor gama se liga à fosfolipase A₂. Interessantemente, no modelo *in silico* do CNF esse fragmento encontra-se exposto ao solvente, em uma região que está próxima a duas tirosinas expostas ao solvente, mas oposta a uma região que possui cinco tirosinas expostas ao solvente (Figura 68). Dessa maneira, este modelo estrutural teórico é capaz de apontar prováveis sítios de interação do CNF com outras moléculas de CNF para a sua oligomerização (região rica em tirosinas) e do CNF com a CB (fragmento PGLPLSLQNG como apontado por Twin *et al.*, 2002).

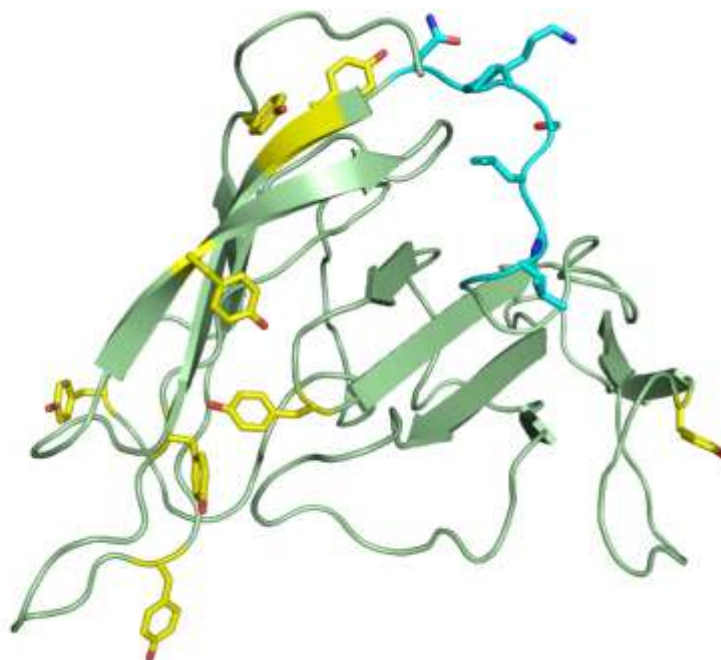


Figura 68: Representação em cartoon da estrutura teórica da CNF obtida após 10 ns de dinâmica molecular com destaque em sticks para as tirosinas presentes na estrutura (em amarelo) e para o fragmento PGLPLSLQNG (em azul) apontado por Twin *et al.* (2002) como o sítio responsável pela interação da fosfolipase A₂ com os inibidores gama de serpentes do gênero *Python* graças a capacidade desse fragmento de inibir atividade fosfolipídica.

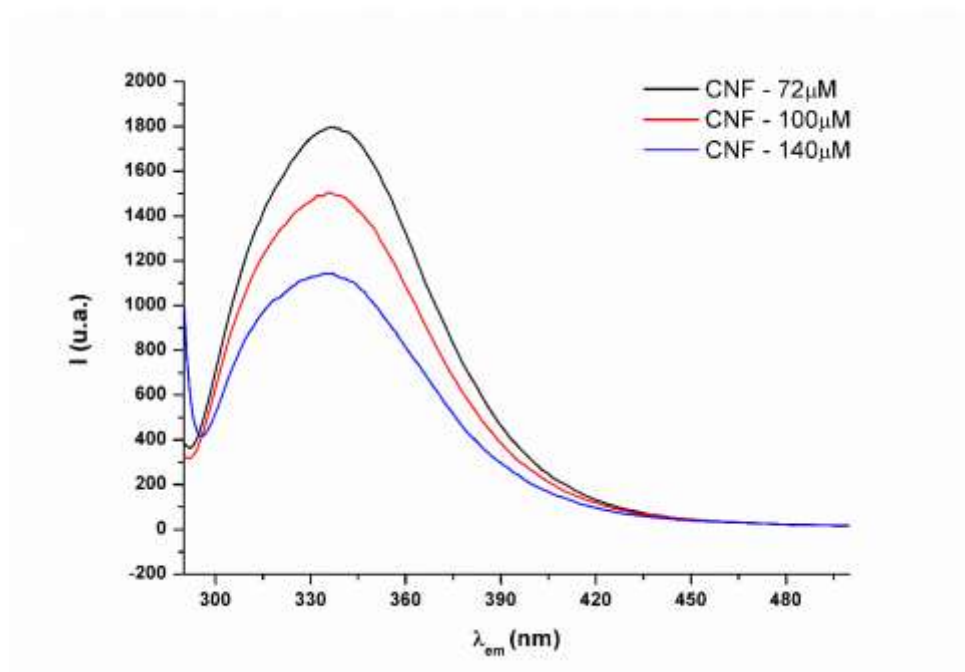


Figura 69: Intensidade de fluorescência emitida pelos resíduos de tirosina do *Crotalus neutralization factor* (CNF) em diferentes concentrações, de 72 μ M (preto), 100 μ M (vermelho) e 140 μ M (azul).

Capítulo 7
Conclusões finais

Os resultados mostrados aqui, mais uma vez, evidenciaram a importância da técnica de cristalografia de proteínas para obtenção de informações acerca do funcionamento de macromoléculas biológicas. Mais do que isso, os resultados mostraram também que a combinação dos resultados obtidos por cristalografia com outras técnicas biofísicas em solução e técnicas computacionais é uma ferramenta poderosíssima para um entendimento mais profundo e completo da ação destas moléculas.

Neste trabalho, é apresentada a estrutura cristalográfica da crotoxina B de *Crotalus durissus colillineatus* cuja comparação estrutural com a crotoxina B e o complexo crotoxina de *Crotalus durissus terrificus* será de grande valia para uma melhor compreensão do mecanismo neurotóxico da crotoxina e da associação entre a crotoxina A e crotoxina B. Também é apresentada a expressão heteróloga da isoforma CBa₂ crotoxina B de *Crotalus durissus terrificus* para posterior realização de experimentos de mutação sítio-dirigida de alguns resíduos afim de se identificar os aminoácidos responsáveis pela ação neurotóxica desta proteína. Além disso, são apresentados resultados de espalhamento de raios X a baixo ângulo da crotoxina, bem como de suas subunidades isoladas. A análise preliminar destes resultados indica uma oligomerização da crotoxina A e, sobretudo da crotoxina B, quando isolada, como já havia sido relatado anteriormente pelas estruturas cristalográficas de *C.d. terrificus* e *C.d. colillineatus*. Além disso, em combinação com dados de espectroscopia de fluorescência, os dados de SAXS também mostram que a molécula de crotoxina em solução é maior do que a obtida por cristalografia, indicando que ela pode ser composta a razão CA:CB deve ser maior do que 1:1, provavelmente 2:1.

Com relação às Lys49-PLA₂s isoladas de serpentes do gênero *Bothrops*, aqui são apresentadas as estruturas cristalográficas de duas Lys49-PLA₂s isoladas do veneno da serpente *B. brazili*. A análise destas estruturas aliada à comparação estrutural delas levou à proposição de um novo mecanismo de ação para estas proteínas, baseado na identificação de dois sítios

independentes de interação com a membrana; i) sítio MDoS, formado pelos resíduos Lys115 e Arg118 (e, adicionalmente, Lys20 na maioria dos casos) que interagiria com a cabeça aniônica de fosfolípidios de membrana, estabilizando o dímero sobre a membrana alvo e; ii) o sítio MDiS, formado pelos resíduos Leu121 e Phe125, que seria responsável pela desestabilização da membrana. Além disso, experimentos realizados por colaboradores mostram que a análise funcional sobre a lesão provocada pela PrTX-I na membrana muscular complexada com dois diferentes inibidores, o ácido caféico e o ácido aristolóquico, mostram que esses inibidores realmente diminuem a atividade miotóxica dessa proteína. A análise da estrutura cristalográfica desses dois complexos da PrTX-I complexada com esses inibidores de origem vegetal, mostra que eles se ligam aos dois sítios anteriormente propostos; o ácido caféico se liga ao sítio MDoS e o ácido aristolóquico se liga parcialmente ao sítio MDiS. Estes dados reforçam a relevância destes sítios para a expressão da miotoxicidade das Lys49-PLA₂s e mostram novos modos de inibição da toxicidade destas proteínas. Além disso, é mostrada também a estrutura cristalográfica da intrigante MjTX-I, isolada de *B. moojeni*, que diferentemente das outras Lys49-PLA₂s, apresenta quatro moléculas na unidade assimétrica. A análise desta estrutura aliada a resultados de diversas técnicas biofísicas de análise de proteínas em solução mostraram que, não só esse tetrâmero tem relevância biológica, mas também que esta proteína pode adotar diversas conformações oligoméricas, sendo, portanto um caso especial dentro das Lys49-PLA₂s.

Por fim, são apresentados resultados teóricos e experimentais acerca da estrutura oligomérica de dois inibidores de origem proteica de fosfolipases A₂ isolados do plasma sanguíneo de serpentes (α BaltMIP e CNF) cuja análise forneceu inéditas informações acerca da estrutura quaternária dessas proteínas e de como ocorre a sua conjugação com às fosfolipases A₂. No caso da α BaltMIP, a análise da sua sequência primária e de sua estrutura terciária modelada computacionalmente mostrou a ausência de *loop* de ligação de Ca²⁺, impede a

coordenação desse íon, que por sua vez, está envolvido na coordenação de carboidratos, sendo esta, portanto, a razão de α PLIs não se ligarem à carboidratos, como anteriormente previsto. Além disso, o trímero da α BaltMIP gerado por um refinamento do tipo *simulated annealing*, a partir do monômero gerado após 10 ns de dinâmica molecular, mostra a importância da região conhecida como *α helical neck* para a estabilização desse trímero e a formação de um poro central que seria a região de ligação das fosfolipases A_2 , provocando a sua inibição. No caso do *crotalus neutralization factor* (CNF) e do complexo desta proteína com a crotoxina B (CNF+CB), experimentos de dicroísmo circular mostram que o complexo é mais estável do que o CNF sozinho frente ao desenovelamento térmico. Além disso, experimentos de SAXS e DLS mostraram que CNF provavelmente deve ser um tetrâmero em solução e que a complexação com CB não produz efeitos em seu tamanho em solução. Por fim, o modelo *in silico* do CNF aliado a experimentos de fluorescência estática identificou na estrutura terciária dessa proteína possíveis sítios da interação do CNF com outras moléculas de CNF, na ocasião da sua oligomerização e do CNF com a molécula de CB.

Referências bibliográficas

- ADAMS, P. D.; GROSSE-KUNSTLEVE, R. W.; HUNG, L. W.; IOERGER, T. R.; MCCOY, A. J.; MORIARTY, N. W.; READ, R. J.; SACCHETTINI, J. C.; SAUTER, N. K.; TERWILLIGER, T. C. PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v.58, p.1948-1954, 2002.
- AIRD S.D., KAISER, II, Comparative studies on three rattlesnake toxins, **Toxicon** v.23, p.361-374, 1985.
- AIRD S.D., KAISER, II, LEWIS R.V., KRUGGEL W.G., A complete amino acid sequence for the basic subunit of crotoxin, **Arch Biochem Biophys** v.249 p.296-300, 1986.
- AIRD S.D., YATES J.R., 3RD, MARTINO P.A., SHABANOWITZ J., HUNT D.F., KAISER, II, The amino acid sequence of the acidic subunit B-chain of crotoxin, **Biochim Biophys Acta**. v.1040 p.217-224, 1990.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol**, v.215, p.403-410, 1990.
- AMBROSIO, A. L. B.; NONATO, M. C.; DE ARAUJO, H. S. S.; ARNI, R.; WARD, R. J.; OWNBY, C. L.; DE SOUZA, D. H. F.; GARRATT, R. C. A molecular mechanism for Lys(49)-phospholipase A(2) activity based on ligand-induced conformational change. **Journal of Biological Chemistry**, v.280, p.7326-7335, 2005.
- ANGULO, Y.; GUTIERREZ, J. M.; SOARES, A. M.; CHO, W.; LOMONTE, B. Myotoxic and cytolytic activities of dimeric Lys49 phospholipase A(2) homologues are reduced, but not abolished, by a pH-induced dissociation. **Toxicon**, v.46, p.291-296, 2005.
- ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A(2) - A structural review. **Toxicon**, v.34, p.827-841, 1996.
- ARNI, R. K.; FONTES, M. R. M.; BARBERATO, C.; GUTIERREZ, J. M.; DIAZ, C.; WARD, R. J. Crystal structure of myotoxin II, a monomeric Lys49-Phospholipase A(2) homologue isolated from the venom of Cerrophidion (Bothrops) godmani. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.366, p.177-182, 1999.
- ARAÚJO F.A.A., SANTALÚCIA, M., CABRA, R.F., Epidemiologia dos Acidentes por Animais Peçonhentos, in: CARDOSO, J.L.C., FRANÇA, F.O.S., WEN, F.H., MÁLAQUE, C.M.S., HADDAS Jr., V. (Ed.), **Animais Peçonhentos no Brasil**, Sarvier, São Paulo, 2003.
- AMARÉ, A.R.F. & BURLEY, S.K. Dynamic light scattering in evaluating crystallizability of macromolecules. **Meth. Enzymol**. v.276, p.157-166, 1997.
- AZEVEDO-MARQUES M.M., HERING, S.E., CUPO, P., Acidente crotálico, in: CARDOSO, J.L.C., FRANÇA, F.O.S., WEN, F.H., MÁLAQUE, C.M.S., HADDAS Jr., V. (Ed.), **Animais Peçonhentos no Brasil**, Sarvier, São Paulo, 2003.
- BAHNSON, B.J. Structure, function and interfacial allostereism in phospholipases A2: insights from the anion assisted dimer. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.43, p.96-106, 2005.sver
- BAO, Y.; BU, P.; JIN, L.; HONGXIA, W.; YANG, Q.; AN, L. Purification, characterization and gene cloning of a novel phospholipase A2 from the venom of Agkistrodon blomhoffii ussurensis. **Int J Biochem Cell Biol**, v.37, p.558-565, 2005.
- BERENDSEN, H. J. C.; VAN DER SPOEL, D.; VAN DRUNEN, R. Gromacs: A message-passing parallel molecular dynamics implementation **Comp. Phys. Comm.**, v.91, p.43-56, 1995.
- BLUNDELL, T.L.; JOHNSON, L.N. **Protein Crystallography**. London: Academic Press, 1976, 565p.
- BOCHNER, R.; STRUCHINIER, C.J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos do Brasil: uma revisão. **Cad. Saúde Pública**, v. 19(1), p. 7-16, 2003.
- BON, C.; CHANGEUX, J. P.; JENG, T. W.; FRAENKEL-CONRAT, H. Postsynaptic effects of crotoxin and of its isolated subunits. **Eur J Biochem**, v.99, p.471-481, 1979.

- BORTOLETO-BUGS, RAQUEL KELLY; BUGS, MILTON ROQUE; NETO, AUGUSTO AGOSTINHO; WARD, R.J. A micelle nucleation model for the interaction of dodecyl sulphate with Lys49-phospholipase A2. **Bioophysical Chemistry** v.125, p. 213-220, 2007.
- BOUCHIER, C.; BOULIN, J.C.; BON, C.; MÉNEZ, A. Analysis of cDNAs encoding the two subunits of crotoxin, a phospholipase A2 neurotoxin from the rattlesnake venom: the acidic non enzymatic activity derives from a phospholipase A2-like precursor. **Biochem. Biophys. Acta** v.1088, p.401-408, 1991.
- BOURNE, P. E.; WEISSIG, H. **Structural Bioinformatics**. New York: Wiley and Sons, 2002.
- BRASIL. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, Ministério da Saúde, Fundação Nacional da Saúde (FUNASA), 2ª Ed., 2001.
- BREITHAUPHT H., Enzymatic characteristics of crotalus phospholipase A2 and the crotoxin complex, **Toxicon** v.14 p.221-233, 1976.
- BROWN, M.P. & ROYER, C. Fluorescence spectroscopy as a tool to investigate protein interactions. **Current Opinion in Biotechnology**, v.8, p. 45-49, 1997.
- BRUNGER, A. T. Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. **Nature**, v.355, p.472-475, 1992.
- BRUNGER, 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: A new software suite for macromolecular structure determination. **Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography**, v.54, p.905-921, 1998.
- BÜLBRING, E. Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. 1946. **Br. J. Pharmacol.**, v.120, s.4, p.3-26, 1997.
- CAVALCANTE, W.; DALPAISILVA, M.; CAMPOS, T.; SOARES, A.; PEREIRA, P.; OLIVEIRA, C.; GALLACCI, M. Neutralization of snake venom phospholipase A2 toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 490-497, 2007.
- CHAKRABARTI, A.C. & DEAMER, D.W. Permeability of lipid bilayers to amino acids and phosphate. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1111, p. 171-117, 1992.
- CHIOATO, L., de OLIVEIRA, A.H., 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.; ARAGAO, E. A.; FERREIRA, T. L.; DE 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 A(2) by scanning alanine mutagenesis. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, v.1768, p.1247-1257, 2007.
- CHEN, V. B., ARENDALL, W. B., 3RD, HEADD, J. J., KEEDY, D. A., IMMORMINO, R. M., KAPRAL, G. J., MURRAY, L. W., RICHARDSON, J. S. & RICHARDSON, D. C. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr** v.66, p.12-21, 2010.
- CINTRA-FRANCISCHINELLI, M., SILVA, M.G., ANDRÉO-FILHO, N., GERENUTTI, M., CINTRA, A.C., GIGLIO, J.R., LEITE, G.B., CRUZ-HÖFLING, M.A., RODRIGUES-SIMIONI, L., OSHIMA-FRANCO, Y. Antibiothropic action of *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae) extracts. **Phytother Res.** v.22, p.784-790, 2008.
- CINTRA-FRANCISCHINELLI M, PIZZO P, RODRIGUES-SIMIONI L, PONCE-SOTO LA, ROSSETTO O, LOMONTE B, GUTIÉRREZ JM, POZZAN T, MONTECUCCO C. Calcium imaging of muscle cells treated with snake myotoxins reveals toxin synergism and presence of acceptors. **Cell Mol Life Sci.** v.66, p.1718-1728, 2009.

CONDREA, E.; YANG, C. C.; ROSENBERG, P. Lack of correlation between anticoagulant activity and phospholipid hydrolysis by snake venom phospholipases A₂. **Thromb Haemost**, v.45, p.82-85, 1981.

CORREA, D.H.A.; RAMOS, C.H.I. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. **African Journal of Biochemistry**, v. 3, p. 164-173, 2009.

COSTA, T.R., MENALDO, D.L., OLIVEIRA, C.Z., SANTOS-FILHO, N.A., TEIXEIRA, S.S., NOMIZO, A., FULY, A.L., MONTEIRO, M.C., DE SOUZA, B.M., PALMA, M.S., STÁBELI, R.G., SAMPAIO, S.V., SOARES, S.A.M. Myotoxic phospholipases A₂ isolated from Bothrops brazili snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. **Peptides**, v. 29(10), p.1645-1656, 2008.

CRAIEVICH, A. Small-angle X-ray scattering by nanostructured materials, Chapter 8, **Handbook of Sol-Gel Science and Technology**. 2005.

D'ALESSIO, G. The evolutionary transition from monomeric to oligomeric proteins: tools, the environment, hypotheses. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**, v.72, p.271–298, 1999.

DAVIDSON, F. F.; DENNIS, E. A. Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipase A₂ from snake venom to human secreted forms. **J Mol Evol**, v.31, p.228-238, 1990.

DELANO, W. L. **The PyMOL Molecular Graphics System**. San Carlos, CA: DeLano Scientific LLC. 2002

DELOT, E. & BON, C. Model for the interaction of crotoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin, with presynaptic membranes. **Biochemistry** v.32, p.10708–10713, 1993.

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

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

DUCRUIX, A. & GIEGÉ, R. **Crystallization and Nucleic Acids and Proteins - A Practical Approach**. Oxford: Oxford University Press, 1999, 435p.

EDWARDS, S. H.; THOMPSON, D.; BAKER, S. F.; WOOD, S. P.; WILTON, D. C. The crystal structure of the H48Q active site mutant of human group IIA secreted phospholipase A₂ at 1.5 Å resolution provides an insight into the catalytic mechanism. **Biochemistry**, v.41, p.15468-15476, 2002.

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

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., GUILLAUME J.L., CAMOIN L., SALIOU B., BON C., Multiplicity of acidic subunit isoforms of crotoxin, the phospholipase A₂ neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom, results from posttranslational modifications, **Biochemistry** v.30 p.8074-8083, 1991.

FAURE G., HARVEY A.L., THOMSON E., SALIOU B., RADVANYI F., BON C., Comparison of crotoxin isoforms reveals that stability of the complex plays a major role in its pharmacological action, **Eur J Biochem** v.214 p.491-496, 1993.

FAURE G., CHOUMET V., BOUCHIER C., CAMOIN L., GUILLAUME 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. Natural inhibitors of toxic phospholipases A₂. **Biochimie**, v.82, p.833-840, 2000.

FAURE, G.; COPIC, A.; LE PORRIER, S.; GUBENSEK, F.; BON, C. KRIZAJ, I. Crotoxin acceptor protein isolated from *Torpedo* electric organ: binding properties to crotoxin by surface plasmon resonance. **Toxicon**, v. 41, p.509-517, 2003.

FAURE, G.; XU, H.; SAUL, F.A. Crystal structure of crotoxin reveals key residues involved in the stability and toxicity of this potent heterodimeric β -neurotoxin. **Journal of Molecular Biology**, v. 412, p.176-191, 2011.

FERNANDES, C.A.H., MARCHI-SALVADOR, SALVADOR, G.H.M. SILVA. M.C.O., COSTA, T.R., SOARES, A.M., FONTES, M.R.M. Comparison between apo and complexed structures of bothropstoxin-I reveals the role of Lys122 and Ca^{2+} -binding *loop* region for the catalytically inactive Lys49-PLA2s. **Journal of Structural Biology** v.171, p.31-43, 2010.

FERREIRA, T.L.; RULLER, R., CHIOATO, L., WARD, R.J. Insights on calcium-independent phospholipid membrane damage by Lys49-PLA2 using tryptophan scanning mutagenesis of bothropstoxin-I from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**, v.90, p.1397-1406, 2008.

FISCHER, H.; NETO, M.O.; NAPOLITANO, H.B.; CRAIEVICH, A.F., POLIKARPOV, I. The molecular weight of proteins in solution can be determined from a single SAXS measurement on a relative scale. **J. Appl. Cryst.**, v.43, p.101-109, 2010.

FLETCHER, J. E.;RAPUANO, B. E.;CONDREA, E.;YANG, C. C.;RYAN, M.; ROSENBERG, P. Comparison of a relatively toxic phospholipase A2 from *Naja nigricollis* snake venom with that of a relatively non-toxic phospholipase A2 from *Hemachatus haemachatus* snake venom--II. Pharmacological properties in relationship to enzymatic activity. **Biochem Pharmacol**, v.29, p.1565-1574, 1980.

FLETCHER, J. E.;RAPUANO, B. E.;CONDREA, E.;YANG, C. C.; ROSENBERG, P. Relationship between catalysis and toxicological properties of three phospholipases A2 from elapid snake venoms. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.59, p.375-388, 1981.

FORTES-DIAS, C., LIN, Y., EWELL, J. DINIZ, C.R., LIU, T. A Phospholipase A2 inhibitor from the plasma of the south American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*.) **Journal of Biological Chemistry** v.269, p.15646-15651, 1994.

FORTES-DIAS, C.L. Endogenous inhibitors of snake venoms phospholipases A2 in the blood plasma of snakes. **Toxicon**, v.40, p. 481-484, 2002.

FRY, B. G. From genome to "venome", **Genome Research** v.15, p.403-420, 2005

FRY, B. G., VIDAL, N., VAN DER WEERD, L., KOCHVA, E. & RENJIFO, C. Evolution and diversification of the Toxicofera reptile venom system, **Journal of Proteomics** v.72, p.127-136, 2009.

FUJISAWA, D.; YAMAZAKI, Y.; LOMONTE, B.; MORITA, T. Catalytically inactive phospholipase A₂ homologue binds to a vascular endothelial growth receptor-2 via a C-terminal loop region. **Biochem. J.** v.411, p.515-522, 2008.

GALLACCI, M.; CAVALCANTE, W. L. G. . Understanding the in vitro neuromuscular activity of snake venom Lys49 phospholipase A2 homologues. **Toxicon**, v. 55, p. 1-11, 2010.

GUIMARAES, J. A.; CARLINI, C. R. Most cited papers in *Toxicon*. **Toxicon**, v.44, p.345-359, 2004.

GUTIERREZ, J. M.; CHAVES, F.; CERDAS, L. Inflammatory infiltrate in skeletal muscle injected with *Bothrops asper* venom. **Rev Biol Trop**, v.34, p.209-214, 1986.

GUTIERREZ, J. M.; NUNEZ, J.; DIAZ, C.; CINTRA, A. C.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R. Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin-II, a phospholipase A2 isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. **Exp Mol Pathol**, v.55, p.217-229, 1991.

GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v.33, p.1405-1424, 1995

GUTIÉRREZ, J.M., THEAKSTON, R.D., WARRELL, D.A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. **PLoS Med** 3: e150, 2006.

HALL, B.G. **Phylogenetic tress made easy**. Sunderland: Sinauer Associates, 2008, 233p.

HAWGOOD B.J., SMITH J.W., The mode of action at the mouse neuromuscular junction of the phospholipase A-crotapotin complex isolated from venom of the South American rattlesnake, **Br J Pharmacol** v.61, p.597-606, 1977.

HAWGOOD, B.; BON, C. Snake venom presynaptic toxins. In: **Handbook of Natural Toxins, Reptile and Amphibian Venoms**. (TU, A.T. ed.), p.3-52, Marcel Dekker, New York, 1991.

HAWGOOD, B. J. Pioneers of anti-venomous serum therapy: Dr. Vital Brazil (1865-1950). **Toxicon**, v.30, p. 573-579, 1992.

HENDON R.A., FRAENKEL-CONRAT H., Biological roles of the two components of crotoxin, **Proc Natl Acad Sci USA** v.68, p.1560-1563, 1971.

HENDON, R.A.; TU, A.T. The role of crotoxin subunits in tropical rattlesnake neurotoxic action. **Biochim. Biophys Acta** v.578, p. 243-252, 1979..

HOLLAND, D. R.;CLANCY, L. L.;MUCHMORE, S. W.;RYDE, T. J.;EINSPAHR, H. M.;FINZEL, B. C.;HEINRIKSON, R. L.; WATENPAUGH, K. D. The crystal structure of a lysine 49 phospholipase A2 from the venom of the cottonmouth snake at 2.0-Å resolution. **J Biol Chem**, v.265, p.17649-17656, 1990.

HUANCAHUIRE-VEJA, S., PONCE-SOTO, L.A., MARTINS-DE-SOUZA, D., MARANGONI, S. Structural and functional characterization of brazilitoxins II and III (BbTX-II and -III), two myotoxins from the venom of Bothrops brazili snake. **Toxicon**, v. 54(6), p.818-827, 2009.

HUANG, H. C. Effects of phospholipases A2 from *Vipera russelli* snake venom on blood pressure, plasma prostacyclin level and renin activity in rats. **Toxicon**, v.22, p.253-264, 1984.

HOFMANN, A. Spectroscopic techniques: I Spectrophotometric techniques. In: WILSON, K. & WALKER J. (Ed.), **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**, Cambridge University Press, Cambridge, 2010.

JABEEN, T.;SINGH, N.;SINGH, R. K.;JASTI, J.;SHARMA, S.;KAUR, P.;SRINIVASAN, A.; SINGH, T. P. Crystal structure of a heterodimer of phospholipase A2 from *Naja naja sagittifera* at 2.3 Å resolution reveals the presence of a new PLA2-like protein with a novel cys 32-Cys 49 disulphide bridge with a bound sugar at the substrate-binding site. **Proteins**, v.62, p.329-337, 2006.

JANCARIK, J.; KIM, S. H. Sparse-Matrix Sampling - a Screening Method for Crystallization of Proteins. **Journal of Applied Crystallography**, v.24, p.409-411, 1991.

JANIN J., MILLER S., CHOTHIA, C. Surface, subunit interfaces and interior of oligomeric proteins. **J Mol Biol**, v.204 p.155-164, 1988.

JENG, I.; HENDON, R.A.; FRAENKEL-CONRAT, H. Search for relationships among the haemolytic, phospholipolytic and neurotoxic activities of snake venoms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.75, p.600-604, 1978.

KASTURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, A.R.; DE SILVA, N.; GUNAWARDENA, N.K.; PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R.; SAVIOLI, L.; LALLOO, D.G.; DE SILVA, H.J. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLoS Med.**, v.5, n.11, p.e218, 2008.

KELLY, S.M.; JESS, T.J.; PRICE, N.C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1751, p.119-139, 2005.

KOBE, B.; GLEICHMANN, T.; THE, T.; HEIERHOST, 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, p.127-151, 1999.

KOKUFUTA, E.; OGAWA, K.; DOI, R.; KIKUCHI, R.; FARINATO, R.S. Geometrical characteristics of polyelectrolyte nanogel particles and their polyelectrolyte complexes studied by dynamic and static light scattering. **J. Phys. Chem. N** v. 111, p. 8634-8640, 2007.

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

KRIZAJ, I.; FAURE, G.; GUBENSEK, F.; BON, C. Re-examination of crotoxin-membrane interactions. **Toxicon**, v.34, p. 1003-1009, 1996.

KYTE, J. & DOOLITTLE, R.F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. **J. Mol. Biol.** v.157, p.105-132, 1982.

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. Procheck - a Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. **Journal of Applied Crystallography**, v.26, p.283-291, 1993.

LEACH, A.R. **Molecular Modelling: Principles and Applications**. Dorset Press, Dorchester, 2001, 744p.

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

LESLIE A.G.W., Joint CCP4 + ESF-EAMCB **Newsletter on Protein Crystallography**, v.26 (1992).

LI, Y.; YU, B. Z.; ZHU, H.; JAIN, M. K.; TSAI, M. D. Phospholipase A2 engineering. Structural and functional roles of the highly conserved active site residue aspartate-49. **Biochemistry**, v.33, p.14714-14722, 1994.

LIMA, R.M., ESTEVÃO-COSTA, M.I., JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L., HO, P.L., DINIZ, M.R., FORTES-DIAS, C.L. Phospholipase A2 inhibitors (bPLIs) are encoded in the venom glands of *Lachesis muta* (Crotalinae, Viperidae) snakes. **Toxicon**, v.57, p.172-175, 2011.

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.

LIU, C. S.; KUO, P. Y.; CHEN, J. M.; CHEN, S. W.; CHANG, C. H.; TSENG, C. C.; TZENG, M. C.; LO, T. B. Primary structure of an inactive mutant of phospholipase A2 in the venom of *Bungarus fasciatus* (banded krait). **J Biochem**, v.112, p.707-713, 1992.

LIZANO, S.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; FOX, J.W.; LAMBEAU, G.; LAZDUNSKI, M.; GUTIÉRREZ, J.M. Two phospholipase A2 inhibitors from the plasma of *Cerrophidion (Bothrops) godmani* which selectively inhibit two different group-II phospholipase A2 myotoxins from its own venom: isolation, molecular cloning and biological properties. **Biochem J**. v.346, p.631-639, 2000.

LIZANO, S.; DOMONT, G.; PERALES, J. Natural phospholipase A2 myotoxin inhibitor proteins from snakes mammals and plants, **Toxicon** v.42, p.963-977, 2003.

LLORET, S.; MORENO, J. J. Oedema formation and degranulation of mast cells by phospholipase A2 purified from porcine pancreas and snake venoms. **Toxicon**, v.31, p.949-956, 1993.

LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L. A. Broad cytolytic specificity of myotoxin II, a lysine-49 phospholipase A2 of *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v.32, p.1359-1369, 1994.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERON, 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, 2003.

- 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, 2003.
- LOVELL, S. C.; DAVIS, I. W.; ARENDALL, W. B., 3RD; DE BAKKER, P. I.; WORD, J. M.; PRISANT, M. G.; RICHARDSON, J. S.; RICHARDSON, D. C. Structure validation by Calpha geometry: phi, psi and Cbeta deviation. **Proteins**, v.50, p.437-450, 2003.
- MADDISON, W.P.; MADDISON, D.R. **Mesquite: a modular system for evolutionary analysis**. Version 2.75. Disponível em <http://mesquiteproject.org>, 2011.
- MAGRO, A. J.; FERNANDES, C. A.; DOS SANTOS, J. I.; FONTES, M. R. Influence of quaternary conformation on the biological activities of the Asp49-phospholipases A2s from snake venoms. **Protein Pept Lett**, v.16, p.852-859, 2009.
- MANCIN, A. C.; SOARES, A. M.; GIGLIO, C. A.; ANDRILAO-ESCARSO, S. H.; VIEIRA, C. A.; GIGLIO, J. R. The histamine releasers crotamine, protamine and compound 48/80 activate specific proteases and phospholipases A2. **Biochem Mol Biol Int**, v.42, p.1171-1177, 1997.
- MANCUSO, L.C.; CORREA, M.M.; VIEIRA, C.A.; SELISTRE DE ARAÚJO, H.S.; OWNBY, O.; CUNHA, O.A.B.; LACHAT, J.J.; 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.
- MARAGANORE, J. M.; MERUTKA, G.; CHO, W.; WELCHES, W.; KEZDY, F. J.; HEINRIKSON, R. L. A new class of phospholipases A2 with lysine in place of aspartate 49. Functional consequences for calcium and substrate binding. **J Biol Chem**, v.259, p.13839-13843, 1984.
- MARCHI-SALVADOR, D. P., SILVEIRA, L. B., SOARES, A. M. & FONTES, M. R. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of myotoxin I, a Lys49-phospholipase A2 from *Bothrops moojeni*. **Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun** v.61, p.882-884, 2005
- MARCHI-SALVADOR D.P., CORREA L.C., MAGRO A.J., OLIVEIRA C.Z., SOARES A.M., FONTES M.R., 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** v.72 p.883-891, 2008.
- MARTI-RENOM, M.A.; STUART, A.C.; FISER, A.; SALI, A. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.** v.29, p. 291-325, 2000.
- McCOY, A.J., GROSSE-KUNSTLEVE, R.W., ADAMS, P.D., WINN, M.D., STORONI, L.C., & READ, R.J. Phaser crystallographic software. **J. Appl. Cryst.**, v.40, p.658-674, 2007.
- MCPHERSON, A. **Introduction to Macromolecular Crystallography**. Hoboken: Wiley-Liss. 2003
- MCREE, D.E. **Practical Protein Crystallography**. San Diego: Academic Press, 1993, 386p.
- MEBS, D.; KUCH, U.; CORONAS, F. I.; BATISTA, C. V.; GUMPRECHT, A.; POSSANI, L. D. Biochemical and biological activities of the venom of the Chinese pitviper *Zhafermia mangshanensis*, with the complete amino acid sequence and phylogenetic analysis of a novel Arg49 phospholipase A2 myotoxin. **Toxicon**, v.47, p.797-811, 2006.
- MELGAREJO, A. R. **Serpentes Peçonhentas do Brasil**. In: J. L. C. Cardoso, França, F.O.S., Wen, F.H., Málague, C.M.S., Haddad Jr., V. (Ed.). **Animais Peçonhentos no Brasil**. São Paulo: SARVIER, 2003. Serpentes Peçonhentas do Brasil
- MOOLENAAR, W. H.; VAN MEETEREN, L. A.; GIEPMANS, B. N. The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. **Bioessays**, v.26, p.870-881, 2004.
- MORS, W. B.; NASCIMENTO, M. C.; PEREIRA, B. M. R.; PEREIRA, N. A. Plant natural products active against snake bite: the molecular approach. **Phytochemistry** v.55, p.627-642, 2000.

- MURAKAMI, M. T.;ARRUDA, E. Z.;MELO, P. A.;MARTINEZ, A. B.;CALIL-ELIAS, S.;TOMAZ, M. A.;LOMONTE, B.;GUTIERREZ, J. M.; ARNI, R. K. Inhibition of myotoxic activity of *Bothrops asper* myotoxin II by the anti-trypanosomal drug suramin. **Journal of Molecular Biology**, v.350, p.416-426, 2005.
- MURAKAMI, M. T.;VICOTI, M. M.;ABREGO, J. R. B.;LOURENZONI, M. R.;CINTRA, A. C. O.;ARRUDA, E. Z.;TOMAZ, M. A.;MELO, P. A.; ARNI, R. K. Interfacial surface charge and free accessibility to the PLA(2)-active site-like region are essential requirements for the activity of Lys49 PLA(2) homologues. **Toxicon**, v.49, p.378-387, 2007.
- MURAKAMI, M. T.;KUCH, U.;BETZEL, C.;MEBS, D.; ARNI, R. K. Crystal structure of a novel myotoxic Arg49 phospholipase A(2) homolog (zhaoermiatoxin) from *Zhaoermia mangshanensis* snake venom: Insights into Arg49 coordination and the role of Lys122 in the polarization of the C-terminus. **Toxicon**, v.51, p.723-735, 2008.
- MURSHUDOV, G. N.;VAGIN, A. A.; DODSON, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v.53, p.240-255, 1997.
- NAVAZA, J.; SALUDJIAN, P; AMoRe: An Automated Molecular Replacement Program Package. In: CARTER, C.W.; SWEET, R.M. (Eds.) **Methods in Enzymology: Macromolecular Crystallography**, v.276,p. 581-593, Nova Iorque: Academic Press Inc., 1997.
- NAOI, M.N.; MISAKO, N.; SHIMIZU, T.; MALVIYA, A.N.; YAGI, K. Permeability of amino acids into liposomes. **Biochim. Biophys. Acta** v.471, p.305-310, 1977.
- NOBUHISA, I., CHIWATA, T., FUKUMAKI, Y., HATTORI, S., SHIMOHIGASHI, Y., OHNO, M., Structural elements of *Trimeresurus flavoviridis* serum inhibitors for recognition of its venom phospholipase A2 isozymes. **FEBS Lett.** v.429, p.385-389, 1998.
- NUNEZ, C. E.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Identification of the myotoxic site of the Lys49 phospholipase A(2) from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* snake venom: synthetic C-terminal peptides from Lys49, but not from Asp49 myotoxins, exert membrane-damaging activities. **Toxicon**, v.39, p.1587-1594, 2001.
- 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.
- OHKURA N., OKUHARA H., INOUE S., IKEDA K., HAYASHI K., Purification and characterization of three distinct types of phospholipase A2 inhibitors from the blood plasma of the Chinese mamushi *Agkistrodon blomhoffii siniticus*, **Biochem. J.** v.325, p.527-531, 1997.
- OKUMURA, K., MASUI, K., INOUE, S., IKEDA, K., HAYASHI, K., Purification, characterization and cDNA cloning of a phospholipase A2 inhibitor from the serum of the non-venomous snake *Elaphe quadrivirgata*. **Biochem. J.** v.341, p.165-171, 1997.
- OKUMURA, K., INOUE, S., IKEDA, K., HAYASHI, K., Identification of b-type phospholipase A2 inhibitor in a nonvenomous snake *Elaphe quadrivirgata*. **Arch. Biochem. Biophys.** v.408, p.124-130, 2002.
- de OLIVEIRA, A.H.C.; GIGLIO, J.R.; ANDRILAO-ESCARSO, A.S., ITO, A.S.; WARD, R.J. A pH-induced dissociation of the dimeric form a lysine 49 phospholipase A2 abolishes Ca²⁺-independent membrane damaging activity. **Biochemistry** v.40, p.6912-6920, 2001.
- OOSTENBRINK, C.; SOARES, T. A.; VAN DER VEGT, N. F. A.; VAN GUNSTEREN, W. F. Validation of the 53A6 GROMOS force field. **Eur. Biophys. J.**, v.34, p.273-284, 2005.
- OTWINOWSKI, Z.; MINOR, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. **Macromolecular Crystallography, Pt A**, v.276, p.307-326, 1997.
- PAN, H.; LIU, X. L.;OU-YANG, L. L.;YANG, G. Z.;ZHOU, Y. C.;LI, Z. P.; WU, X. F. Diversity of cDNAs encoding phospholipase A2 from *Agkistrodon halys pallas* venom, and its expression in *E. coli*. **Toxicon**, v.36, p.1155-1163, 1998.

- PARAMO, L.; LOMONTE, B.; PIZARRO-CERDA, J.; BENGOCHEA, J. A.; GORVEL, J. P.; MORENO, E. Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops asper* snake venom--synthetic Lys49 myotoxin II-(115-129)-peptide identifies its bactericidal region. **Eur J Biochem**, v.253, p.452-461, 1998.
- PEREIRA-LEAL, J. B., LEVY, E. D., KAMP, C. & TEICHMANN, S. A. Evolution of protein complexes by duplication of homomeric interactions **Genome Biol.**, v.8, R51, 2007.
- PINHO, F.M.O.; PEREIRA, I.D. Ofidismo. **Rev. Ass. Med. Bras.**, v.47(1), p.21-29, 2001.
- POLGAR, J.; MAGNENAT, E. M.; PEITSCH, M. C.; WELLS, T. N.; CLEMETSON, K. J. Asp-49 is not an absolute prerequisite for the enzymic activity of low-M(r) phospholipases A2: purification, characterization and computer modelling of an enzymically active Ser-49 phospholipase A2, ecarpholin S, from the venom of *Echis carinatus sochureki* (saw-scaled viper). **Biochem J**, v.319, p.961-968, 1996.
- POTTERTON, L.; MCNICHOLAS, S.; KRISSINEL, E.; GRUBER, J.; COWTAN, K.; EMSLEY, P.; MURSHUDOV, G. N.; COHEN, S.; PERRAKIS, A.; NOBLE, M. Developments in the CCP4 molecular-graphics project. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v.60, p.2288-2294, 2004.
- PRESCOTT, S. M.; ZIMMERMAN, G. A.; STAFFORINI, D. M.; MCINTYRE, T. M. Platelet-activating factor and related lipid mediators. **Annu Rev Biochem**, v.69, p.419-445, 2000.
- PRIJATELJ, P., PRAZNIKAR, Z.J., PETAN, T., KRIZAJ, I., PUNGERCAR, J. Mapping the structural determinants of presynaptic neurotoxicity of snake venom phospholipases A2. **Toxicon** v.51, p.1520-1529, 2008.
- RADVANYI, F.; BON, C. Catalytic activity and reactivity with p-bromophenacyl bromide of the phospholipase subunit of crotoxin: influence of dimerization and association with the noncatalytic subunit. **J. Biol. Chem.**, v.257, p.12612-12632, 1982.
- RENETSEDER R.; BRUNIE, S.; DIJKSTRA, B.W.; DRENTH, D.J.; SIGLER, P.B. A comparison of the crystal structures of phospholipase A₂ from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. **J. Biol. Chem.**, v.260, p.11627-11634, 1985.
- RODRIGUES-SIMIONI, L.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CINTRA, A. C.; GIGLIO, J. R.; JIANG, M. S.; FLETCHER, J. E. No role for enzymatic activity or dantrolene-sensitive Ca²⁺ stores in the muscular effects of bothroptoxin, a Lys49 phospholipase A2 myotoxin. **Toxicon**, v.33, p.1479-1489, 1995.
- ROGERS, J.; YU, B. Z.; SERVES, S. V.; TSIVGOULIS, G. M.; SOTIROPOULOS, D. N.; IOANNOU, P. V.; JAIN, M. K. Kinetic basis for the substrate specificity during hydrolysis of phospholipids by secreted phospholipase A2. **Biochemistry**, v.35, p.9375-9384, 1996.
- ROMÃO, M.J. Cristalografia de proteínas: Metodologias e Aplicações em Bioquímica. **Boletim de Biotecnologia** v.53, p.18-36, 1996.
- ROSENBERG, P.; CONDREA, E.; RAPUANO, B. E.; SOONS, K. R.; YANG, C. C. Dissociation of pharmacological and enzymatic activities of snake venom phospholipases A2 by modification of carboxylate groups. **Biochem Pharmacol**, v.32, p.3525-3530, 1983.
- SAMPAIO, S.C.; HYSLOP, S.; FONTES, M.R.M.; PRADO-FRANCESCHI, J.; ZAMBELLI, V.O.; MAGRO, A.J.; BRIGATTE, P.; GUTIERREZ, V.P., CURY, Y. Crotoxin: Novel Activities for a classic b-neurotoxin. **Toxicon**, v. 55, p.1045-1060, 2010.
- SAMY, R.P.; THWIN, M.M.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; IGNACIMUTHU, S. Ethnobotanical survey of folk plants for the treatment of snakebites in Southern part of Tamilnadu, India. **J. Ethnopharmacol.** v. 115, p. 302-312, 2008.
- dos SANTOS, J. I.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. Comparative structural studies on Lys49-phospholipases A(2) from *Bothrops* genus reveal their myotoxic site. **J Struct Biol**, v.167, p.106-116, 2009.

- dos SANTOS, J. I., CINTRA-FRANCISCHINELLI, M., BORGES, R. J., FERNANDES, C. A., PIZZO, P., CINTRA, A. C., BRAZ, A. S., SOARES, A. M., FONTES, M. R. Structural, functional, and bioinformatics studies reveal a new snake venom homologue phospholipase A2 class. **Proteins** v.79, p.61-78, 2011.
- SANTOS-FILHO, N.A., FERNANDES, C.A., MENALDO, D.L., MAGRO, A.J., FORTES-DIAS, C.L., ESTEVÃO-COSTA, MI., FONTES, M.R., SANTOS, C.R., MURAKAMI, M.T., SOARES, A.M. Molecular cloning and biochemical characterization of a myotoxin inhibitor from *Bothrops alternatus* snake plasma **Biochimie**, v.93 (5), p.583-592, 2011.
- SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. **Biochim Biophys Acta**, v.1761, p.1246-1259, 2006.
- SCHWARTZ, A. S.; PACHTER, L. Multiple alignment by sequence annealing. **Bioinformatics**, v.23, p.e24-29, 2007.
- SCOTT, D. L.; OTWINOWSKI, Z.; GELB, M. H.; SIGLER, P. B. Crystal structure of bee-venom phospholipase A2 in a complex with a transition-state analogue. **Science**, v.250, p.1563-1566, 1990.
- SCOTT, D. L.; WHITE, S. P.; OTWINOWSKI, Z.; YUAN, W.; GELB, M. H.; SIGLER, P. B. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A2. **Science**, v.250, p.1541-1546, 1990.
- SCOTT, D. L.; ACHARI, A.; VIDAL, J. C.; SIGLER, P. B. Crystallographic and biochemical studies of the (inactive) Lys-49 phospholipase A2 from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*. **J Biol Chem**, v.267, p.22645-22657, 1992.
- SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; WHITE, S.P.; OWNBY, C.I. cDNA cloning and sequence analysis of a lysine-49 phospholipase A₂ myotoxin from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 326, p.21-30, 1996.
- SHIMOHIGASHI, Y.; TANI, A.; MATSUMOTO, H.; NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI, Y. Lysine-49-phospholipases A2 from *Trimeresurus flavoviridis* venom are membrane-acting enzymes. **J Biochem**, v.118, p.1037-1044, 1995.
- SHRIVE, A.K.; THARIA, H.A.; STRONG, P.; KISHORE, U.; BURNS, I.; RIZKLLAH, P.J.; REID, K.B.M.; GREENHOUGH, T.J. High-resolution structure insights into ligand binding and immune cell recognition by human lung surfactant protein D. **J. Mol. Biol.** v. 331, p. 509-523, 2003.
- da SILVA GIOTTO, M. T.; GARRATT, R. C.; OLIVA, G.; MASCARENHAS, Y. P.; GIGLIO, J. R.; CINTRA, A. C. O.; DE AZEVEDO, 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-Structure Function and Bioinformatics**, v.30, p.442-454, 1998.
- SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. **Biochim Biophys Acta**, v.1488, p.1-19, 2000.
- SOARES, A. M.; GUERRA-SA, R.; BORJA-OLIVEIRA, C. R.; RODRIGUES, V. M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A(2) homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Arch Biochem Biophys**, v.378, p.201-209, 2000.
- SOARES, A.M.; ANDRILAO-ESCARSO, S.H.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J.M. MARANGONI, S.; TOYAMA, M.H.; ARNI, R.K.; GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49-phospholipase A(2) homologue from *Bothrops moojeni* (Caissaca) snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 373, p.7-15, 2000.
- 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 A(2) homologue from *Bothrops jararacussu* snake venom. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.34, p.668-677, 2002.

SOARES, A.M, TICLI, F.K., MARCUSSI, S., LOURENÇO, M.V., JANUÁRIO, A.H., SAMPAIO, S.V., GIGLIO, J.R., LOMONTE, B., PEREIRA, P.S. Medicinal Plants with Inhibitory Properties Against Snake Venoms, **Current Medical Chemistry** v.12 p.2625-2641, 2005.

SOUZA, D. H.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; GARRATT, R. C. Determination of the three-dimensional structure of toxins by protein crystallography. **Toxicon**, v.38, n.10, p.1307-53. 2000.

SREERAMA, N.; R.W. WOODY, R.W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. **Anal. Biochem.** v.282, p.252-260, 2000.

STURA, E.A. Seeding. In: BERGFORGS, T.M. (Ed.) **Protein Crystallization Tecniques, Strategies and Tips - A Laboratory Manual**. La Jolla: Hardcover, p.142-162, 1999.

SVERGUN, D.I. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. **J. Appl. Cryst.** v. 25, p.495-503, 1992.

SVERGUN, D.I., BARBERATO, C. & KOCH, M.H.J. CRY SOL – a Program to Evaluate X-ray Solution Scattering of Biological Macromolecules from Atomic Coordinates **J. Appl. Cryst.** v.28, p.768-773, 1995.

SVERGUN, D.I. Restoring low-resolution structure of biological macromolecules in solution. **Biophys. J.**, v.76, p. 2879-2886, 1999.

SVERGUN, D.I.; PETOUKHOV, M.V.; KOCH, M.H.J. Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering. **Biophys. J.**, v.80, p. 2946-2953, 2001.

SVERGUN, D.I.; KOCH, M.H.J. Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution. **Reports on Progress in Physics**, v.66, p.1735-1782, 2003.

THEAKSTON, R.D.G.; REID, H.A. Development of a simple assay procedure for the characterization of snake venoms. **Bull WHO**, v.61, p.949-956, 1983.

TSAI, C.J., LIN, S.L., WOLFSON, H.J., NUSSINOV, R. Studies of protein-protein interfaces: a statistical analysis of the hydrophobic effect. **Protein Sci**, v.6 p.53–64, 1997.

TSUBOI, K.;SUGIMOTO, Y.; ICHIKAWA, A. Prostanoid receptor subtypes. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v.68-69, p.535-556, 2002.

THWIN, M.M.; SATISH, R.; CHAN; S.T.F.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Functional site of endogenous phospholipase A₂ inhibitor from python serum. **Eur. J. Biochem.** v.269, p. 719-727, 2002.

VAGIN, A.; TEPLYAKOV, A. Molecular Replacement with MOLREP. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v.66, p.22-25, 2010.

VAN DEN BERGH, C. J.;SLOTBOOM, A. J.;VERHEIJ, H. M.; DE HAAS, G. H. The role of aspartic acid-49 in the active site of phospholipase A₂. A site-specific mutagenesis study of porcine pancreatic phospholipase A₂ and the rationale of the enzymatic activity of [lysine49] phospholipase A₂ from *Agkistrodon piscivorus piscivorus*' venom. **Eur J Biochem**, v.176, p.353-357, 1988.

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

WALLACE, A.C., LASKOWSKI, R.A.; THORNTON, J.M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **Protein Eng.** v.8, p. 127-134 (1996).

WARD, R. J.; DE OLIVEIRA, A. H. C.;BORTOLETO, R. K.;ROSA, J. C.;FACA, V. M.; GREENE, L. J. Refolding and purification of bothropstoxin-1, a Lys49 - Phospholipase A(2) homologue, expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v.21, p.134-140, 2001.

WARD, R. J.; CHIOATO, L.; DE OLIVEIRA, A. H. C.; RULLER, R.; SA, J. M. Active-site mutagenesis of a Lys(49)-phospholipase A(2): biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis. **Biochemical Journal**, v.362, p.89-96, 2002.

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** v87, p.161-167, 2005.

WESTERLUND, B.; NORDLUND, P.; UHLIN, U.; EAKER, D.; EKLUND, H. The three-dimensional structure of notexin, a presynaptic neurotoxic phospholipase A2 at 2.0 Å resolution. **FEBS Lett**, v.301, p.159-164, 1992.

WHITMORE, L. & WALLACE, B.A. Protein secondary structure analysis from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. **Biopolymers**, v. 89, p. 392-400, 2008.

WILLIAMS, D.; GUTIÉRREZ, J.M.; HARRISON, R.; WHITE, J.; WINKEL, K.D.; GOPALAKIRSNAKONE, P. The global snake bite initiative: an antidote for snake bite. **Lancet**, v.375, p. 89-91, 2010.

WILSON, K. Cell membrane receptors and cell signaling. In: WILSON, K. & WALKER J. (Ed.), **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**, Cambridge University Press, Cambridge, 2010.

WIMLEY, W.C & WHITE, S.H. Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. **Nat. Struct. Biol.** v.3, p. 842-848, 1996.

YAMAZAKI, Y.; MATSUNAGA, Y.; NAKANO, Y.; MORITA, T. Identification of a vascular endothelial growth factor receptor binding protein in the venom of Eastern cottonmouth. **J. Biol. Chem.** v.280, p.29989-29992, 2005.

YOSHIZUMI, K.; LIU, S. Y.; MIYATA, T.; SAITA, S.; OHNO, M.; IWANAGA, S.; KIHARA, H. Purification and amino acid sequence of basic protein I, a lysine-49-phospholipase A2 with low activity, from the venom of *Trimeresurus flavoviridis* (Habu snake). **Toxicon**, v.28, p.43-54, 1990.

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 phospholipase A2. **Biochemistry**, v.32, p.6485-6492, 1993.

YU, B. Z.; ROGERS, J.; NICOL, G. R.; THEOPOLD, K. H.; SESHADRI, K.; VISHWESHWARA, S.; JAIN, M. K. Catalytic significance of the specificity of divalent cations as KS* and kcat* cofactors for secreted phospholipase A2. **Biochemistry**, v.37, p.12576-12587, 1998.

YUAN, Y.; JACKSON, S.P.; MITCHELL, C.A.; SALEM, H.H. Purification and characterization of a snake venom phospholipase A₂: a potent inhibitor of platelet aggregation. **Thromb. Res.**, v.70, p.471-481, 1993.

Anexos

Trabalhos publicados referentes à resultados apresentados neste trabalho.

1. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of three myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops brazili* venom;
2. Structural bases for a complete myotoxic mechanism: Crystal structures of two non-catalytic phospholipases A₂-like from *Bothrops brazili* venom;
3. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a Lys49-phospholipase A₂ complexed with caffeic acid, a molecule with inhibitory properties against snake venoms;
4. Structural and Phylogenetic Studies with MjTX-I Reveal a Multi-Oligomeric Toxin – a Novel Feature in Lys49-PLA₂s Protein Class;
5. Molecular cloning and biochemical characterization of a myotoxin inhibitor from *Bothrops alternatus* snake plasma.

Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of three myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops brazili* venom

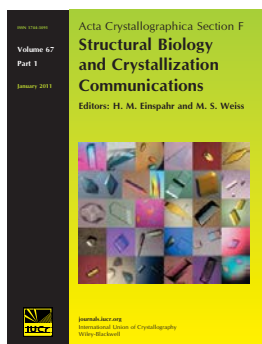
Carlos A. H. Fernandes, Elaine C. G. Gartuzo, Ivan Pagotto, Edson J. Comparetti, Salomón Huancahuire-Vega, Luis Alberto Ponce-Soto, Tássia R. Costa, Sergio Marangoni, Andreimar M. Soares and Marcos R. M. Fontes

Acta Cryst. (2012). **F68**, 935–938

Copyright © International Union of Crystallography

Author(s) of this paper may load this reprint on their own web site or institutional repository provided that this cover page is retained. Reproduction of this article or its storage in electronic databases other than as specified above is not permitted without prior permission in writing from the IUCr.

For further information see <http://journals.iucr.org/services/authorrights.html>



Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications is a rapid all-electronic journal, which provides a home for short communications on the crystallization and structure of biological macromolecules. Structures determined through structural genomics initiatives or from iterative studies such as those used in the pharmaceutical industry are particularly welcomed. Articles are available online when ready, making publication as fast as possible, and include unlimited free colour illustrations, movies and other enhancements. The editorial process is completely electronic with respect to deposition, submission, refereeing and publication.

Crystallography Journals **Online** is available from journals.iucr.org

Carlos A. H. Fernandes,^a
Elaine C. G. Gartuzo,^a Ivan
Pagotto,^a Edson J. Comparetti,^a
Salomón Huancahuire-Vega,^b
Luis Alberto Ponce-Soto,^{b,c}
Tássia R. Costa,^d Sergio
Marangoni,^b Andreimar M.
Soares^e and Marcos R. M.
Fontes^{a*}

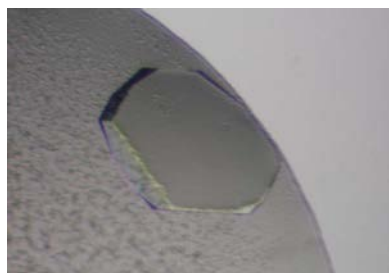
^aDepartamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Toxinas, CNPq, Brazil,

^bDepartamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, Brazil, ^cDepartamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, Brazil, ^dDepartamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, FCFRP, USP, Ribeirão Preto-SP, Brazil, and ^eFundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ Rondônia e Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas, Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho-RO, Brazil

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

Received 28 November 2011

Accepted 8 June 2012



© 2012 International Union of Crystallography
All rights reserved

Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of three myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops brazili* venom

Two myotoxic and noncatalytic Lys49-phospholipases A₂ (braziliantoxin-II and MT-II) and a myotoxic and catalytic phospholipase A₂ (braziliantoxin-III) from the venom of the Amazonian snake *Bothrops brazili* were crystallized. The crystals diffracted to resolutions in the range 2.56–2.05 Å and belonged to space groups *P*3₁21 (braziliantoxin-II), *P*6₅22 (braziliantoxin-III) and *P*2₁ (MT-II). The structures were solved by molecular-replacement techniques. Both of the Lys49-phospholipases A₂ (braziliantoxin-II and MT-II) contained a dimer in the asymmetric unit, while the Asp49-phospholipase A₂ braziliantoxin-III contained a monomer in its asymmetric unit. Analysis of the quaternary assemblies of the braziliantoxin-II and MT-II structures using the *PISA* program indicated that both models have a dimeric conformation in solution. The same analysis of the braziliantoxin-III structure indicated that this protein does not dimerize in solution and probably acts as a monomer *in vivo*, similar to other snake-venom Asp49-phospholipases A₂.

1. Introduction

Envenomation resulting from snakebites is an important public health problem in rural areas of Asia, Africa and Latin America. A recent study estimated that at least 421 000 envenomations and 20 000 deaths from ophidian accidents occur each year (Kasturiratne *et al.*, 2008). However, owing to scarce statistical data on this topic, these numbers may be as high as 1 841 000 envenomations and 94 000 deaths (Kasturiratne *et al.*, 2008). The mortality caused by snake bites is much greater than those caused by several neglected tropical diseases, including dengue haemorrhagic fever, cholera, leishmaniasis, schistosomiasis and Chagas disease (Williams *et al.*, 2010). Only in recent years has this subject attracted massive attention from the scientific community, with the publication of important articles and reviews on the real impact of snakebites on health services (Gutiérrez *et al.*, 2006; Kasturiratne *et al.*, 2008; Williams *et al.*, 2010). The World Health Organization (WHO) has recognized snakebites as a neglected tropical disease and the International Society on Toxicology has created The Global Snakebite Initiative (Williams *et al.*, 2010). Both initiatives aim to reduce snakebite morbidity and mortality through a programme of sustainable approaches and outcome-oriented strategies. Although the majority of deaths owing to snakebite envenomation occur in south and south-east Asia and in sub-Saharan Africa (Kasturiratne *et al.*, 2008), these accidents are also an important health problem in Latin America (Gutiérrez & Lomonte, 1995). They may result in drastic tissue damage and permanent disability (Gutiérrez & Lomonte, 1995), leading to economic and social problems. Snakes of the *Bothrops* genus (Viperidae family) are responsible for more than 85% of all reported ophidian accidents in Latin America (Fundação Nacional de Saúde, 2001; de Oliveira, 2009), and phospholipases A₂ (PLA₂s) are one of the main components of their venoms (Fox & Serrano, 2008). These enzymes promote Ca²⁺-dependent hydrolysis of the *sn*-2 acyl groups of membrane phospholipids, releasing fatty acids and lysophospholipids (Schaloske & Dennis, 2006). In addition to their catalytic activity, these proteins are involved in a wide spectrum of pharmacological activities, including neurotoxicity, myotoxicity and cardiotoxicity (Bon *et al.*, 1979; Fletcher *et al.*, 1981; Gutiérrez *et al.*, 1991).

The catalytic site of these proteins is formed by a histidine at position 48 (according to the numbering system proposed by Renetseder *et al.*, 1985) and the conserved residues Asp49, Tyr52 and Asp99. Two catalytic mechanisms of phospholipid hydrolysis by PLA₂s have been proposed: the single-water mechanism (Scott, Otwinowski *et al.*, 1990; Scott, White *et al.*, 1990) and the assisting-water mechanism (Rogers *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1998). Briefly, the single-water mechanism proposes that after phospholipid binding His48 N^{δ1} abstracts a proton from a structurally conserved water, initiating nucleophilic attack on the *sn*-2 position of the substrate and forming an intermediate tetrahedral oxyanion which is stabilized by the Ca²⁺ cofactor (Scott, Otwinowski *et al.*, 1990; Scott, White *et al.*, 1990). The assisting-water mechanism suggests that two different water molecules are involved in the formation and breakdown of the tetrahedral intermediate. In this model, a water molecule coordinated by the Ca²⁺ ion performs the nucleophilic attack. This catalytic water is also stabilized by a second water molecule that is hydrogen bonded to His48 and Asp99 (Rogers *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1998).

In snakes of the Viperidae family, an important subgroup of PLA₂s, the Lys49-PLA₂s, are found that exhibit natural replacements of the Tyr28 and Asp49 residues by Asn28 and Lys49, respectively (Holland *et al.*, 1990; Fernandes *et al.*, 2010). These substitutions hinder binding of the Ca²⁺ ion, the essential cofactor for PLA₂ catalysis, resulting in an inability to promote phospholipid hydrolysis (Arni & Ward, 1996; Fernandes *et al.*, 2010). Despite their catalytic inactivity, Lys49-PLA₂s play an important role in ophidic accidents, inducing drastic local myonecrosis by a Ca²⁺-independent mechanism which is not efficiently neutralized by conventional serum therapy, the action of which is related to systemic mechanisms (Gutiérrez & Lomonte, 1995). Synthetic peptides and site-directed mutagenesis experiments have shown that the 115–129 segment of the C-terminal region is responsible for this myotoxic activity (Ward *et al.*, 2002; Lomonte *et al.*, 2003; Chioato *et al.*, 2007). Recently, a myotoxic site in Lys49-PLA₂s that is specific to venoms from snakes of the *Bothrops* genus has been proposed that contains three residues: Lys115, Arg118 (C-terminus) and Lys20 (N-terminus) (dos Santos, Soares *et al.*, 2009).

B. brazili is a snake that lives in the Amazonian region, being found in Brazil, Colombia, Ecuador, Guyana, Peru, Suriname and French Guiana (Campbell & Lamar, 2004). Access to antivenoms in the remote areas of this region is very limited owing to natural geographic barriers and the vast territory. Moreover, the commercial therapeutic anti-bothropic serum produced by the Butantan Institute (Brazil) has a low efficacy against Amazonian snakes (Muniz *et al.*, 2000). Despite the large amount of protein structural data available for snakes of the *Bothrops* genus (Magro *et al.*, 2004; Murakami *et al.*, 2007; dos Santos, Fernandes *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2010; dos Santos *et al.*, 2011), no structural studies related to Amazonian snakes have been reported to date.

In this work, we report the crystallization, X-ray diffraction data collection and molecular-replacement solution of three myotoxic phospholipases A₂ (the Asp49-PLA₂ braziliantoxin-III and the Lys49-PLA₂s braziliantoxin-II and MT-II) from the venom of the Amazonian snake *B. brazili*.

2. Materials and methods

2.1. Protein purification and crystallization

Braziliantoxin II (BbTX-II) and braziliantoxin-III (BbTX-III) were isolated from *B. brazili* venom by single-step reverse-phase HPLC as described previously (Huancahuire-Vega *et al.*, 2009). MT-II was obtained by the fractionation of *B. brazili* venom on a

CM-Sepharose column (2 × 20 cm) as described previously (Costa *et al.*, 2008). Lyophilized samples of BbTX-III and MT-II were dissolved in ultrapure water to a concentration of 12 mg ml⁻¹. A lyophilized sample of BbTX-II was dissolved in 300 mM phosphate buffer to the same concentration. The sparse-matrix method (Jancarik & Kim, 1991) was used to perform initial screening of the crystallization conditions (Crystal Screen, Hampton Research). All crystals were obtained using the conventional hanging-drop vapour-diffusion method (McPherson, 2003), in which 1 μl protein solution and 1 μl reservoir solution were mixed and equilibrated against the following reservoir solutions (500 μl): 30% (w/v) polyethylene glycol 4000, 0.25 M lithium sulfate, 0.1 M Tris-HCl pH 8.5 for BbTX-II, 2% (w/v) polyethylene glycol 400, 2.0 M ammonium sulfate, 0.1 M Na HEPES

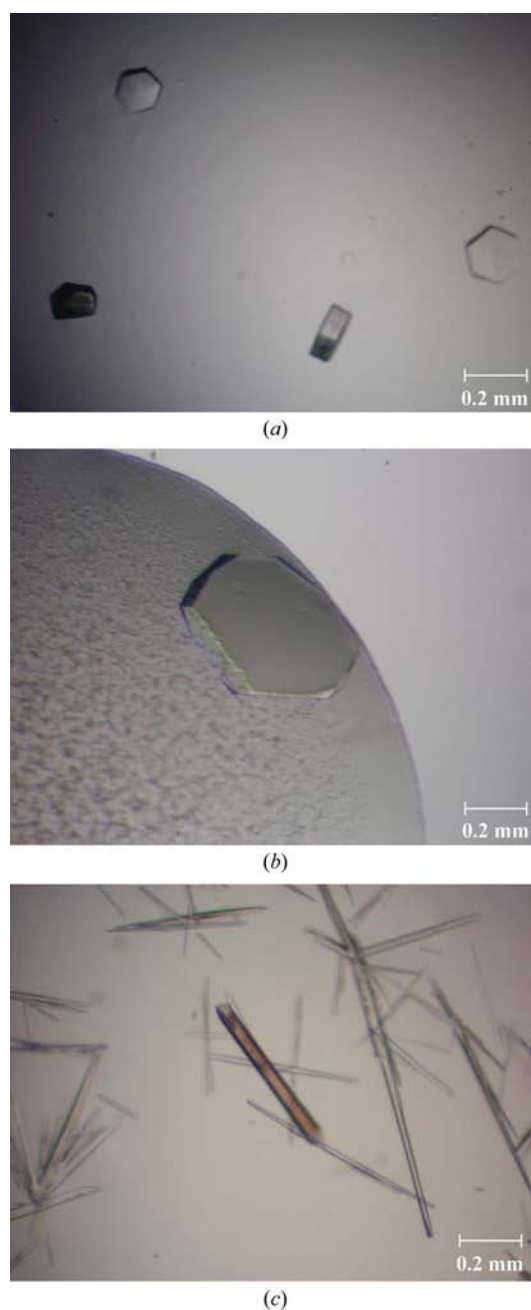


Figure 1 Crystals of the three myotoxic phospholipases A₂ from *B. brazili* venom. (a) Braziliantoxin-II, (b) braziliantoxin-III, (c) MT-II.

Table 1
X-ray diffraction data-collection and processing statistics.

Values in parentheses are for the highest resolution shell.

	BbTX-II	BbTX-III	MT-II
Unit-cell parameters (Å, °)	$a = b = 56.43,$ $c = 129.08$	$a = b = 70.818,$ $c = 105.83$	$a = 39.01, b = 71.41,$ $c = 44.42,$ $\beta = 102.5$
Space group	$P3_121$	$P6_522$	$P2_1$
Resolution (Å)	40–2.11 (2.19–2.11)	50–2.70 (2.80–2.70)	20–2.08 (2.15–2.08)
Unique reflections	13825 (1381)	4562 (443)	13821 (1396)
Completeness (%)	95.9 (98.7)	97.2 (99.1)	96.4 (97.5)
$R_{\text{merge}}^{\dagger}$ (%)	6.3 (49.0)	13.4 (48.4)	12.9 (35.3)
Radiation source	MX1 station, LNLS		
Data-collection temperature (K)	100		
Average $I/\sigma(I)$	21.09 (2.95)	11.05 (3.48)	6.63 (2.05)
Multiplicity	4.9 (4.8)	7.5 (8.9)	2.8 (2.8)
Matthews coefficient V_M (Å ³ Da ⁻¹)	2.12	2.74	2.16
Molecules in the asymmetric unit	2	1	2
Solvent content (%)	41.99	55.07	43.02

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

pH 7.5 for BbTX-III and 30% (w/v) polyethylene glycol 8000, 0.25 M ammonium sulfate, 0.1 M sodium cacodylate pH 6.5 for MT-II. Crystals were grown at 291 K for approximately three weeks for MT-II and BbTX-II and for three months for BbTX-III (Fig. 1).

2.2. X-ray data collection and processing

X-ray diffraction data from all crystals were collected at a wavelength of 1.435 Å 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 a nylon loop and flash-cooled in a stream of nitrogen gas at 100 K without using a cryoprotectant. The data were processed using the *HKL* program package (Otwinowski & Minor, 1997).

3. Results and discussion

Data-collection statistics are shown in Table 1. The crystals diffracted to resolutions in the range 2.56–2.05 Å and belonged to space groups $P3_121$ (BbTX-II), $P6_522$ (BbTX-III) and $P2_1$ (MT-II). The crystal structures were determined by molecular-replacement techniques as implemented in the program *MOLREP* (Vagin & Teplyakov, 2010) using the coordinates of piratoxin-I (PrTX-I; PDB entry 2q2j; dos Santos, Soares *et al.*, 2009) from *B. pirajai* venom for BbTX-II, of acid phospholipase A₂ (BthA-I; PDB entry 1zlb; Murakami *et al.*, 2006) from *B. jararacussu* venom for BbTX-III and of bothropstoxin-I (BthTX-I) from *B. jararacussu* venom complexed with polyethylene glycol 4000 (PDB entry 3iq3; Fernandes *et al.*, 2010) for MT-II.

Calculations based on the protein molecular weight indicating the presence of one molecule of BbTX-III and two molecules of BbTX-II and MT-II in the asymmetric unit, corresponding to Matthews coefficients (V_M ; Matthews, 1968) of 2.12 Å³ Da⁻¹ for BbTX-II, 2.74 Å³ Da⁻¹ for BbTX-III and 2.16 Å³ Da⁻¹ for MT-II. These values are within the range for typical protein crystals, assuming a value of 0.74 cm³ g⁻¹ for the protein partial specific volume. Analysis of the quaternary assemblies of the BbTX-II and MT-II crystallographic models using the *PISA* program (Krissinel & Henrick, 2007) showed a complexation significance score of 1.0, indicating that both models present a dimeric conformation in solution. The same analysis of the

BbTX-III structure indicated that this protein does not dimerize in solution and probably acts as a monomer *in vivo*, similar to other snake-venom Asp49-PLA₂s (Carredano *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2003; Murakami *et al.*, 2006).

In conclusion, BbTX-II, BbTX-III and MT-II from *B. brazili* were crystallized and X-ray diffraction data were collected. The structures of the Lys49-PLA₂s BbTX-II and MT-II showed a dimeric conformation, while the Asp49-PLA₂ BbTX-III presented a monomeric conformation. Elucidation of the native structures and of structures of possible complexes with different ligands may be useful for the development of effective inhibitors that can be used as supplemental treatments to serum therapy and as important models for synthesis of new drugs.

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) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil). We acknowledge the use of the Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Brazil).

References

- Arni, R. K. & Ward, R. J. (1996). *Toxicon*, **34**, 827–841.
- Bon, C., Changeux, J.-P., Jeng, T.-W. & Fraenkel-Conrat, H. (1979). *Eur. J. Biochem.* **99**, 471–481.
- Campbell, J. & Lamar, W. (2004). *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. Ithaca: Cornell University Press.
- Carredano, E., Westerlund, B., Persson, B., Saarinen, M., Ramaswamy, S., Eaker, D. & Eklund, H. (1998). *Toxicon*, **36**, 75–92.
- Chioato, L., Aragão, E. A., Lopes Ferreira, T., Medeiros, A. I., Faccioli, L. H. & Ward, R. J. (2007). *Biochim. Biophys. Acta*, **1768**, 1247–1257.
- Costa, T. R., Menaldo, D. L., Oliveira, C. Z., Santos-Filho, N. A., Teixeira, S. S., Nomizo, A., Fuly, A. L., Monteiro, M. C., de Souza, B. M., Palma, M. S., Stábili, R. G., Sampaio, S. V. & Soares, A. M. (2008). *Peptides*, **29**, 1645–1656.
- Fernandes, C. A., Marchi-Salvador, D. P., Salvador, G. M., Silva, M. C., Costa, T. R., Soares, A. M. & Fontes, M. R. (2010). *J. Struct. Biol.* **171**, 31–43.
- Fletcher, J. E., Rapuano, B. E., Condrea, E., Yang, C. C. & Rosenberg, P. (1981). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **59**, 375–388.
- Fox, J. W. & Serrano, S. M. (2008). *Proteomics*, **8**, 909–920.
- Fundação Nacional de Saúde (2001). *Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos*. Brasília: Ministério da Saúde.
- Gutiérrez, J. M. & Lomonte, B. (1995). *Toxicon*, **33**, 1405–1424.
- Gutiérrez, J. M., Núñez, J., Díaz, C., Cintra, A. C., Homs-Brandeburgo, M. I. & Giglio, J. R. (1991). *Exp. Mol. Pathol.* **55**, 217–229.
- Gutiérrez, J. M., Theakston, R. D. & Warrell, D. A. (2006). *PLoS Med.* **3**, e150.
- Holland, D. R., Clancy, L. L., Muchmore, S. W., Ryde, T. J., Einspahr, H. M., Finzel, B. C., Heinrikson, R. L. & Watenpaugh, K. D. (1990). *J. Biol. Chem.* **265**, 17649–17656.
- Huancahuire-Vega, S., Ponce-Soto, L. A., Martins-de-Souza, D. & Marangoni, S. (2009). *Toxicon*, **54**, 818–827.
- Jancarik, J. & Kim, S.-H. (1991). *J. Appl. Cryst.* **24**, 409–411.
- Kasturiratne, A., Wickremasinghe, A. R., de Silva, N., Gunawardena, N. K., Pathmeswaran, A., Premaratna, R., Savioli, L., Lalloo, D. G. & de Silva, H. J. (2008). *PLoS Med.* **5**, e218.
- Krissinel, E. & Henrick, K. (2007). *J. Mol. Biol.* **372**, 774–797.
- Lomonte, B., Angulo, Y. & Santamaría, C. (2003). *Toxicon*, **42**, 307–312.
- Magro, A. J., Murakami, M. T., Marcussi, S., Soares, A. M., Arni, R. K. & Fontes, M. R. (2004). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **323**, 24–31.
- Matthews, B. W. (1968). *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497.
- McPherson, A. (2003). *Introduction to Macromolecular Crystallography*. Hoboken: Wiley.
- Muniz, E. G., Maria, W. S., Estevão-Costa, M. I., Bührnheim, P. & Chávez-Olortegui, C. (2000). *Toxicon*, **38**, 1859–1863.
- Murakami, M. T., Gabdoulkhalov, A., Genov, N., Cintra, A. C., Betzel, C. & Arni, R. K. (2006). *Biochimie*, **88**, 543–549.
- Murakami, M. T., Viçoti, M. M., Abrego, J. R., Lourenzoni, M. R., Cintra, A. C., Arruda, E. Z., Tomaz, M. A., Melo, P. A. & Arni, R. K. (2007). *Toxicon*, **49**, 378–387.

- Oliveira, R. C. W. de (2009). *Animais Peçonhentos do Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Envenenamentos*. São Paulo: Sarvier.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). *Methods Enzymol.* **276**, 307–326.
- Renetseder, R., Brunie, S., Dijkstra, B. W., Drenth, J. & Sigler, P. B. (1985). *J. Biol. Chem.* **260**, 11627–11634.
- Rogers, J., Yu, B.-Z., Serves, S. V., Tsigoulis, G. M., Sotiropoulos, D. N., Ioannou, P. V. & Jain, M. K. (1996). *Biochemistry*, **35**, 9375–9384.
- dos Santos, J. I., Cintra-Francischinelli, M., Borges, R. J., Fernandes, C. A., Pizzo, P., Cintra, A. C., Braz, A. S., Soares, A. M. & Fontes, M. R. (2011). *Proteins*, **79**, 61–78.
- dos Santos, J. I., Fernandes, C. A., Magro, A. J. & Fontes, M. R. (2009). *Protein Pept. Lett.* **16**, 887–893.
- dos Santos, J. I., Soares, A. M. & Fontes, M. R. (2009). *J. Struct. Biol.* **167**, 106–116.
- Schaloske, R. H. & Dennis, E. A. (2006). *Biochim. Biophys. Acta*, **1761**, 1246–1259.
- Scott, D. L., Otwinowski, Z., Gelb, M. H. & Sigler, P. B. (1990). *Science*, **250**, 1563–1566.
- Scott, D. L., White, S. P., Otwinowski, Z., Yuan, W., Gelb, M. H. & Sigler, P. B. (1990). *Science*, **250**, 1541–1546.
- Vagin, A. & Teplyakov, A. (2010). *Acta Cryst.* **D66**, 22–25.
- Ward, R. J., Chioato, L., de Oliveira, A. H., Ruller, R. & Sá, J. M. (2002). *Biochem. J.* **362**, 89–96.
- Williams, D., Gutiérrez, J. M., Harrison, R., Warrell, D. A., White, J., Winkel, K. D. & Gopalakrishnakone, P. (2010). *Lancet*, **375**, 89–91.
- Xu, S., Gu, L., Jiang, T., Zhou, Y. & Lin, Z. (2003). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**, 271–277.
- Yu, B.-Z., Rogers, J., Nicol, G. R., Theopold, K. H., Seshadri, K., Vishweshwara, S. & Jain, M. K. (1998). *Biochemistry*, **37**, 12576–12587.



Structural bases for a complete myotoxic mechanism: Crystal structures of two non-catalytic phospholipases A₂-like from *Bothrops brazili* venom

Carlos A.H. Fernandes^a, Edson J. Comparetti^a, Rafael J. Borges^a, Salomón Huanchuire-Vega^b, Luis Alberto Ponce-Soto^{b,c}, Sergio Marangoni^b, Andreimar M. Soares^d, Marcos R.M. Fontes^{a,*}

^a Dep. de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Toxinas, CNPq, Brazil

^b Dep. de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil

^c Dep. de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil

^d Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ Rondônia e Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas, Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, RO, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 September 2013

Received in revised form 7 October 2013

Accepted 12 October 2013

Available online 18 October 2013

Keywords:

Phospholipase A₂-like

Myotoxic mechanism

Snake venom

X-ray crystallography

Lys49-phospholipase A₂

Amazonian snake

ABSTRACT

Bothrops brazili is a snake found in the forests of the Amazonian region whose commercial therapeutic anti-bothropic serum has low efficacy for local myotoxic effects, resulting in an important public health problem in this area. Catalytically inactive phospholipases A₂-like (Lys49-PLA₂s) are among the main components from *Bothrops* genus venoms and are capable of causing drastic myonecrosis. Several studies have shown that the C-terminal region of these toxins, which includes a variable combination of positively charged and hydrophobic residues, is responsible for their activity. In this work we describe the crystal structures of two Lys49-PLA₂s (BbTX-II and MTX-II) from *B. brazili* venom and a comprehensive structural comparison with several Lys49-PLA₂s. Based on these results, two independent sites of interaction were identified between protein and membrane which leads to the proposition of a new myotoxic mechanism for bothropic Lys49-PLA₂s composed of five different steps. This proposition is able to fully explain the action of these toxins and may be useful to develop efficient inhibitors to complement the conventional antivenom administration.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Bothrops brazili is a snake found in the forests of the Amazonian region particularly in parts of Brazil, Colombia, Peru, Ecuador, Venezuela, Guyana, Suriname and French Guiana [1]. The antivenom access to these remote areas is very limited due to natural geographic barriers, vast territory and lack of road infrastructure. Furthermore, the commercial therapeutic anti-bothropic serum has low efficacy against this and other Amazonian snakes [2] resulting in an important public health problem in this Latin American region. A recent study estimates that at least 421,000 envenomings and 20,000 deaths by ophidian accidents occur each year in the world; however, due to poor statistic data mainly in Asia, Africa and Latin America, these numbers can be as high as 1,841,000 envenomings and 94,000 deaths [3]. It has also been shown that the mortality caused by snakebites is much higher than that of several neglected tropical diseases, including dengue hemorrhagic fever, leishmaniasis, cholera, schistosomiasis and Chagas disease [4]. These studies led the World Health Organization (WHO) to recognize the ophidian accidents as an important neglected tropical disease and the International Society on Toxinology to create the Global Snakebite Initiative [4] aiming to reduce snakebite morbidity

and mortality. In Latin America, snakes from the *Bothrops* genus are responsible for approximately 80% of all ophidian accidents [5,6] that cause problems associated with prominent local tissue damage characterized by swelling, blistering, hemorrhaging and necrosis of the skeletal muscle, which are developed rapidly after snakebite. These effects may lead to permanent disability of the victims creating economic and social problems [7,8].

An important component of snake venoms is the phospholipase A₂, an enzyme able to promote Ca²⁺-dependent hydrolysis of sn-2 acyl group of membrane phospholipids, releasing free fatty acids and lysophospholipids [9,10]. A subgroup of these proteins, known as Lys49-phospholipase A₂ (Lys49-PLA₂s), is catalytically inactive due to the lack of Ca²⁺ coordination related to the natural mutations Asp49 → Lys and Tyr28 → Asn [11,12], although it conserves all other catalytic related residues (such as His48, Tyr53, Asp99) [13]. This class of proteins is very common in bothropic venoms and, despite of their catalytic inactivity, they are capable to cause drastic local myonecrosis that is not efficiently neutralized by regular antivenom administration [7]. Several studies have shown that the segment 115–125 of the C-terminal region, which includes a variable combination of positively charged and hydrophobic residues, is responsible for the myotoxic activity [14–17].

Lys49-PLA₂s isolated from *Bothrops* genus snake venoms are dimeric as shown by electrophoresis, spectroscopic [18], small angle X-ray scattering [19], and dynamic light scattering experiments [12]. A

* Corresponding author at: Dep. de Física e Biofísica, IB, UNESP, Cx. Postal 510, CEP 18618-970, Botucatu/SP, Brazil.

dimer is also observed in the asymmetric units for the majority of the crystallographic Lys49-PLA₂ structures [20]. Furthermore, the pH-induced dissociation of the dimers showed an abolishment of their ability to disrupt liposomes [21] and reduced approximately 50% of their activity upon skeletal muscle cell and mature muscle tissue [22]. In spite of the experimental consensus that Lys49-PLA₂s present a dimeric conformation, the inspection of their unit cells in the crystallographic structures showed two different dimeric conformations as possible “biological dimers”. The first possibility is known as “conventional dimer” which is formed by contacts between the tips of β-wing segments and N-terminal α-helices from both monomers being the “choice” for the firsts Lys49-PLA₂ structures [13,20]. The second possibility is known as “alternative dimer”, being identified initially for Lys49-PLA₂s complexed with suramin or α-tocopherol, since this is the unique possible assembly for the binding mode of these molecules [23,24]. Subsequently, bioinformatic analyses with all bothropic Lys49-PLA₂s indicate that this conformation is more stable in solution because it presents a larger interfacial area and a smaller free energy compared to the conventional dimer [24]. Furthermore, small angle X-ray scattering experiments [19] also demonstrated that the “alternative conformation” is more likely to occur in solution. This alternative dimer is stabilized by contacts between the putative calcium-binding loop and C-terminal regions, and its dimeric interface is formed by the hydrophobic surfaces surrounding the entrance to the His48 region [24].

In this work we describe the crystal structures of two Lys49-PLA₂s (BbTX-II and MTX-II) from *B. brazili* venom and a comprehensive structural comparison with several Lys49-PLA₂s. From this comparison, we propose a new myotoxic mechanism for bothropic Lys49-PLA₂s that is able to fully explain the action of these toxins.

2. Material and methods

2.1. Protein purification, crystallization and X-ray data collection

Brazilitoxin II (BbTX-II) was isolated from *B. brazili* venom by a single-step reverse phase HPLC as previously described [25]. MTX-II was obtained by the fractionation of *B. brazili* venom on a CM-Sepharose column (2 cm × 20 cm) as previously described [26]. Both proteins have 121 amino acids as determined by mass spectrometry experiments [25,26], and there are five differences between their primary sequences: i) Glu4Gln, Lys20Ala, Gln68Pro, Asn111Gly and Ala130Pro, respectively for BbTX-II and MTX-II. Crystallization experiments were performed using sparse-matrix method [27], as previously described [28]. In this former article, MTX-II was called as MT-II. Basically, the crystallization conditions for each proteins were (i) for BbTX-II, 30% (w/v) polyethylene glycol 4000, 0.25 M lithium sulfate and 0.1 M Tris HCl at pH 8.5 and (ii) for MTX-II, 30% (w/v) polyethylene glycol 8000, 0.25 M ammonium sulfate and 0.1 M sodium cacodylate at pH 6.5. Crystals were grown at 291 K for approximately 3 weeks for both proteins. X-ray diffraction data for all crystals were collected at a wavelength of 1.435 Å using a synchrotron-radiation source (MX1 station, Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, LNLS, Campinas, Brazil) and a MAR CCD imaging-plate detector (MAR Research). Crystals were mounted in nylon loops and flash-cooled in a stream of nitrogen gas at 100 K using no cryoprotectant. The data were processed using HKL 2000 program [29].

2.2. Structure determination and refinement

Table 1 shows data-collection and refinement statistics. The crystal structures were determined by molecular-replacement techniques implemented in the program Phaser [30] using the coordinates of piratoxin-I (PrTX-I; PDB ID 2Q2J), a Lys49-PLA₂ isolated from *Bothrops pirajai* venom, for BbTX-II and bothropstoxin-I (BthTX-I; PDB ID 3IQ3), a Lys49-PLA₂ isolated from *Bothrops jararacussu* venom complexed

Table 1
X-ray data collection and refinement statistics.

	BbTX-II	MTX-II
Unit cell (Å)	$a = b = 56.4; c = 129.1^a$	$a = 39.0; b = 71.4; c = 44.4; \beta = 102.5^a$
Space group	P3 ₁ 21	P2 ₁
Resolution (Å)	32.3–2.11 (2.19–2.11) ^a	20–2.08 (2.15–2.08) ^a
Unique reflections	13,825 (1363) ^a	13,752 (1365) ^a
Completeness (%)	96.07 (97.64) ^a	95.87 (95.25) ^a
R _{merge} ^b	6.3 (49.0) ^a	12.9 (35.3) ^a
Mean I/σ (I)	14.40 (3.23) ^a	5.29 (1.78) ^a
R _{cryst} (%) ^c	19.36	19.27
R _{free} (%) ^d	24.43	23.62
Number of non-hydrogen atoms ^e		
Protein	1788	1837
PEG molecules	–	53
Sulfates	–	24
Waters	191	251
RMS (bonds) ^e	0.004	0.004
RMS (angles) ^e	0.83	0.86
Average B-factor (Å ²) ^e	47.50	28.90
Ramachandran favored (%) ^e	97	97
Ramachandran outliers (%) ^e	0	0
Clashscore ^f	5.30	8.63
MolProbity overall score ^f	1.54	1.78

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

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

^c $R_{cryst} = \sum hkl (|F_{obs,hkl}| - |F_{calc,hkl}|) / \sum |F_{obs,hkl}|$, where $|F_{obs,hkl}|$ and $|F_{calc,hkl}|$ 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.

^e Calculated with Phenix [29].

^f Calculated with MolProbity [32].

with polyethylene glycol 4000, for MTX-II. The model choices were based on the best values of final translation function Z score (TFZ) and log-likelihood gain (LGG) followed by an automated model building using AutoBuild in Phenix software suite [31]. Despite the amino acid sequence of MTX-II obtained by mass spectrometry has indicated a Leu in position 125 [26], an electron density compatible to a Phe was observed in our crystallographic data. This residue is also present in the position 125 for other bothropic Lys49-PLA₂s and this substitution on the amino acid sequence of MTX-II crystallographic structure does not interfere with the discussion of this work (Sections 4.2 and 4.3) due to maintenance of the hydrophobic characteristic of both residues. The modeling processes were always performed by manual rebuilding with the program Coot [32] using electron density maps calculated with coefficients $2|F_{obs}| - |F_{calc}|$. The models were improved, as judged by the free R-factor [33], through rounds of crystallographic refinement (positional and restrained isotropic individual B-factor refinement, with an overall anisotropic temperature factor and bulk solvent correction) using Phenix [31]. The refinement statistics for the final models are shown in Table 1. In the structure of BbTX-II, due to lack of electron density, side chains of the following residues were excluded: Phe3 (monomer A), Lys16 (monomer B), Lys20 (B), Val31 (B), Leu32 (B), Lys36 (A, B), Lys53 (B), Lys57 (A, B), Gln68 (A, B), Lys69 (A), Lys70 (A, B), Arg72 (A), Asn88 (B), Asn111 (A, B), Lys115 (A, B), Lys116 (A, B), His110 (A), Leu121 (A), Lys122 (A, B), Pro123 (B), Lys127 (A, B), and Lys129 (A). In the structure of MTX-II, the side chains of the following residues were excluded: Val31 (B), Lys36 (A), Lys53 (B), Lys69 (A, B), Lys70 (A), Arg72 (B), Lys78 (A), Asn87 (A), Lys122 (A, B), Lys127 (A, B), and Lys129 (A, B). The stereochemical qualities of the models were checked with the Phenix and MolProbity programs [31,34]. The coordinates were deposited in the Protein Data Bank (PDB) under the identification codes 4K09 (BbTX-II) and 4K06 (MTX-II).

2.3. Comparative analysis

Molecular comparisons between the protomers of both structures were performed using the Coot program [32] with only the C_{α} coordinates. All figures were generated by PyMOL [35] and Coot [32] programs. Analyses of the quaternary assemblies, interfacial contacts of the crystallographic models and buried surface area of the hydrophobic residues were performed using the online interactive tool PISA [36] available at the European Bioinformatics Institute server (<http://www.ebi.ac.uk>). Two different angles, θ_A (aperture angle) and θ_T (torsional angle) were used to quantify the oligomeric changes between the apo and complexed forms according to a model previously proposed [24]. In this model, the coordinates (x, y, z) of C_{α} atoms from the α -helices h2 and h3 were used to define two vectors (A and B) whose scalar product defined the aperture angle (θ_A). The torsional angle (θ_T) is calculated by using the normal plane formed by the vectors A and B from one monomer and the vector B from the other monomer.

2.4. Dynamic light scattering

The dynamic light scattering (DLS) measurements were performed with lyophilized MTX-II at 291 K, dissolved in ultra-pure water at a concentration of 3.5 mg mL^{-1} using the instrument DynaPro TITAN (Wyatt Technology). Data were measured one hundred times and results were analyzed with Dynamics v.6.10 software.

3. Results

3.1. Overall structures

Crystals of both proteins diffracted approximately at 2.1 \AA (Table 1) and belonged to $P3_12_1$ and $P2_1$ space groups for BbTX-II and MTX-II, respectively. The refinements converged to final R values of 19.4% ($R_{\text{free}} = 24.4\%$) and 19.3% ($R_{\text{free}} = 23.6\%$), respectively for BbTX-II and MTX-II. The final models present a stereochemical quality expected for structures with the same resolution (Table 1). Both structures have seven disulfide bridges in each monomer and present the following

structural features: (i) an N-terminal α -helix; (ii) a “short” helix; (iii) a Ca^{2+} 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), similarly to other class II PLA₂s [11,13,20].

BbTX-II and MTX-II structures have two molecules in the asymmetric unit and present similar oligomeric structures, but only MTX-II presents ligand molecules bound to it. The refined MTX-II structure displays three polyethylene glycol (PEG) 4000 ligands and five sulfate ions (Fig. 1). Two PEG molecules establish a large number of hydrophobic interactions along the hydrophobic channel of the molecule (Leu10, Pro17, Val 31, Leu31 and Pro113) while the third one is exposed to solvent and establishes hydrogen bonds with Lys7, Leu10, Glu11 and Gly14 residues. These molecules are positioned similarly to other PEG molecules [12], α -tocopherol [24] and fatty acid [37,38] in other Lys49-PLA₂ structures. Five sulfate ions interact through water molecules with Glu12 (A), Ser21 (B), Ile82 (A), Lys100 (A) and Ala130 (A) or directly by hydrogen bonds with Asn17 (A), Arg34 (A), Lys53 (A), Thr81 (A), Lys115 (A) and Arg118 (A). These ions are also positioned similarly to other complexed Lys49-PLA₂ structures, such as BthTX-I and PrTX-I complexed with α -tocopherol [24], BthTX-I complexed with PEG 4000 [12] and Bn-IV, a Lys49-PLA₂ isolated from *Bothrops neuwiedi* venom, complexed with myristic acid [38].

3.2. Biological oligomeric assembly

Results of dynamic light scattering experiments at 291 K (crystallization temperature) with MTX-II indicated a mean hydrodynamic radius (R_H) of 2.6 nm with a polydispersity of 9.3%. This R_H value corresponds to a molecular weight of approximately 32 kDa and is, thus, equivalent to a dimer, being similar to that obtained for other Lys49-PLA₂s previously studied [12].

The examination of unit-cell packing of the BbTX-II and MTX-II structures using the PISA software [36] suggested that their dimeric conformations are stable in solution and are similar to other bothropic Lys49-PLA₂s (Fig. 1A and B). These analyses also demonstrated that the alternative dimer conformation has better values of complexation significance score (CSS), interface area and solvation free energy gain

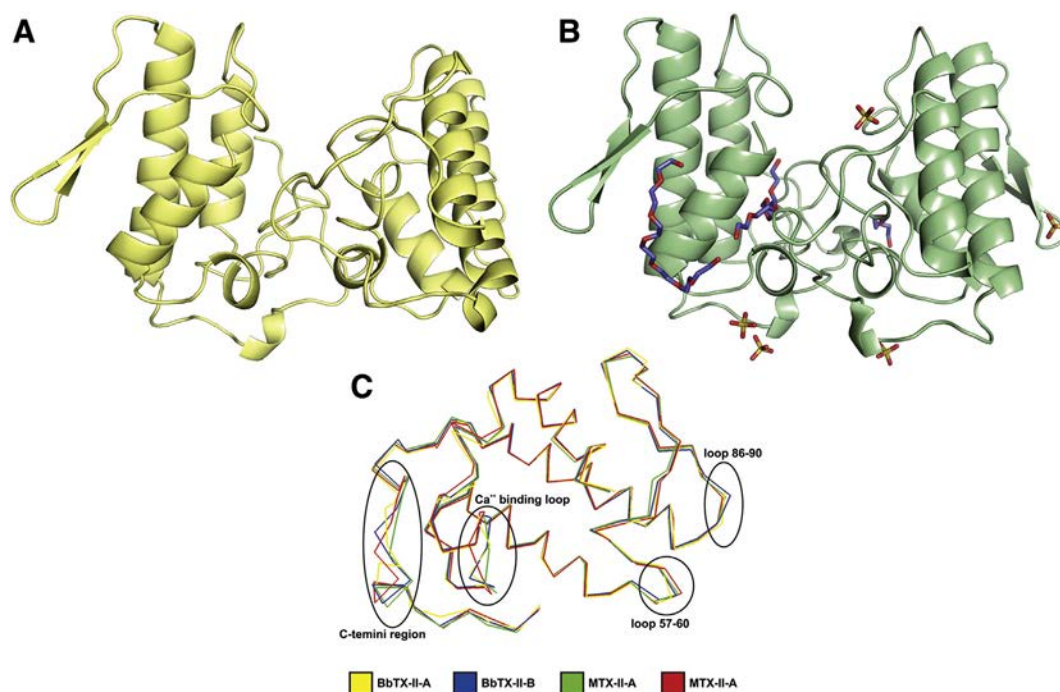


Fig. 1. Dimeric structures of BbTX-II (A) and MTX-II (B) showed as a cartoon representation. The PEG molecules and sulfate ions are showed by sticks. (C) C_{α} superposition of the BbTX-II and MTX-II structures (monomers A and B) highlighting the most important structural deviations between them.

upon formation of the interface (Δ^iG) than the conventional dimer for both structures. The BbTX-II structure in the alternative dimer conformation presents a complexation significance score (CSS) of 0.1, an interfacial area of 512.5 Å² and $\Delta^iG = -9.4$ Kcal/mol, while for the conventional dimer it presents a CSS of zero, interfacial area of 498.4 Å² and $\Delta^iG = 0.6$ Kcal/mol. The MTX-II structure presents in the alternative dimer conformation a CSS of 1.0, interfacial area of 524.5 Å² and $\Delta^iG = -12.4$ Kcal/mol, while for the conventional dimer conformation it presents a CSS of zero, an interfacial area of the 380.3 Å² and $\Delta^iG = -1.3$ Kcal/mol. These results strengthen previously theoretical [24] and experimental studies [19,23,24], indicating that the alternative dimer conformation is the most likely biological dimer for bothropic Lys49-PLA₂s.

3.3. Structural comparison of BbTX-II and MTX-II

Superposition between C_α atoms of the monomers A and B from BbTX-II resulted in an RMS deviation of 0.97 Å while the same superposition between MTX-II monomers resulted in 0.66 Å. Taking into account the presence of PEG ligands bound to MTX-II structure and that the BbTX-II structure is unbound to any ligand, these values are comparable to other Lys49-PLA₂s [24]. In this previous study a pattern was observed for apo forms (proteins unbound to ligands), which presented an RMSD of around 1.0 Å, while for complexed structures these values are lower. Additionally, when the monomers of BbTX-II are compared with those of the MTX-II (Table 2), it can be observed that one monomer (called herein monomer B) is more similar to the equivalent monomer of the other structure. Interesting, this feature was also observed for BthTX-I bound to different ligands compared to its apo structure [12].

The superposition between BbTX-II and MTX-II monomers (Fig. 1C) shows that the main differences occur in four regions: putative Ca²⁺ binding loop (residues 29–34), loops before and after β-wing region (residues 57–60 and 86–90) and C-termini (117–130); although the major differences are between the C-terminal and the putative Ca²⁺ binding loop regions. These structural deviations were also found in the C_α superposition between several Lys49-PLA₂ structures [12,24] and it may be due to higher flexibility of these segments that reflects on their highest B-factors values compared to other regions of the proteins.

Regarding quaternary structure comparisons, it has been shown for other Lys49-PLA₂s that when any ligand (PEG, α-tocopherol, BPB, fatty acid) is bound to the hydrophobic channel in at least one monomer, oligomeric changes are induced and the protein adopts an active conformation [24]. In order to characterize these conformational changes observed for Lys49-PLA₂s, a tridimensional configuration model has been proposed based on two angles: θ_T (torsional angle) and θ_A (aperture angle) [24]. This model was established for the so-called “alternative dimer” by the observation that the Lys49-PLA₂s complexed to any ligand present a rearrangement of the C-terminus of one monomer that changes the symmetry between the monomers aligning them in the same plane. These angles were calculated for several complexed and apo Lys49-PLA₂s and their oligomeric conformation could be divided into two classes [24] which complexed structures presented lower torsional and higher aperture angles compared to the

apo ones. Subsequently, other Lys49-PLA₂s were solved [12,39] and this pattern was also observed. In the case of BbTX-II and MTX-II, their calculated angles are, respectively, θ_T = 59° and θ_A = 7° and θ_T = 41° and θ_A = 29° being in agreement with the proposed model. In addition, it was previously observed that oligomeric changes induced by ligands in the toxins switch the space groups of the crystals. All apo dimeric Lys49-PLA₂s solved to this date belong to P3₁21 space group while all complexed dimeric Lys49-PLA₂ belong to P2₁ or P2₁2₁2₁ space groups [12]. These changes were also observed in BbTX-II and MTX-II structures that belong to P3₁21 and P2₁ space groups, respectively (Table 1).

4. Discussion

4.1. Cationic membrane-stabilization site

Sulfate ions are present in crystallization conditions for several PLA₂s, and in some cases, electron density maps compatible with sulfate ions were found and incorporated in these crystallographic structures. It has been suggested, based in the crystal structure of porcine pancreatic PLA₂, that the interacting region between sulfate ions and PLA₂s is the same as where these proteins interact with membranes, since negative bivalent ions could mimic the phosphatidyl group of an anionic lipid bilayer [40,41]. In these structures, sulfates bind with positive charged residues in each monomer and also by other closer-range H-bonding interactions. According to these authors, the interaction of these residues with anionic phosphatidyl groups leads the enzymes to achieve their fully active conformation. These positions are also equivalent to that occupied by the phosphate group of a phospholipid in the structure of an Asp49-PLA₂ from cobra-venom complexed with a transition-state analog [42]. Furthermore, forms I and II crystal structures of the ACL myotoxin (a Lys49-PLA₂ from *Agkistrodon contortrix laticinctus*) [43] and zhaermitoxin structure from *Zhaeremia mangshanensis* [44] presented sulfate ions bound to Arg and Lys residues.

Similarly, the presence of sulfate ions interacting with positive charged residues (Lys20, Arg34, Lys53, Lys115 and Arg118) in other complexed Lys49-PLA₂s, such as BthTX-I and PrTX-I complexed to α-tocopherol [24], BthTX-I complexed to PEG 4000 [12] and Bn-IV, a Lys49-PLA₂ isolated from *B. neuwiedi* venom, complexed to myristic acid [38] was reported. These structures are in active form because there are ligands bound at their hydrophobic channel leading the alignment of Lys20, Lys115 and Arg118 residues in the same plane (side-by-side) [24]. Sulfate ion interactions with Arg34 and Lys53 seem to be only the result of weak interactions between these ions and superficial positively charges, since they establish at most two hydrogen bonds with only Arg34 or with Lys53 and never are hydrogen bonded with both residues at the same time. Finally, there are no experimental evidences that support any physiological relevance for the sulfate binding in these residues. In contrast, the basic cluster formed by Lys20, Lys115 and Arg118 was proposed to be the “myotoxic site” of bothropic Lys49-PLA₂s [24] because scanning alanine site-directed mutagenesis showed a reduction in membrane damaging activity against liposome membranes for Lys115Ala [45] and Arg118Ala [17] mutants of BthTX-I, a Lys49-PLA₂ from *B. jararacussu* venom. The structure of the MTX-II complexed to PEG (this work) presents sulfate ions interacting with the residues Lys115 and Arg118 and establishes a large number of interactions (Fig. 2). However, the interaction with Lys20 is absent due to the natural mutation Lys20Ala, indicating that the occurrence of a charged residue in position 20 is not essential for the establishment of the myotoxic activity mechanism previously proposed. The comparison between MTX-II complexed to PEG and BbTX-II structures reveals that the binding of sulfate ions leads to a major extension in solvent direction of Lys115 and Arg118 residues (Fig. 3).

Table 2

Superposition between protomers of BbTX-II and MTX-II crystallographic structures (RMS deviations (Å) of C_α atoms).

	BbTX-II		MTX-II	
	A	B	A	B
BbTX-II (A)	–	0.97	1.03	1.11
BbTX-II (B)	0.97	–	0.45	0.72
MTX-II (A)	1.03	0.45	–	0.66
MTX-II (B)	1.11	0.72	0.66	–

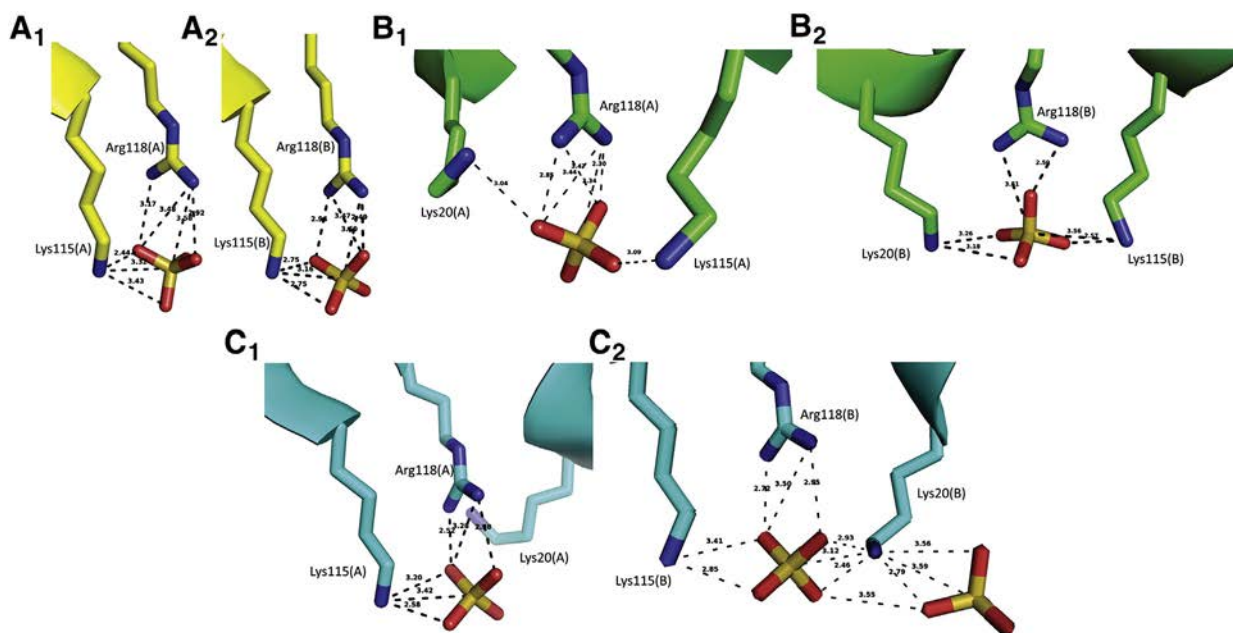


Fig. 2. Interaction of residues Lys20, Lys115 and Arg118 with sulfate ions in different bothropic Lys49-PLA₂ crystallographic structures. (A) MTX-II from *Bothrops brazili* venom complexed with PEG 4000 (this work) (PDB ID 4K06); (B) Bn-IV from *Bothrops neuwiedi* venom complexed with myristic acid [38] (PDB ID 3MLM); (C) PrTX-I from *Bothrops pirajai* venom complexed with α -tocopherol [24] (PDB ID 3CYL). The subscript numbers 1 and 2 refer to monomer A and B, respectively.

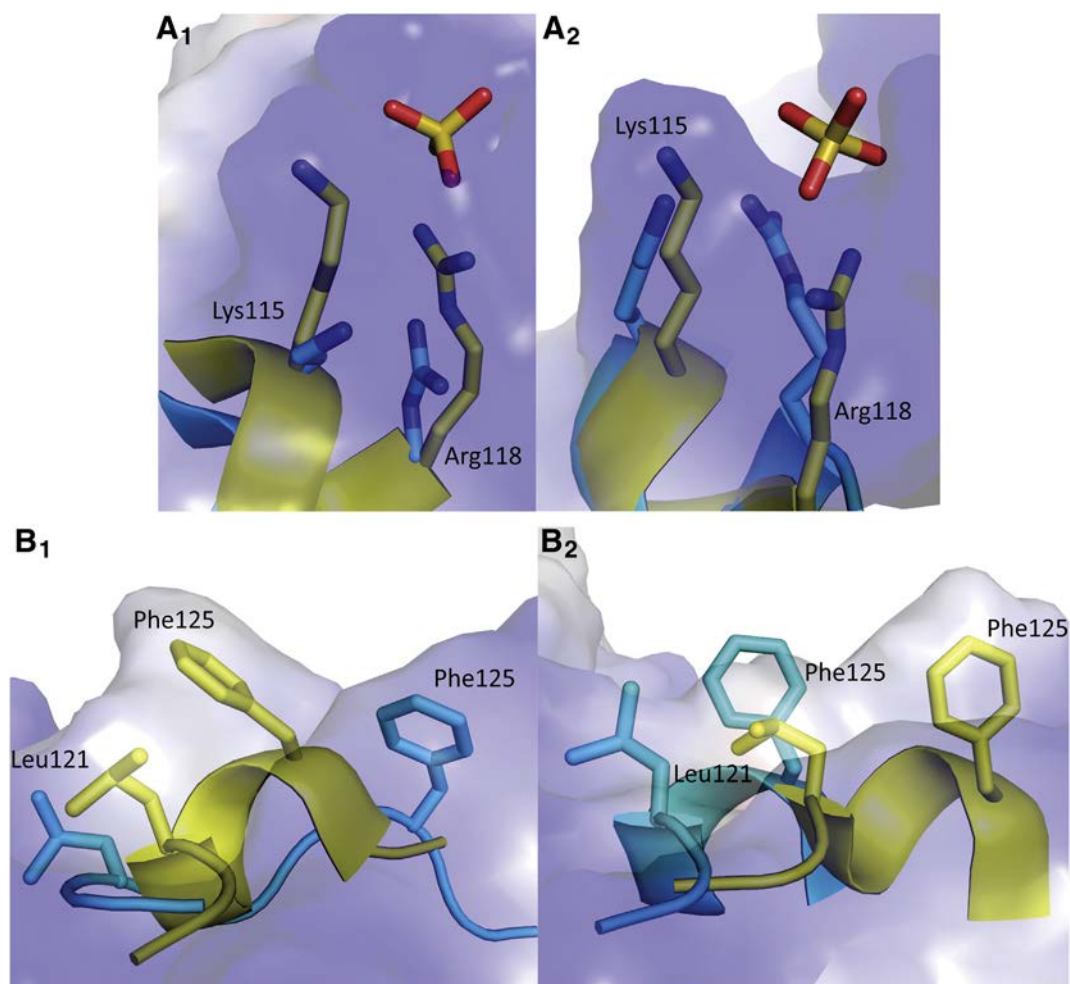


Fig. 3. Structural comparison between membrane-docking site (MDoS) (A) and membrane-disruption site (MDiS) (B) regions from MTX-II complexed to PEG 4000 (Lys49-PLA₂ in active form; yellow structure) and BbTX-II (Lys49-PLA₂ in inactive form; cyan structure) structures. Subscript numbers 1 and 2 refer to monomers A and B, respectively. Lys115, Arg118, Leu121, and Phe125 residues and sulfate ions are represented by sticks.

Taking into account all these structural studies with different PLA₂s, we suggest that this cluster of positive charged residues would be responsible for the toxin “docking” with the phosphatidyl group of anionic lipid bilayer membranes. Then, we propose to call this cationic cluster for the Lys49-PLA₂s as “cationic membrane-docking site” (MDoS) which is mainly formed by C-terminus residues (Lys115 and Arg118), but is also aided by other positive and exposed residues such as Lys20, Lys80, Lys122 and Lys127.

4.2. Hydrophobic membrane-disruption site

Based on a crystallographic study with the ACL myotoxin, Ambrosio and colleagues [43] proposed that specific hydrophobic residues (Phe121 and Phe124) present in the C-terminal region of this toxin and other Lys49-PLA₂s would be related to their myotoxic activity. In the active form of this structure, Phe121 and Phe124 have their aromatic rings with parallel conformations and salient from the toxin surface forming a contiguous patch resembling a hydrophobic knuckle. This hydrophobic knuckle is only observed when the Lys122 residue interacts with the Cys29–Gly30 peptide bond and when a ligand is bound to hydrophobic channel of toxin. Similarly, BbTX-II and MTX-II structures also present hydrophobic residues on the C-terminal region as observed in ACL myotoxin structure [43]. However, in the case of BbTX-II and MTX-II, Lys122 side chains were not modeled due the lack of electron densities in their structures, a fact already observed for other Lys49-PLA₂s that, apparently, have random configurations in the majority of Lys49-PLA₂s [12]. Thus, the conformational changes suffered by the C-terminus hydrophobic residues seem to be due to ligand binding in the hydrophobic channel. Sequence alignment of Lys49-PLA₂ C-termini shows a high level of hydrophobic residues in this portion, particularly Leu, Pro and Phe in the positions 121, 124 and 125 (Fig. 4). In the case of bothropic Lys49-PLA₂s, the positions 121 and 125 are always occupied by hydrophobic residues, where Leu and Phe occur for 98% of the sequences. In addition, the side chains of these residues from both monomers are approximately in a symmetric

alignment (Fig. 5) after the ligand binding in hydrophobic channel on all complexed bothropic Lys49-PLA₂s.

Chioato and colleagues [17] performed site-directed mutagenesis experiments which demonstrated a strong reduction of myotoxic activity (measured by release of creatine kinase) and membrane damaging on liposome membranes of the Phe125Ala mutant for BthTX-I. These authors also showed that Phe125Trp mutant has the same level of membrane damaging on liposome membranes for BthTX-I [17], reinforcing the importance of a hydrophobic residue in this position for myotoxic activity. Indeed, results of site-directed mutagenesis with aromatic residues performed by the same group [45] suggest that the 115–119 region of protein interacts superficially with the membrane, allowing residues closed to position 125 to be partially inserted into the membrane. Experiments using C-terminal synthetic peptides also demonstrated that a hydrophobic residue in position 121 for the expression of myotoxic activity [16] is essential.

Interestingly, the comparison of the hydrophobic cluster buried surface areas between apo and complexed structures (inactive and active states, respectively) obtained by the analysis with the PISA

	121	125	
Bothropic Lys49-PLA₂s	MTX-II	:	HLKPFCKKA-DPC
	BbTX-II	:	HLKPLCKKA-DAC
	PrTX-I	:	HLKPFCKKA-DDC
	PrTX-II	:	HLKPFCKKA-DDC
	BthTX-I	:	HLKPFCKKA-DAC
	BnSP-7	:	HLKPFCKKA-DPC
	MjTX-I	:	YLKPFCKKKG-RDC
	MjTX-II	:	YLKPFCKKA-DPC
	Bn-IV	:	HLKPFCKKA-DPC
	BaTX	:	YLKPLCKKA-DAC
	blK-PLA ₂	:	HLKPFCKKA-DPC
	PLA ₂ K49	:	FLKPLCKKADAAC
	M1-3-3	:	YLKPFCKKA-DPC
	Myo-II	:	YLKPLCKKA-DAC
	Myo-IV	:	YPKFFCKKA-EPC
	MyoI	:	YLKPFCKKA-DAC
	GodMT-I	:	HMKEFCKKP-DAC
	GodMT-II	:	YPKPLCKKA-DAC
	Acutohemo	:	HLKPSCKKKTSEQC
	DAV-K49	:	TVKFLCKAP-ESC
	Anum-1	:	YPKPLCKKA-DDC
	Cax-K49	:	YPKFLCKKP-DTC
	APP-K-49	:	YFKLKCKKP-DTC
	BP-I	:	YKPFCKKA-DTC
	BP-II	:	YKPFCKKA-DTC
	BP-III	:	YKPFCKKA-DTC
	Ts-K49	:	NLKLFCCKKTSEQC
	Bsc-K49	:	TMKMFCKKP-DAC
	R6K49	:	YMKVLCKKP-DAC
	Tpu-K49	:	NTKIFCKKTPEPC
	Ac1-MT1	:	YFKFKCKKP-ETC
	Tbo-K49	:	NTKIFCKKTSEPC
CTs-K49	:	NLKLFCCKKTSEQC	

Fig. 4. C-terminal amino acid alignment of Lys49-PLA₂s deposited in NCBI Protein Data Bank. The numbers above the alignment correspond to positions 121 and 125 (according to numeration proposed by Renetseder et al. [63] from the bovine pancreatic PLA₂, which contains 131 residues). The program AMAP v. 2.2 performed the alignment [64]. The sequences isolated from snakes from *Bothrops* genus are highlighted. MTX-II: Lys49-PLA₂ from *Bothrops brazili* venom (manually extracted from Costa et al. [26]); BbTX-II: Braziliantoxin-II from *B. brazili* venom (manually extracted from Huancahuire-Vega et al. [26]); PrTX-I: piratoxin-I from *Bothrops pirajai* venom (NCBI GI: 17433154); PrTX-II: piratoxin-II from *Bothrops pirajai* venom (NCBI GI: 17368328); BthTX-I: bothropstoxin-I from *Bothrops jararacussu* venom (NCBI GI: 51890398); BnSP-7: Lys49-PLA₂ from *Bothrops pauloensis* venom (NCBI GI: 239938675); MjTX-I: myotoxin-I from *Bothrops moojeni* venom (NCBI GI: 17368325); MjTX-II: myotoxin-II from *Bothrops moojeni* venom (NCBI GI: 62738542); BnIV: Lys49-PLA₂ from *B. pauloensis* venom (NCBI GI: 333361256); BaTX: Lys49-PLA₂ from *Bothrops alternatus* venom (NCBI GI: 292630846); blK-PLA₂: Lys49-PLA₂ from *Bothrops leucurus* venom (NCBI GI: 353678055); PLA₂K49: Lys49-PLA₂ from *Bothrops andianus* venom (NCBI GI: 442738889); M1-3-3: Lys49-PLA₂ from *Bothrops asper* venom (NCBI GI: 6492260); Myo-II: myotoxin-II from *B. asper* venom (BaspTX-II); Myo-IV: Lys49-PLA₂ from *B. asper* venom (NCBI GI: 166216293); Myol: Lys49-PLA₂ from *Bothrops atrox* venom (NCBI GI: 82201805); GodMT-I: Lys49-PLA₂ from *Cerrophidion godmani* venom (NCBI GI: 4330040); GodMT-II: Lys49-PLA₂ from *C. godmani* venom (NCBI GI: 3122600); Acutohemo: acutohemolysin from *Deinagkistrodon acutus* venom (NCBI GI: 26397573); DAV-K49: Lys49-PLA₂ from *Calloselasma rhodostoma* venom (NCBI GI: 27151658); Anum-1: Lys49-PLA₂ from *Atropoides nummifer* venom (NCBI GI: 17433156); Cax-K49: Lys49-PLA₂ from *Crotalus atrox* venom (NCBI GI: 26397690); APP-K-49: Lys49-PLA₂ from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* venom (NCBI GI: 129478); BP-I: Lys49-PLA₂ from *Trimeresurus flavoviridis* venom (NCBI GI: 408407670); BP-II: Lys49-PLA₂ from *T. flavoviridis* venom (NCBI GI: 408407672); BP-III: Lys49-PLA₂ from *T. flavoviridis* venom (NCBI GI: 408407673); Ts-K49: Lys49-PLA₂ from *Viridovipera stejneri* venom (NCBI GI: 8220134); Bsc-K49: Lys49-PLA₂ from *Bothriechis schlegelii* venom (NCBI GI: 25453450); R6-K49: Lys49-PLA₂ from *C. godmani* venom (NCBI GI: 59727050); Tpu-K49: Lys49-PLA₂ from *Trimeresurus puniceus* venom (NCBI GI: 123916279); ACL-MT-1: Lys49-PLA₂ from *Agkistrodon contortrix laticinctus* venom (NCBI GI: 1352702); and Tbo-K49: Lys49-PLA₂ from *Trimeresurus borneensis* venom (NCBI GI: 123907684). The *Bothrops pauloensis* species was recently reclassified as *Bothropoides pauloensis* [62].

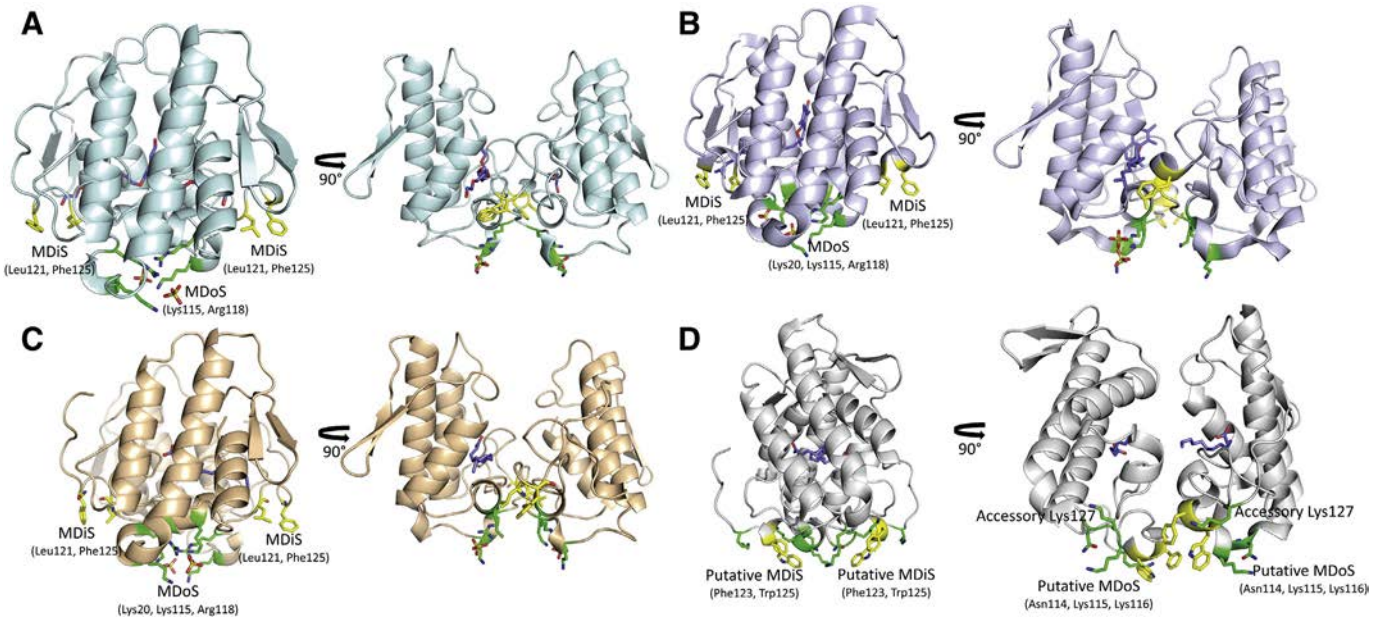


Fig. 5. Localization of MDoS (membrane-docking site) and MDiS (membrane-disruption site) on crystallographic structures of (A) MTX-II from *Bothrops brazili* venom complexed with PEG 4000 (this work) (PDB ID 4K06); (B) Bn-IV from *Bothrops neuwiedi* venom complexed with myristic acid [38] (PDB ID 3MLM); (C) PrTX-I from *Bothrops pirajai* venom complexed with α -tocopherol [24] (PDB ID 3CYL) and (D) ecarpholin S, a Ser49-PLA₂ from *Echis carinatus* venom complexed with lauric acid [51] (PDB ID 2QHD).

software reveals that the presence of a ligand (PEG, α -tocopherol, BPB, fatty acid) reduces the buried surface areas of Leu121 and Phe125 (Table 3). This reduction occurs mainly due to oligomeric changes of the Leu121 side chain after ligand binding, leading to a decrease in approximately 70% of its buried surface area. Structural comparison between MTX-II and BbTX-II Leu121 and Phe125 amino acids reveals that the presence of a ligand in hydrophobic channel (PEG 4000 in MTX-II structure) also leads to a major exposure of these hydrophobic residues (Fig. 3). According to hydrophobicity scales suggested by different authors [46,47] both Leu and Phe are among the residues with higher hydrophobic indices. Furthermore, Leu and Phe have the higher membrane permeability coefficients [48], with their bilayer permeability being up to 100 times higher in relation to charged amino acids [49].

Table 3

Buried surface area (BSA) of residues that constitute the hydrophobic membrane-disruption site (MDiS; Leu-121 and Phe125). BthTX-I: bothropstoxin I from *Bothrops jararacussu* venom [12] (PDB ID: 3HZD); PrTX-I: piratoxin I from *Bothrops pirajai* venom [24] (PDB ID: 2Q2); BbTX-II: brazilitoxin II from *Bothrops brazili* venom (this work) (PDB ID 4K09); BnSP-7: a Lys49-PLA₂ from *Bothrops pauloensis* venom [60] (PDB ID 1PA0); BthTX-I-PEG4K: BthTX-I complexed with PEG 4000 [12] (PDB ID 3IQ3); BthTX-I- α T: BthTX-I complexed with alpha tocopherol [24] (PDB ID 3CXI); BthTX-I-BPB: BthTX-I chemically modified by p-bromophenacyl bromide (BPB) [12] (PDB ID 3HZW); PrTX-I- α T: PrTX-I complexed with alpha tocopherol [24] (PDB ID 3CYL); PrTX-I-BPB: PrTX-I chemically modified by p-bromophenacyl bromide (BPB) [61] (PDB ID 2OK9); MTX-II-PEG4K: MTX-II from *B. brazili* venom complexed with PEG 4000 (this work) (PDB ID 4K06); BnIV-myristic acid: Bn-IV from *Bothrops neuwiedi* venom complexed with myristic acid [38] (PDB ID 3MLM). The *B. pauloensis* species was recently reclassified as *Bothropoides pauloensis* [62].

		BSA of MDiS (Å ²)
Apo structures	BthTX-I	122.78
	PrTX-I	126.38
	BbTX-II	88.84
	BnSP-7	109.58
	BthTX-I-PEG4K	61.15
Complexed structures	BthTX-I- α T	52.64
	BthTX-I-BPB	47.68
	PrTX-I- α T	42.54
	PrTX-I-BPB	68.49
	MTX-II-PEG4K	63.75
	BnIV-myristic acid	66.49

Consequently, considering the high conservation level, and the structural and functional studies about the hydrophobic cluster (121 and 125 residues) in bothropic Lys49-PLA₂s, we propose that this site is mainly responsible for the membrane disruption after toxin anchorage and we call it herein as “hydrophobic membrane-disruption site” (MDiS). Membrane perturbation would be the key toxic event, allowing an uncontrolled influx of ions (Ca²⁺ and Na⁺) that initiates a complex series of degenerative effects on muscle fiber [50].

Similarly, structural analysis of other classes of PLA₂-like, Ser49-PLA₂s [51], demonstrated the presence of particular MDoS (Section 4.1) and MDiS. Two hydrophobic residues, Phe123 and Trp125, would form the putative MDiS while Asn114, Lys115 and Lys116, and possibly, Lys127 would form the putative MDoS (Fig. 5). The buried surface area of Phe123 and Trp125 is 38.23 Å², indicating a high exposition to the solvent, similarly to MDiS region in Lys49-PLA₂s.

4.3. Structural bases of the myotoxic mechanism for Lys49-PLA₂s

Several hypotheses have been raised to address the membrane damage process produced by Lys49-PLA₂s. Although some propositions point to a direct action of these proteins towards membrane receptors [52–54], the major number of hypotheses is based on the direct action of the Lys49-PLA₂s in the target membrane by electrostatic interactions [14,18,24,43,55,56]. The first proposal was based on the fact that a synthetic peptide formed by C-terminus residues (115–129) of the toxin displayed heparin-binding and cytolytic activities, leading to the hypothesis that this region is mainly responsible for the membrane damage activity produced by Lys49-PLA₂s [14]. The molecular modeling of the monomeric ACL myotoxin from *A. contortrix laticinctus* suggested that partially conserved residues in Lys49-PLA₂s (K7, E12, T13, K16, and N17) associated with some specific lysine residues (K78, K80, K116, and K117) form a site that may be responsible for myotoxic activity in these toxins [57]. Subsequently, spectroscopic and crystallographic studies with the BthTX-I showed that this protein may cause membrane destabilizing activity by an oligomeric triggering process of the toxin (open and closed conformations) using the conventional dimer assembly [18]. During this process, the C-termini change their conformation leading a transition in the membrane bound form that disrupts the packing of the bilayer phospholipids, resulting in the loss of membrane

integrity [18]. Subsequently, Lomonte et al. [55], based on the former model [18], suggested that cationic residues from C and N-terminal regions would establish initially weak electrostatic interactions with the anionic sites of the membrane that would be further strengthened by the contribution of hydrophobic and aromatic residues of the C-termini. These residues may partially penetrate and disorganize the bilayer. Site-directed mutagenesis experiments also highlighted the relevance of the C-terminal region for expression of myotoxic activity, specially the Tyr117–Lys122 segment [45]. Ambrosio et al. [43] based on the crystallographic structure of ACL myotoxin (non-bothropic and monomeric Lys49-PLA₂), proposed that the interaction of the Lys122 with Cys29–Gly30 peptide bond when a ligand is bound to a hydrophobic channel would form a hydrophobic knuckle that would be responsible for membrane perturbation. Posteriorly, Bortoleto-Bugs et al. [56], also using the conventional dimer conformation, hypothesized that a region of the toxin called interfacial recognition site (IRS) binds anionic phospholipids inducing conformational changes in the protein, leading the exposition of hydrophobic surfaces that strengthen the protein/membrane interaction. More recently, dos Santos et al. [24] proposed a myotoxic mechanism based on the alternative dimer conformation for Lys49-PLA₂s, whose myotoxic sites presented in both monomers are formed specifically by the cationic residues Lys20, Lys115 and Arg118 that are aligned side by side in this protein configuration.

Thus, based on the previous propositions and the experimental observations of this work, we suggest a new myotoxic mechanism of bothropic Lys49-PLA₂s where all residues involved in this action are

specified. In our hypothesis, the alternative dimer is adopted as the biological oligomeric conformation that would act on the following steps (Fig. 6).

- I) Entrance of a hydrophobic molecule (e.g. fatty acid) at the hydrophobic channel leading to a reorientation of a monomer which may be measured by the “two angle model” [24]. This reorientation causes a transition between “inactive” and “active” states, causing exposure to the solvent and alignment of both MDoS and MDiS residues in the same plane, with a symmetric position for both monomers. The fatty acid may come from the lyses process of the membrane by Asp49-PLA₂s, reinforcing the synergism between Asp and Lys49-PLA₂s in snake venom action. Previous studies showed that membrane lesion happens with a small amount of Lys49-PLA₂ when the process occurs in the presence of Asp49-PLA₂s [54]. In addition, this step justifies the conservation of residues from the putative catalytic site and hydrophobic channel for Lys49-PLA₂s regarding to their protein ancestry (catalytic PLA₂s) [58] and, also indicates a functional relationship between the “catalytic” and “myotoxic” sites [24].
- II) Stabilization of the toxin on the membrane by interaction of the MDoS from both monomers and the phospholipid head group. As discussed in Section 4.1, sulfate ions observed in several PLA₂ structures would mimic the phosphatidyl group of an anionic lipid bilayer, and then the interaction between MDoS and membrane is a feasible possibility.

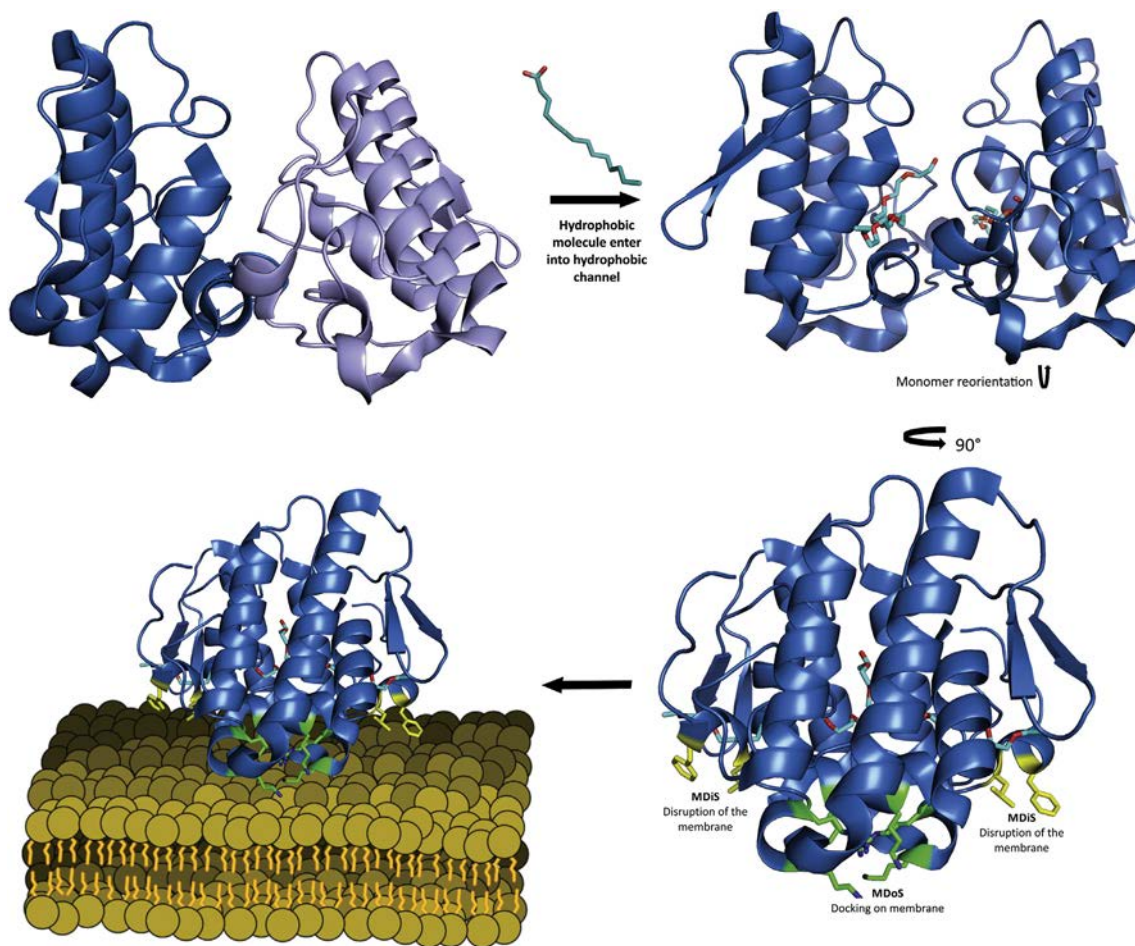


Fig. 6. Myotoxic mechanism of bothropic Lys49-PLA₂s. An apo Lys49-PLA₂ is activated by the entrance of a hydrophobic molecule (e.g. fatty acid) at the hydrophobic channel of the protein leading to a reorientation of a monomer, measured by “two angle model” [24]. This reorientation aligns C-terminal and MDoS regions side-by-side and puts the MDiS region in the same plane, exposed to solvent and in a symmetric position for both monomers. The MDoS region (Lys20; Lys115; Arg118) stabilizes the toxin on membrane by the interaction of charged residues with phospholipid head group. Subsequently, the MDiS region (Leu121; Phe125) destabilizes the membrane with penetration of hydrophobic residues.

III) Membrane destabilization by penetration of the MDIs from both monomers into the membrane. This insertion causes a disorganization of the membrane, allowing an uncontrolled influx of ions (i.e. Ca^{2+} and Na^+), and eventually triggering irreversible intracellular alterations and cell death [50]. Furthermore, the cells damaged release ATP into the extracellular environment, which amplifies the effect of these proteins [59]. These ATP molecules bind to muscle P2X purinergic receptors and induce Ca^{2+} and Na^+ influx and K^+ efflux in cells that have not been directly damaged by the proteins [59].

5. Concluding remarks

Previously evolutionary studies demonstrated that all Lys49-PLA₂s isolated from *Bothrops* snakes nest in a monophyletic clade [58]. These data support some unique characteristics for the bothropic Lys49-PLA₂s, such as the essential role of the dimer formation for expression of myotoxic activity and a specific mechanism of action. Indeed, the dimer dissociation causes a severe impact in its toxicity [21,22] and the high conservation of the residues that constitute the MDoS [24] and MDIs (Fig. 4) is observed in the bothropic proteins. However, non-bothropic Lys49-PLA₂s have a high level of conservation of Lys115 and other Lys residues (Lys80, Lys122, Lys127 and Lys28) which are exposed to solvent and thus, could constitute an analogous MDoS region. Furthermore, since hydrophobic residues of C-terminal regions have also a high level of conservation among all Lys49-PLA₂s (Fig. 4), then steps II and III may be conserved among all Lys49-PLA₂s.

In conclusion, we performed an extensive comparative structural analysis of the BbTX-II and MTX-II from *B. brazili* snake venom with other bothropic Lys49-PLA₂s available in PDB in order to propose a coherent hypothesis of the molecular events that led to their toxicity. We propose a new myotoxic mechanism composed of five steps: i) fatty acid binding, ii) oligomeric changes, iii) protein-membrane docking, iv) membrane destabilization by penetration of hydrophobic residues and v) uncontrolled influx of ions and cell death. This proposition may be useful to efficiently develop inhibitors that can be used to complement the conventional antivenom administration, thus preventing permanent injuries still caused by these proteins in snakebite victims.

The authors gratefully acknowledge financial support from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil). We also acknowledge the use of the Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Brazil).

References

- [1] J.A. Campbell, W.W. Lamar, *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*, Comstock Press, New York, 2004.
- [2] E.G. Muniz, W.S. Maria, M.I. Estevão-Costa, P. Burnheim, C. Chávez-Ortegú, Neutralization potency of horse antithrombotic Brazilian antivenom against *Bothrops* snake venoms from the rain forest, *Toxicon* 38 (2000) 1859–1863.
- [3] A. Kasturiratne, A.R. Wickremasinghe, N. de Silva, N.K. Gunawardena, A. Pathmeswaran, R. Premaratna, L. Savioli, D.G. Lallo, J. de Silva, The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths, *Plos Med.* 5 (2008) e218.
- [4] D. Williams, J.M. Gutiérrez, R. Harrison, D.A. Warrell, J. White, K.D. Winkel, P. Gopalakrishnakone, The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snakebite, *Lancet* 375 (2010) 89–91.
- [5] F.A.A. Araújo, M. Santalúcia, R.F. Cabra, Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos, in: J.L.C. Cardoso, F.O.S. França, F.H. Wen, C.M.S. Málague, V. Haddad Jr. (Eds.), *Animais Peçonhentos no Brasil*, Sarvier, São Paulo, 2003, pp. 06–12.
- [6] F.N. Saúde, *Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos*, FUNASA, Brasília, 2001.
- [7] J.M. Gutiérrez, B. Lomonte, Phospholipases A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms, *Toxicon* 33 (1995) 1405–1424.
- [8] J.M. Gutiérrez, R.D.G. Theakston, D.A. Warrell, Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership, *Plos Med.* 3 (2006) e150.
- [9] H.M. Verheij, J.J. Volwerck, E.H. Jansen, W.C. Puyk, B.W. Dijkstra, J. Drenth, G.H. de Haas, Methylation of histidine-48 in pancreatic phospholipase A₂. Role of histidine and calcium ion in the catalytic mechanism, *Biochemistry* 19 (1980) 743–750.
- [10] D.L. Scott, P. White, Z. Otwinowski, W. Yuan, M.H. Gelb, P.B. Sigler, Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A₂, *Science* 250 (1990) 1541–1546.
- [11] D.R. Holland, L.L. Clancy, S.W. Muchmore, T.J. Ryde, H.M. Eispahr, B.C. Finzel, R.L. Heinrikson, K.D. Watenpaugh, The crystal structure of a lysine 49 phospholipase A₂ from the venom of the cottonmouth snake at 2.0 Å resolution, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 17649–17656.
- [12] C.A. Fernandes, D.P. Marchi-Salvador, G.M. Salvador, M.C. Silva, T.R. Costa, A.M. Soares, M.R.M. Fontes, Comparison between apo and complexed structures of bothropstoxin-I reveals the role of Lys122 and Ca²⁺ binding loop for the catalytically inactive Lys49-PLA₂s, *J. Struct. Biol.* 171 (2010) 31–43.
- [13] R.K. Arni, R.J. Ward, Phospholipase A₂ – a structural review, *Toxicon* 34 (1996) 827–841.
- [14] B. Lomonte, E. Moreno, A. Tarkowski, L.A. Hanson, M. Maccarana, Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a lysine 49 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.* 269 (1994) 29867–29873.
- [15] M. Falconi, A. Desideri, S. Rufini, Membrane-perturbing activity of Viperidae myotoxins: an electrostatic surface potential approach to a puzzling problem, *J. Mol. Recognit.* 13 (2000) 14–19.
- [16] C.E. Nunez, Y. Angulo, B. Lomonte, Identification of myotoxic site of the Lys49 phospholipase A(2) from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* snake venom: synthetic C-terminal peptides from Lys49, but not from Asp49 myotoxins, exert membrane-damaging activities, *Toxicon* 39 (2001) 1587–1594.
- [17] L. Chioato, E.A. Aragão, T.L. Ferreira, A.I. de Medeiros, L.H. Faccioli, R.J. Ward, Mapping of the structural determinants of artificial and biological membrane damaging activities of a Lys49 phospholipase A(2) by scanning alanine mutagenesis, *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes* 1768 (2007) 1247–1257.
- [18] M.T. da Silva-Giotto, R.C. Garratt, 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, *Proteins* 30 (1998) 442–454.
- [19] M.T. Murakami, M.M. Viçoti, J.R. Abrego, M.R. Lourenzoni, A.C. Cintra, E.Z. Arruda, M.A. Tomaz, P.A. Melo, R.K. Arni, Interfacial surface charge and free accessibility to the PLA₂-active site-like region are essential requirements for the activity of Lys49 PLA₂ homologues, *Toxicon* 49 (2007) 378–387.
- [20] J.I. dos Santos, C.A.H. Fernandes, A.J. Magro, M.R.M. Fontes, The intriguing phospholipases A₂ homologues: relevant structural features on myotoxicity and catalytic inactivity, *Protein Pept. Lett.* 16 (2009) 887–893.
- [21] A.H.C. de Oliveira, J.R. Giglio, S.H. Andrião-Escarso, A.S. Ito, R.J. Ward, A pH-induced dissociation of the dimeric form a lysine 49-phospholipase A₂ abolishes Ca²⁺-independent membrane damaging activity, *Biochemistry* 40 (2001) 6912–6920.
- [22] Y. Angulo, J.M. Gutiérrez, A. Soares, W. Cho, B. Lomonte, 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.
- [23] M.T. Murakami, E.Z. Arruda, P.A. Melo, A.B. Martinez, S. Calil-Elias, M.A. Tomaz, B. Lomonte, J.M. Gutiérrez, R.K. Arni, Inhibition of myotoxic activity of *Bothrops asper* myotoxin II by anti-trypsinosomal drug suramin, *J. Mol. Biol.* 350 (2005) 416–426.
- [24] J.I. dos Santos, A.M. Soares, M.R.M. Fontes, Comparative structural studies on Lys49-phospholipases A₂ from *Bothrops* genus reveal their myotoxic site, *J. Struct. Biol.* 167 (2009) 106–116.
- [25] S. Huancahuire-Vega, L.A. Ponce-Soto, D. Martins de Souza, S. Marangoni, Structural and functional characterization of brazilitoxins II and III (BbTX-II and -III), two myotoxins from the venom of *Bothrops brazili* snake, *Toxicon* 54 (2009) 816–827.
- [26] T.R. Costa, D.L. Menaldo, C.Z. Oliveira, N.A. Santos-Filho, S.S. Teixeira, A. Nomizo, A.L. Fuly, M.C. Monteiro, B.M. de Souza, M.S. Palma, R.H. Stábeli, S.V. Sampaio, A.M. Soares, Myotoxic phospholipases A(2) isolated from *Bothrops brazili* snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: cytotoxic effect on microorganism and tumor cells, *Peptides* 29 (2008) 1645–1656.
- [27] J. Jankarik, S.H. Kim, Sparse-matrix sampling – a screening method for crystallization of proteins, *J. Appl. Crystallogr.* 24 (1991) 409–411.
- [28] C.A.H. Fernandes, E.C.G. Gartuzo, I. Pagotto, S. Huancahuire-Vega, L.A. Ponce-Soto, T.R. Costa, S. Marangoni, A.M. Soares, M.R.M. Fontes, Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of three myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops brazili* venom, *Acta Crystallogr. F* 68 (2012) 935–938.
- [29] Z. Otwinowski, W. Minor, Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode, *Macromol. Crystallogr. Pt. A* 276 (1997) 307–326.
- [30] A.J. McCoy, R.W. Grosse-Kunstleve, P.D. Adams, M.D. Winn, L.C. Storoni, R.J. Read, Phaser crystallographic software, *J. Appl. Crystallogr.* 40 (2007) 658–674.
- [31] P.D. Adams, P.V. Afonine, G. Bunkóczi, V.B. Chen, I.W. Davis, N. Echols, J.J. Headd, L.W. Hung, G.J. Kapral, R.W. Grosse-Kunstleve, A.J. McCoy, N.W. Moriarty, R. Oeffner, R.J. Read, D.C. Richardson, J.S. Richardson, T.C. Terwilliger, P.H. Zwart, PHENIX: a comprehensive python-based system for macromolecular structure solution, *Acta Crystallogr. D* 66 (2010) 213–221.
- [32] P. Emsley, K. Cowtan, Coot: model-building tools for molecular graphics, *Acta Crystallogr. D* 60 (2004) 2126–2132.
- [33] A.T. Brunger, 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 and NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination, *Acta Cryst. Sect. D* 54 (1998) 905–921.

- [34] V.B. Chen, W.B. Arendall III, J.J. Headd, D.A. Keedy, R.M. Immormimo, G.J. Kapral, L.W. Murray, J.S. Richardson, D.C. Richardson, MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography, *Acta Crystallogr. D* 66 (2010) 12–21.
- [35] W.S. Delano, The PyMOL Molecular Graphics System, Delano Scientific, San Carlos, 2002.
- [36] E. Krissinel, K. Henrick, Inference of macromolecular assemblies from crystalline state, *J. Mol. Biol.* 372 (2007) 774–797.
- [37] 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.
- [38] P. Delatorre, B.A. Rocha, T. Santi-Gadelha, C.A. Gadelha, M.H. Toyama, B.S. Cavada, Crystal structure of Bn IV in complex with myristic acid: a Lys49 myotoxin phospholipase A₂ from *Bothrops neuwiedi* venom, *Biochimie* 93 (2011) 513–518.
- [39] G.H.M. Salvador, W.L. Cavalcante, J.I. dos Santos, M. Gallacci, A.M. Soares, M.R.M. Fontes, Structural and functional studies with myotoxin II from *Bothrops moojeni* reveal remarkable similarities and differences compared to other catalytically inactive phospholipases A₂-like, *Toxicon* 72 (2013) 52–63.
- [40] Y.H. Pan, T.M. Epstein, M.K. Jain, B.J. Bahnsen, Five coplanar anion binding sites on one face of phospholipase A₂: relationships to interface binding, *Biochemistry* 40 (2001) 609–617.
- [41] B.J. Bahnsen, Structure, function and interfacial allostery in phospholipase A₂: insight from the anion-assisted dimer, *Arch. Biochem. Biophys.* 433 (2005) 96–106.
- [42] S.P. White, D.L. Scott, Z. Otwinowski, M.H. Gelb, P.B. Sigler, Crystal structure of a cobra-venom phospholipase A₂ in complex with a transition-state analogue, *Science* 250 (1990) 1560–1563.
- [43] A.L.B. Ambrosio, M.C. Nonato, H.S.S. de Araújo, R.K. Arni, R. Ward, C. Ownby, D.H.F. de Souza, R.C. Garrat, A molecular mechanism for Lys49-phospholipase A₂ activity based on ligand-induced conformational change, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 7326–7335.
- [44] M.T. Murakami, U. Kuch, C. Betzel, D. Mebs, R.K. Arni, Crystal structure of a novel myotoxic Arg49-phospholipase A₂ homologue (zhaermitoxin) from *Zhafermia mangshanensis* snake venom: insights into Arg49 coordination and the role of Lys122 in polarization of the C-terminus, *Toxicon* 51 (2008) 723–735.
- [45] L. Chioato, A.H. de Oliveira, R. Ruller, J.M. Sá, R.J. Ward, Distinct sites for myotoxic and membrane-damaging activities in the C-terminal region of a Lys49-phospholipase A₂, *Biochem. J.* 366 (2002) 971–976.
- [46] J. Kyte, R.F. Doolittle, A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, *J. Mol. Biol.* 157 (1982) 105–132.
- [47] W.C. Wimley, S.H. White, Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces, *Nat. Struct. Biol.* 3 (1996) 842–848.
- [48] M.N. Naoi, N. Misako, T. Shimizu, A.N. Malviya, K. Yagi, Permeability of amino acids into liposomes, *Biochim. Biophys. Acta* 471 (1977) 305–310.
- [49] A.C. Chakrabarti, D.W. Deamer, Permeability of lipid bilayers to amino acids and phosphate, *Biochim. Biophys. Acta* 1111 (1992) 171–177.
- [50] J.M. Gutiérrez, C.L. Ownby, Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity, *Toxicon* 42 (2003) 915–931.
- [51] X. Zhou, T.C. Tan, S. Valiyaveetil, M.L. Go, R.M. Kini, A. Velazquez-Campoy, J. Sivaraman, Structural characterization of myotoxic ecarpholin S from *Echis carinatus* venom, *Biophys. J.* 95 (2008) 3366–3380.
- [52] Y. Yamazaki, Y. Matsunaga, Y. Nakano, T. Morita, Identification of a vascular endothelial growth factor receptor-binding protein in the venom of Eastern cottonmouth, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 29989–29992.
- [53] D. Fujisawa, Y. Yamazaki, B. Lomonte, T. Morita, Catalytically inactive phospholipase A₂ homologue binds to vascular endothelial growth factor receptor-2 via a C-terminal loop region, *Biochem. J.* 411 (2008) 515–522.
- [54] M. Cintra-Francischinelli, P. Pizzo, L. Rodrigues-Simioni, L.A. Ponce-Soto, O. Rossetto, B. Lomonte, J.M. Gutiérrez, T. Pozzan, C. Montecucco, Calcium imaging of muscle cells treated with snake myotoxins reveals toxin synergism and presence of acceptors, *Cell. Mol. Life Sci.* 66 (2009) 1718–1728.
- [55] B. Lomonte, Y. Angulo, L. Calderon, An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action, *Toxicon* 42 (2003) 885–901.
- [56] R.K. Bortoleto-Bugs, M.R. Bugs, A.A. Neto, R.J. Ward, A micelle nucleation model for the interaction of dodecyl sulphate with Lys49-phospholipases A₂, *Biophys. Chem.* 125 (2007) 213–220.
- [57] H.S. Selistre de Araujo, S.P. White, C.L. Ownby, cDNA cloning and sequence analysis of a lysine-49 phospholipase A₂ myotoxin from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom, *Arch. Biochem. Biophys.* 326 (1996) 21–30.
- [58] J.I. dos Santos, M. Cintra-Francischinelli, R.J. Borges, C.A. Fernandes, P. Pizzo, A.C. Cintra, A.S. Braz, A.M. Soares, M.R. Fontes, Structural, functional and bioinformatics studies reveal a new snake venom homologue phospholipase A₂ class, *Proteins* 79 (2011) 61–78.
- [59] M. Cintra Francischinelli, P. Caccin, A. Chiavegato, P. Pizzo, G. Carmignoto, Y. Ângulo, B. Lomonte, J.M. Gutiérrez, C. Montecucco, *Bothrops* snake myotoxins induce a large efflux of ATP and potassium with spreading of cell damage and pain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 14140–14145.
- [60] A.J. Magro, A.M. Soares, J.R. Giglio, M.R. Fontes, Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A(2): quaternary structure and inhibition mechanism insights, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311 (2003) 713–720.
- [61] D.P. Marchi-Salvador, C.A. Fernandes, L.B. Silveira, A.M. Soares, M.R. Fontes, Crystal structure of a phospholipase A(2) homolog complexed with p-bromophenacyl bromide reveals important structural changes associated with the inhibition of myotoxic activity, *Biochim. Biophys. Acta* 1794 (2009) 1583–1590.
- [62] A.M. Fenwick, R.K. Gutberlet, J.A. Evans, C.K. Parkinson, Morphological and molecular evidence for phylogenetic classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothrops* and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae), *Zool. J. Linnean. Soc.* 156 (2009) 617–640.
- [63] R. Renetseder, S. Brunie, B.W. Dijkstra, J. Drenth, P.B. Sigler, A comparison of the crystal structures of phospholipase A₂ from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 11627–11634.
- [64] A.S. Schwartz, L. Pachter, Multiple alignment by sequence annealing, *Bioinformatics* 23 (2007) e24–e29.

Patrícia S. Shimabuku,^{a,b}
Carlos A. H. Fernandes,^{a,b}
Angelo J. Magro,^{a,b} Tássia R.
Costa,^{b,c} Andreimar M. Soares^{b,c}
and Marcos R. M. Fontes^{a,b*}

^aDepartamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brazil, ^bInstituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Toxinas, CNPq, Brazil, and ^cDepartamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, FCFRP, USP, Ribeirão Preto-SP, Brazil

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

Received 16 September 2010

Accepted 7 December 2010

Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a Lys49-phospholipase A₂ complexed with caffeic acid, a molecule with inhibitory properties against snake venoms

Phospholipases A₂ (PLA₂s) are one of the main components of bothropic venoms; in addition to their phospholipid hydrolysis action, they are involved in a wide spectrum of pharmacological activities, including neurotoxicity, myotoxicity and cardiotoxicity. Caffeic acid is an inhibitor that is present in several plants and is employed for the treatment of ophidian envenomations in the folk medicine of many developing countries; as bothropic snake bites are not efficiently neutralized by conventional serum therapy, it may be useful as an antivenom. In this work, the cocrystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the Lys49-PLA₂ piratoxin I from *Bothrops pirajai* venom in the presence of the inhibitor caffeic acid (CA) are reported. The crystals diffracted X-rays to 1.65 Å resolution and the structure was solved by molecular-replacement techniques. The electron-density map unambiguously indicated the presence of three CA molecules that interact with the C-terminus of the protein. This is the first time a ligand has been observed bound to this region and is in agreement with various experiments previously reported in the literature.

1. Introduction

Envenomation resulting from snake bites is an important public health problem in rural areas of tropical and subtropical countries in Asia, Africa, Oceania and Latin America and is considered as a neglected tropical disease by the World Health Organization. In spite of the majority of deaths from snake bites occurring in South and South East Asia and sub-Saharan Africa (Kasturiratne *et al.*, 2008) these accidents are also an important health problem in Latin America as they may cause permanent tissue loss and amputation of the affected limb (Gutiérrez & Lomonte, 1995). Bites by snakes of the *Bothrops* genus are responsible for more than 85% of all ophidian accidents reported in Latin America (Fundação Nacional de Saúde, 2001; de Oliveira, 2009) and lead to drastic local tissue damage (Gutiérrez & Lomonte, 1995).

Phospholipases A₂ (PLA₂s) are one of the main components of the venom of these snakes (Fox & Serrano, 2008) and, in addition to their phospholipid hydrolysis action, are involved in a wide spectrum of pharmacological activities, including neurotoxicity, myotoxicity and cardiotoxicity (Bon *et al.*, 1979; Gutiérrez *et al.*, 1991; Fletcher *et al.*, 1981). An important subgroup of PLA₂s, the Lys49-PLA₂s, which exhibit natural replacements of the Tyr28 and Asp49 residues by Asn28 and Lys49, respectively (Holland *et al.*, 1990; Fernandes *et al.*, 2010), are found in snakes of the Viperidae family. These substitutions hinder the binding of Ca²⁺ ion, an essential cofactor for PLA₂ catalysis, which results in an inability of the Lys49-PLA₂s to promote phospholipid hydrolysis (Arni & Ward, 1996). Despite their catalytic inactivity, Lys49-PLA₂s play an important role in ophidian accidents, inducing drastic local myonecrosis by a Ca²⁺-independent mechanism (Gutiérrez & Lomonte, 1995). Synthetic peptides and site-directed mutagenesis experiments have shown that segment 115–129 of the C-terminal region is responsible for this myotoxic activity (Ward *et al.*, 2002; Lomonte *et al.*, 2003; Chioato *et al.*, 2007). Recently, a



© 2011 International Union of Crystallography
All rights reserved

myotoxic site of Lys49-PLA₂s specific to snakes of the *Bothrops* genus that contains the C-terminal residues Lys115 and Arg118 and one residue from the N-terminal region (Lys20) has been proposed (dos Santos *et al.*, 2009).

However, this pronounced local myotoxic effect is not efficiently neutralized by conventional serum therapy, the action of which is related to systemic mechanisms. Although a successful approach, in addition to this limited effectiveness in protecting against this rapid local tissue-damaging effect serum therapy presents other drawbacks such as (i) limited or lack of access to antivenoms in rural areas of developing countries, where most accidents occur, (ii) adverse reactions originating in patients owing to the infusion of animal proteins and (iii) significant variations in venom composition and antigenic reactivity owing to the geographic and taxonomic diversity of snakes (Soares *et al.*, 2005). Therefore, an extensive search for and identification of new compounds, either synthetic or natural, that may be useful to complement antivenom treatment is extremely important.

In folk medicine, especially in developing countries, several vegetal species are employed for the treatment of ophidian envenomations in communities that lack prompt access to serum therapy (Soares *et al.*, 2005; Samy *et al.*, 2008). In recent years, a large number of studies have investigated the effects of several plants on snakebites, including the isolation and characterization of their active constituents and the elucidation of their possible mechanisms of action (Mors *et al.*, 2000; Soares *et al.*, 2005; Cintra-Francischinelli *et al.*, 2008; Tieli *et al.*, 2005). Caffeic acid (CA) is a cinnamic acid derivative with exceptional biochemical reactivity that is present in several plants with anti-snake venom properties such as *Prestonia coalita*, *Strychnos nux-vomica*, *Taraxacum officinale* and *Vernonia condensate* (Mors *et al.*, 2000; Soares *et al.*, 2005). Furthermore, crystalline caffeic acid derivatives have been demonstrated to be antidotes for snake venoms by oral or parenteral administration (Agoro, 1978).

In this work, we report the crystallization, collection of X-ray diffraction data and molecular-replacement solution of piratoxin I (PrTX-I), a basic noncatalytic and myotoxic Lys49-PLA₂ from *B. pirajai* venom, complexed with caffeic acid. The final crystallographic model of this complex may provide insight into the mechanisms that lead to inhibition of the myotoxicity of snake-venom PLA₂s.

2. Materials and methods

2.1. Protein purification and crystallization

PrTX-I was isolated from *B. pirajai* snake venom by gel-filtration and ion-exchange chromatography as described previously (Soares *et al.*, 2001). A lyophilized sample of PrTX-I was dissolved in ultrapure water to a concentration of 15 mg ml⁻¹. CA was purchased from Sigma-Aldrich and was dissolved in 50% ethanol to give an 8:1 molar ratio of inhibitor:protein. Crystals were obtained by the hanging-drop vapour-diffusion method (McPherson, 2003); the drops consisted of 1 µl protein solution, 0.2 µl CA solution and 0.8 µl reservoir solution and were equilibrated against 500 µl of the same reservoir solution. The best crystals were obtained after an optimization process from the native protein crystallization conditions (dos Santos *et al.*, 2009); the reservoir solution consisted of 30% polyethylene glycol 4000, 100 mM Tris-HCl pH 8.1 and 200 mM lithium sulfate and crystals were obtained after one month at 291 K (Fig. 1).

2.2. X-ray data collection and processing

X-ray diffraction data were collected from a single PrTX-I-CA crystal at a wavelength of 1.4586 Å (at 100 K) using a synchrotron-

Table 1

X-ray diffraction data-collection and processing statistics.

Values in parentheses are for the highest resolution shell. Data were processed using the *HKL* suite (Otwinowski & Minor, 1997).

Unit-cell parameters (Å, °)	$a = 39.2, b = 72.0, c = 44.6,$ $\beta = 102.8$
Space group	$P2_1$
Resolution (Å)	40–1.65 (1.73–1.65)
Unique reflections	27856 (3444)
Completeness (%)	94.6 (93.8)
R_{merge} (%) [†]	6.5 (39.5)
Radiation source	MX2 station, LNLS
Data-collection temperature (K)	100
Average $I/\sigma(I)$	27.4 (2.34)
Multiplicity	2.8 (2.7)
Matthews coefficient V_M (Å ³ Da ⁻¹)	2.20
Molecules in the asymmetric unit	2
Solvent content (%)	44.2

[†] $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$, where $I_i(hkl)$ is the intensity of an individual measurement of the reflection with Miller indices hkl and $\langle I(hkl) \rangle$ is the mean intensity of that reflection. Calculated using reflections with $I > -3\sigma(I)$.

radiation source [MX2 station, 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-cooled in a stream of nitrogen at 100 K without using any cryoprotectant. The crystal-to-detector distance was 85 mm and an oscillation range of 1° was used, resulting in the collection of a total of 141 images. Data processing was carried out at 1.65 Å resolution using the *HKL* program suite (Otwinowski & Minor, 1997).

3. Results and discussion

The data-collection statistics are shown in Table 1. The crystals belonged to the orthorhombic space group $P2_12_12_1$, with unit-cell parameters $a = 39.2, b = 72.0, c = 44.6$ Å, $\beta = 102.8^\circ$. The data set was 93.8% complete at 1.65 Å resolution, with an R_{merge} of 6.5%. Calculations based on the protein molecular weight indicated the presence of two molecules in the asymmetric unit. This corresponds to a Matthews coefficient (Matthews, 1968) V_M of 2.20 Å³ Da⁻¹ and a calculated solvent content of 44.2%. These values are within the typical range for protein crystals, assuming a value of 0.74 cm³ g⁻¹ for the protein partial specific volume. The crystal structure of PrTX-I-CA was determined by molecular-replacement techniques implemented in the program *MOLREP* (Vagin & Teplyakov, 1997) from the *CCP4i* program package (Potterton *et al.*, 2003) using the coordinates of bothropstoxin I complexed with polyethylene glycol



Figure 1
Crystals of PrTX-I complexed with CA.

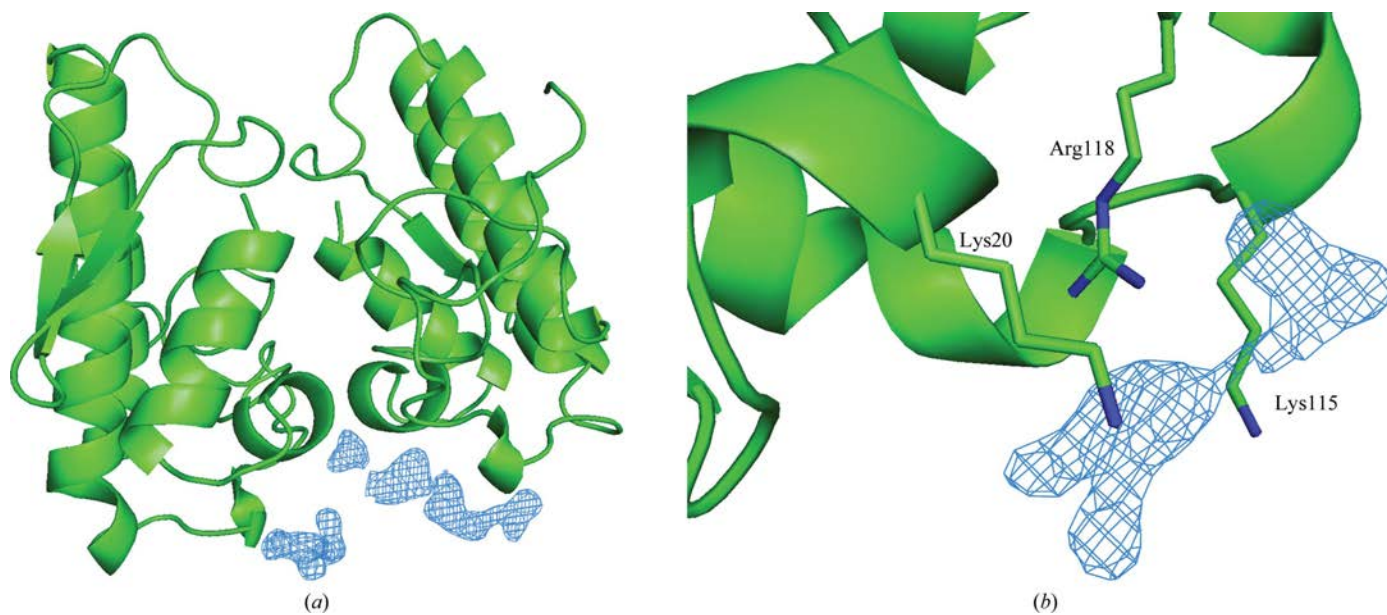


Figure 2

(a) Electron-density difference map contoured at 1.0 standard deviation of the C-terminal region of PrTX-I-CA where electron density that corresponds to caffeic acid molecules was found. (b) Detailed view of the myotoxic site of the *Bothrops* genus including a difference electron-density map that corresponds to a caffeic acid molecule. The caffeic acid molecules were not considered in the calculation of the electron-density maps. This figure was drawn using PyMOL (DeLano, 2002).

4000 (PDB code 3iq3; Fernandes *et al.*, 2010) as a search model and confirmed the presence of a dimer in the asymmetric unit.

It has been demonstrated for the structures of dimeric Lys49-PLA₂s that apo structures belong to space group $P3_121$, while complexed forms belong to space groups $P2_1$ or $P2_12_12_1$ (dos Santos *et al.*, 2009). The space-group change arises from conformational changes when a ligand is bound to Lys49-PLA₂s (dos Santos *et al.*, 2009). Since space group $P2_12_12_1$ is observed for the PrTX-I-CA complex, it is possible to suggest that inhibitor binding has led to changes in the PrTX-I quaternary structure.

Observation of the electron-density map unambiguously indicated the presence of three CA molecules in the C-terminal region (Fig. 2). As proposed previously, this indicates the presence of a myotoxic site specific to the Lys49-PLA₂s of snakes from the *Bothrops* genus that is formed by two residues from the C-terminal region (Lys115 and Arg118) and one residue from the N-terminal region (Lys20) (dos Santos *et al.*, 2009). Here, this myotoxic site is in the neighbourhood of a molecule of caffeic acid in one of the monomers. Thus, for the first time, the structure of a Lys49-PLA₂-inhibitor complex supports the hypothesis of a myotoxic site in its C-terminus in addition to the previously demonstrated classic binding site (known as the active site; Marchi-Salvador *et al.*, 2009).

The crystallization and X-ray diffraction analysis of PrTX-I complexed with rosmarinic acid (RA; dos Santos *et al.*, 2010), an ester of caffeic acid and 3,4-dihydroxyphenyl lactic acid, has recently been reported. RA is found in several plants that have antivenom properties such as *Cordia verbenacea* and several species of the genera *Echinacea* and *Perilla* (Soares *et al.*, 2005; Mors *et al.*, 2000). Interestingly, RA binds in a different region to the CA molecule. Detailed comparative structural studies of PrTX-I-CA and PrTX-I-RA may thus provide new and important details of how these vegetal molecules lead to toxin inhibition.

In conclusion, a systematic study of PrTX-I complexed with different ligands may lead to the development of effective inhibitors that can be used in biotechnological applications, as helpful supple-

mental treatments to serum therapy and as important models for the synthesis of new drugs.

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) and Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas-SP).

References

- Agoro, J. W. (1978). US Patent 4124724.
 Arni, R. K. & Ward, R. J. (1996). *Toxicol.* **34**, 827–841.
 Bon, C., Changeux, J.-P., Jeng, T.-W. & Fraenkel-Conrat, H. (1979). *Eur. J. Biochem.* **99**, 471–481.
 Chioato, L., Aragão, E. A., Lopes Ferreira, T., Medeiros, A. I., Faccioli, L. H. & Ward, R. J. (2007). *Biochim. Biophys. Acta*, **1768**, 1247–1257.
 Cintra-Francischini, M., Silva, M. G., Andréo-Filho, N., Gerenutti, M., Cintra, A. C., Giglio, J. R., Leite, G. B., Cruz-Höfling, M. A., Rodrigues-Simioni, L. & Oshima-Franco, Y. (2008). *Phytother. Res.* **22**, 784–790.
 DeLano, W. L. (2002). *PyMOL*. <http://www.pymol.org>.
 dos Santos, J. I., Santos-Filho, N. A., Soares, A. M. & Fontes, M. R. M. (2010). *Acta Cryst.* **F66**, 699–701.
 dos Santos, J. I., Soares, A. M. & Fontes, M. R. (2009). *J. Struct. Biol.* **167**, 106–116.
 Fernandes, C. A., Marchi-Salvador, D. P., Salvador, G. M., Silva, M. C., Costa, T. R., Soares, A. M. & Fontes, M. R. (2010). *J. Struct. Biol.* **171**, 31–43.
 Fletcher, J. E., Rapuano, B. E., Condrea, E., Yang, C. C. & Rosenberg, P. (1981). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **59**, 375–388.
 Fox, J. W. & Serrano, S. M. (2008). *Proteomics*, **8**, 909–920.
 Fundação Nacional de Saúde (2001). *Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos*. Brasília: Fundação Nacional de Saúde.
 Gutiérrez, J. M. & Lomonte, B. (1995). *Toxicol.* **33**, 1405–1424.
 Gutiérrez, J. M., Núñez, J., Díaz, C., Cintra, A. C., Homs-Brandeburgo, M. I. & Giglio, J. R. (1991). *Exp. Mol. Pathol.* **55**, 217–229.
 Holland, D. R., Clancy, L. L., Muchmore, S. W., Ryde, T. J., Einspahr, H. M., Finzel, B. C., Heinrikson, R. L. & Watenpugh, K. D. (1990). *J. Biol. Chem.* **265**, 17649–17656.

- Kasturiratne, A., Wickremasinghe, A. R., de Silva, N., Gunawardena, N. K., Pathmeswaran, A., Premaratna, R., Savioli, L., Lalloo, D. G. & de Silva, H. J. (2008). *PLoS Med.* **5**, e218.
- Lomonte, B., Angulo, Y. & Santamaria, C. (2003). *Toxicon*, **42**, 307–312.
- Marchi-Salvador, D. P., Fernandes, C. A., Silveira, L. B., Soares, A. M. & Fontes, M. R. (2009). *Biochim. Biophys. Acta*, **1794**, 1583–1590.
- Matthews, B. W. (1968). *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497.
- McPherson, A. (2003). *Introduction to Macromolecular Crystallography*. Hoboken: Wiley.
- Mors, W. B., Nascimento, M. C., Pereira, B. M. & Pereira, N. A. (2000). *Phytochemistry*, **55**, 627–642.
- Oliveira, R. C. W. de (2009). *Animais Peçonhentos do Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Envenenamentos*. São Paulo: Sarvier.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). *Methods Enzymol.* **276**, 307–326.
- Potterton, E., Briggs, P., Turkenburg, M. & Dodson, E. (2003). *Acta Cryst.* **D59**, 1131–1137.
- Samy, R. P., Thwin, M. M., Gopalakrishnakone, P. & Ignacimuthu, S. (2008). *J. Ethnopharmacol.* **115**, 302–312.
- Soares, A. M., Andrião-Escarso, S. H., Bortoleto, R. K., Rodrigues-Simioni, L., Arni, R. K., Ward, R. J., Gutiérrez, J. M. & Giglio, J. R. (2001). *Arch. Biochem. Biophys.* **387**, 188–196.
- Soares, A. M., Ticli, F. K., Marcussi, S., Lourenco, M. V., Januario, A. H., Sampaio, S. V., Giglio, J. R., Lomonte, B. & Pereira, P. S. (2005). *Curr. Med. Chem.* **12**, 2625–2641.
- Ticli, F. K., Hage, L. I., Cambraia, R. S., Pereira, P. S., Magro, A. J., Fontes, M. R., Stabeli, R. G., Giglio, J. R., Franca, S. C., Soares, A. M. & Sampaio, S. V. (2005). *Toxicon*, **46**, 318–327.
- Vagin, A. & Teplyakov, A. (2010). *Acta Cryst.* **D66**, 22–25.
- Ward, R. J., Chioato, L., de Oliveira, A. H., Ruller, R. & Sá, J. M. (2002). *Biochem. J.* **362**, 89–96.

Structural and Phylogenetic Studies with MjTX-I Reveal a Multi-Oligomeric Toxin – a Novel Feature in Lys49-PLA₂s Protein Class

Guilherme H. M. Salvador¹✉, Carlos A. H. Fernandes¹✉, Angelo J. Magro¹✉, Daniela P. Marchi-Salvador¹✉, Walter L. G. Cavalcante^{1,2}, Roberto M. Fernandez¹, Márcia Gallacci², Andreimar M. Soares³, Cristiano L. P. Oliveira⁴, Marcos R. M. Fontes^{1*}

1 Depto. de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista–UNESP, Botucatu, SP, Brazil, **2** Depto. de Farmacologia, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, SP, Brazil, **3** Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ Rondônia and Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas – CEBio, Universidade Federal de Rondônia – UNIR, Porto Velho, RO, Brazil, **4** Depto. de Física Experimental, Instituto de Física, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, SP, Brazil

Abstract

The mortality caused by snakebites is more damaging than many tropical diseases, such as dengue haemorrhagic fever, cholera, leishmaniasis, schistosomiasis and Chagas disease. For this reason, snakebite envenoming adversely affects health services of tropical and subtropical countries and is recognized as a neglected disease by the World Health Organization. One of the main components of snake venoms is the Lys49-phospholipases A₂, which is catalytically inactive but possesses other toxic and pharmacological activities. Preliminary studies with MjTX-I from *Bothrops moojeni* snake venom revealed intriguing new structural and functional characteristics compared to other bothropic Lys49-PLA₂s. We present in this article a comprehensive study with MjTX-I using several techniques, including crystallography, small angle X-ray scattering, analytical size-exclusion chromatography, dynamic light scattering, myographic studies, bioinformatics and molecular phylogenetic analyses. Based in all these experiments we demonstrated that MjTX-I is probably a unique Lys49-PLA₂, which may adopt different oligomeric forms depending on the physical-chemical environment. Furthermore, we showed that its myotoxic activity is dramatically low compared to other Lys49-PLA₂s, probably due to the novel oligomeric conformations and important mutations in the C-terminal region of the protein. The phylogenetic analysis also showed that this toxin is clearly distinct from other bothropic Lys49-PLA₂s, in conformity with the peculiar oligomeric characteristics of MjTX-I and possible emergence of new functionalities in response to environmental changes and adaptation to new preys.

Citation: Salvador GHM, Fernandes CAH, Magro AJ, Marchi-Salvador DP, Cavalcante WLG, et al. (2013) Structural and Phylogenetic Studies with MjTX-I Reveal a Multi-Oligomeric Toxin – a Novel Feature in Lys49-PLA₂s Protein Class. PLoS ONE 8(4): e60610. doi:10.1371/journal.pone.0060610

Editor: Israel Silman, Weizmann Institute of Science, Israel

Received: December 18, 2012; **Accepted:** February 28, 2013; **Published:** April 3, 2013

Copyright: © 2013 Salvador et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by FAPESP, CNPq and Capes. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: fontes@ibb.unesp.br

✉ These authors contributed equally to this work.

✉ Current address: Depto. de Biologia Molecular, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba – UFPB, João Pessoa-PB, Brazil

Introduction

Snakes are one of the major groups of the Squamata reptilian order, with more than 3300 extant and extinct species already identified by the scientific community [1]. Many of these animals are venomous and represent an important public health problem in rural areas of Asia, Africa and Latin America. Recently, it was attested that the mortality caused by snakebites is higher than other neglected tropical diseases, such as dengue haemorrhagic fever, cholera, leishmaniasis, schistosomiasis and Chagas disease [2]. This fact has attracted massive attention from the scientific community resulting in the publication of some important articles and reviews about the real impact of the snakebites on health services [2,3,4] and, recently, snakebite accidents were classified as a neglected disease by the World Health Organization (WHO) [3]. Among the venomous snakes, the world-widespread Viperidae family is one of the most harmful groups with respect to snake envenoming, especially in Asia and Latin America [3,5]. In Latin

America, the *Bothrops* viperid genus is particularly important since these animals are responsible for 85% of all ophidian accidents reported in this geographic area [6,7]. One of the main components of bothropic and other snake venoms are the phospholipases A₂, enzymes which are able to promote Ca²⁺-dependent hydrolysis of *sn*-2 acyl groups of membrane phospholipids, releasing free fatty acids and lysophospholipids [8]. A subgroup of these proteins, the Lys49-phospholipases A₂ (PLA₂s), are catalytically inactive due to the lack of Ca²⁺ coordination related to the natural mutations Tyr28→Asn and Asp49→Lys [9,10], but, in association with metalloproteases, may cause permanent tissue loss, disability and even require limb amputation due to local myonecrosis inefficiently neutralized by serum therapy [5].

Experiments based on electrophoresis, spectroscopy [11,12], crystallography [13,14,15,16] small angle X-ray scattering [17] and dynamic light scattering [10] have brought important insights

into the structural features of these molecules demonstrating that the bothropic Lys49-PLA₂s are dimeric in solution. Crystallographic studies also revealed that these proteins have a dimeric structure and a biological unit held by contacts between the tips of β -wing segments and N-terminal α -helices from both monomers [13]. The biological significance of this dimeric conformation was straightened by Ward *et al.* (2002), whose work demonstrated the occurrence of a fluorescence signal probably originated from the interaction between the Lys49-PLA₂-conserved residues Trp77 in a solution containing the toxin BthTX-I from *Bothrops jararacussu*. More recently, the crystal structures of three Lys49-PLA₂s complexed to suramin and α -tocopherol were solved in an “alternative” dimeric assembly in contrast to the previous conventional form. The alternative dimer accommodates appropriately the hydrophobic segments of these ligands and presents a larger interfacial area with more negative free energy compared to the conventional dimeric form. Since it is possible to obtain the same alternative dimer in the unit cells for all solved structures to date, this choice seems to be the correct biological conformation for the Lys49-PLA₂s [15,18]. Small angle X-ray scattering experiments and molecular dynamic simulations with BthTX-I also show that this alternative dimer is the most probable configuration of this protein in solution [17]. Structural, functional and site-direct mutagenesis studies pointed out that the C-terminal region of Lys49-PLA₂s (residues 115–129) is mainly responsible for their myotoxic activity [19,20,21,22,23,24]. More recently, a specific myotoxic site for bothropic Lys49-PLA₂s composed of two residues from C-terminal region (Lys115 and Arg118) and one from N-terminal region (Lys20) was proposed [18].

In contrast with these well-established structural and functional data for different bothropic Lys49-PLA₂s, preliminary structural and functional studies with MjTX-I (myotoxin-I) from *Bothrops moojeni* venom revealed intriguing new results. Electrophoresis experiments with a purified fraction of MjTX-I showed several oligomeric conformations [25] and its crystal structure revealed a tetrameric conformation composed by two “conventional” dimers [26]. Moreover, the MjTX-I myotoxicity measured by plasma creatine kinase activity is significantly lower than other Lys49-PLA₂s [27]. In the light of these new results, we performed a very comprehensive study with MjTX-I using different techniques, including crystallography, analytical size-exclusion chromatography, dynamic light scattering, small angle X-ray scattering, myographic studies, bioinformatics and molecular phylogenetic analyses. The results obtained indicated that MjTX-I is probably a unique Lys49-PLA₂, with a special capacity for adopting diverse oligomeric forms. These data reinforce the importance of quaternary assembly of Lys49-PLA₂s to their myotoxic activity and add new elements to the functional mechanisms and evolution of these and other related molecules.

Materials and Methods

Ethics

Institutional Animal Care and Use Committee (Institute of Biosciences - Sao Paulo State University) approved this study under the number 033/05. Animal procedures were in accordance with the guidelines for animal care prepared by the Committee on Care and Use of

Laboratory Animal Resources, National Research Council, USA.

MjTX-I purification

MjTX-I was isolated from *Bothrops moojeni* venom by ion-exchange chromatography in HiTrap CM Sepharose Fast Flow

(5 ml; GE HealthcareTM) equilibrated with 0.05 M ammonium bicarbonate buffer pH 8.0. Elution started with this buffer, followed by a gradient from 0.05 to 0.5 M ammonium bicarbonate at 20 °C as previously described [25,28]. The purity of the MjTX-I eluted fraction was analyzed by 13% SDS-PAGE gel electrophoresis followed by Coomassie Blue staining.

Crystallization trials

Initially, a lyophilized sample of MjTX-I was dissolved in ultra-pure water at a concentration of 12.0 mg.ml⁻¹. The crystallization experiments were performed using the sparse matrix method [29] and the hanging drop vapor diffusion technique [30]. 1 μ l of protein and 1 μ l reservoir drop were mixed and equilibrated against 500 μ l of the same precipitant solution. After approximately 350 days at 291 K, crystals appeared in a solution containing 0.15 M MgCl₂, 32% (w/v) polyethylene glycol (PEG) 4000 and 0.1 M Tris-HCl pH 8.5 as described previously [26].

X-ray data collection and data processing

X-ray diffraction data were collected using a wavelength of 1.421 Å at a synchrotron-radiation source (MX1 beamline – Laboratório Nacional de Luz Sincrotron, LNLS, Campinas, Brazil) with a MAR CCDTM imaging-plate detector (MAR ResearchTM). The crystals submitted to X-ray diffraction experiments were held in appropriate nylon loops and flash-cooled in a stream of nitrogen at 100 K. The best data set (150 images; $d_{\text{detector}} = 80$ mm; $\Delta\phi = 1^\circ$) was processed at 2.49 Å resolution using the HKL program package [31]. X-ray diffraction data and processing statistics are presented in Table 1.

Structure determination and refinement

The MjTX-I crystal structure was solved by the Molecular Replacement Method using the program MOLREP [32] from CCP4 package v.6.1.13 [33] and the all atom coordinates of PrTX-II monomer A (PDB access code 1QLL) [34] as the search model. After a cycle of rigid body refinement using CNS v.1.2 program [35], the resulting electron density map was used for modeling side chains corresponding to the MjTX-I amino acid sequence. The modeling process was performed by manual rebuilding using program Coot v.0.7 [36]. Polyethylene glycol (PEG) 4000 and solvent molecules were added by the programs CNS v.1.2 and Coot v.0.7, respectively. Due to the lack of electron density in some regions of the model, the following side chains of amino acid residues were not modeled: monomer A: Lys 53, Lys69, Lys93, Lys115, Lys116, and Lys122; monomer B: Lys16, Lys20, Lys36, Lys57, Lys69, Lys 70, Asp76, Lys78, Glu87, Asn88, Lys116, Val119, Lys122, and Arg131; monomer C: Lys16, Lys20, Lys36, Lys69, Lys70, Lys78, Lys93, Lys115, Lys116, and Lys129; monomer D: Lys7, Gln11, Lys16, Lys20, Lys57, Leu58, Lys69, Lys70, Tyr73, Asp76, Trp77, Glu86, Asn88, Lys115, and Phe125. For the same reason, the amino acid residues Val119, Tyr120, Leu121, and Lys122 from monomer C and Asp118, Val119, Tyr120, Leu121, and Lys122 from monomer D were also completely removed from the model. MolProbity program (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>) [37] was used to check the general quality of the final model. The van der Waals intermolecular interactions were detected with the software PSAIA (Protein Structure and Interaction Analyzer) [38] using a threshold of 1.5 Å. The refinement statistics and other information are shown in Table 1. All structural figures were generated using PyMOL v.1.3 program [39].

Table 1. X-ray data collection and refinement statistics.

Unit cell (Å, °)	a = 57.6, b = 125.9, c = 65.3, β = 106
Space group	C2
Resolution (Å)	33.44 – 2.49 (2.55 – 2.49) ^a
Unique reflections	15300 (1541) ^a
Completeness (%)	98.0 (98.9) ^a
I/σ (I)	20.64 (4.69) ^a
Redundancy	3.1 (3.1) ^a
Molecules in ASU	4
Matthews coefficient V _M (Å ³ Da ⁻¹)	2.12
R _{merge} ^b (%)	5.7 (22.0) ^a
R _{cryst}	25.13
R _{free}	26.27
Number of non-hydrogen atoms	
Protein	3544
Waters	113
PEG molecule	3
Mean B-factor (Å ²) ^c	
Overall	50.89
Ramachandran plot (%) ^d	
Residues in favored region	95.1
Residues in outlier region	1.8

^aNumbers in parenthesis are for the highest resolution shell.

^b $R_{merge} = \frac{\sum_{hkl} (\sum_i |I_{hkl_i} - \langle I_{hkl} \rangle|)}{\sum_{hkl} \langle I_{hkl} \rangle}$, 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 $I > -3\sigma(I)$.

^cCalculated with CNS program [35].

^dCalculated with MolProbity program [37].

doi:10.1371/journal.pone.0060610.t001

Dynamic light scattering

The dynamic light scattering (DLS) experiments were executed with MjTX-I at 1.5 mg.mL⁻¹ concentration and 18°C using a device DynaPro TITANTM (Wyatt TechnologyTM). Measurements were carried out with the protein dissolved in ultra-pure water or in different Tris-HCl pH 8.0 concentrations (0.5, 2.0, 5.0, 10.0, and 20.0 mM). One hundred measurements were acquired in each experiment; in the case of solutions containing buffer, the data were obtained immediately after the Tris-HCl pH 8.0 addition and two hours later. The analysis of the final data was performed with the program Dynamics v.6.10 (Wyatt TechnologyTM).

Analytical size exclusion chromatography

Analytical size-exclusion chromatography (SEC) was performed with the purified MjTX-I using a Superdex 75 10/300 GL (GE HealthcareTM) column equilibrated with 20 mM Tris-HCl pH 8.0 at 20°C. The MjTX-I sample (V = 0.1 ml; [2 mg.mL⁻¹]) was injected at a flow rate of 0.5 ml/min. The molecular weight standards were obtained from a low molecular weight gel filtration calibration kit (Sigma-AldrichTM) containing the following components: blue dextran (2000 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), cytochrome C (12.4 kDa), and aprotinin (6.5 kDa). The retention volumes for each standard and sample were measured and used to calculate the partition coefficients (K_{av}), which are defined as $K_{av} = (V_r - V_o)/(V_c - V_o)$, where V_r = retention volume, V_o =

void volume (calculated based on the retention time of the blue dextran standard), and V_c = geometric bead volume of the column. The coefficient K_{av} for each standard was plotted against the log of the molecular weight in order to generate a standard curve, which was used to determine the approximate molecular weight of each oligomeric species found in the experimental sample.

Small angle X-ray scattering analysis

Small-angle X-ray scattering (SAXS) experiments were performed with MjTX-I dissolved in ultra-pure water on 20 mM Tris-HCl pH 8.0 at 5.0 mg.mL⁻¹ concentration. The measurements were taken at room temperature using NANOSTARTM equipment from BrukerTM, placed at the Laboratory of Crystallography at the Institute of Physics of the University of São Paulo. Scattering experiments on the liquid samples were performed using reusable quartz capillaries glued on stainless steel cases. Background intensities were obtained based on scattering by the corresponding buffers measured using the same capillaries. The data obtained by 3600 s exposure were analyzed with the package SUPERSAXS (Oliveira & Pedersen, unpublished). Experimental data are shown as intensity I(q) versus the momentum transfer $q = (4\pi/\lambda)\sin\theta$, where λ is the radiation wavelength and 2θ is the scattering angle. After treatment, the data were normalized to absolute scale using water as the primary standard. The Indirect Fourier Transformation (IFT) was performed using the Glatter method [40] with a slightly different implementation [41]. In order to obtain better structural insights, the SAXS data were compared with the MjTX-I crystallographic structure described in this work, using the program CRY SOL [42]. As described later, since this structure was solved with four monomers in the asymmetric unit, the tetrameric, dimeric and monomeric structures could be tested and compared to the experimental data. Finally, the *ab initio* modeling was performed using the program GASBOR [43]. In this method a sequence of interconnected chains is used to represent the protein backbone. Each sphere corresponds to one amino acid and therefore the total number of spheres is identical to the number of protein residues. Starting from a spherical arrangement of the backbone the program performs a simulated annealing optimization in which the backbone three-dimensional arrangement is changed to improved fitting with the scattering data. As result, a model representing the low resolution structures of the protein is obtained.

Myographic Studies

Adult male mice weighing 25 to 30 g were maintained under a 12 h light-dark cycle (lights on at 07:00) in a temperature controlled environment (22 ± 2°C) for at least ten days prior to the experiments. Food and water were freely available.

Mice were killed by exsanguination after ether anesthesia. The phrenic nerve-diaphragm preparation was removed and mounted vertically under a tension of 5 g in a conventional isolated organ bath chamber containing 10 ml of physiological solution (Ringer), with the following composition (mmol/l): NaCl, 135; KCl, 5; MgCl₂, 1; CaCl₂, 2; NaHCO₃, 15; Na₂HPO₄, 1; glucose, 11. This solution was gassed with carbogen (95% O₂ and 5% CO₂) and kept at 35 ± 2 °C. The preparation was attached to an isometric force transducer (Grass, FT03) coupled to a signal amplifier (Gould Systems, 13-6615-50). The experiments were recorded using a computer-based data acquisition system (Gould Systems, Summit ACQuire and Summit DataViewer). Indirect contractions were evoked by supramaximal strength pulses (0.2 Hz; 0.5 ms; 3 V), delivered by an electronic stimulator (Grass S88K) and applied on the phrenic nerve by suction electrode. Direct

contractions were evoked by supramaximal pulses (0.2 Hz; 5 ms; 13 V) through a bipolar electrode positioned on opposite sides of the muscle. Experiments of direct contractions were performed in the presence of pancuronium bromide (2×10^{-6} M). The preparations were stabilized for at least 45 minutes before the toxin addition. The amplitudes of indirect and direct twitches were evaluated during 90 and 120 minutes respectively. The mean time required to reduce the twitches amplitude to 50% ($t_{1/2}$) was determined.

Results of myographic studies are expressed as mean \pm S.E. and were analyzed by Student's *t*-test. Values of $P < 0.05$ were considered significant.

Sequence alignment and phylogenetic analysis

Alignment of the selected sequences was performed by the program AMAP v. 2.0 [44]. The final alignment was used to construct a phylogenetic tree by Bayesian inference utilizing MrBayes v. 3.1.1 software [45]. Two concurrent MCMC runs of 500,000 generations were performed with four progressively heated chains, a temperature value of 0.2, tree sampling every 100 generations and a burn-in of 2500 trees. The phylogenetic tree and the lengths of its branches were visualized using the program Mesquite v.2.72 [46].

Results

Overall crystallographic structure of MjTX-I

The crystal structure of MjTX-I at 2.49 Å resolution revealed an asymmetric unit (AU) containing four monomers (identified as A, B, C, and D) and C2 space group with cell constants $a = 57.6$ Å, $b = 125.8$ Å, $c = 65.3$ Å, and $\beta = 106^\circ$. As shown in the Table 1, the refinement converged to a final R_{cryst} value of 25.13% ($R_{\text{free}} = 26.27\%$) for all data between 33.44 Å and 2.49 Å. In the final model are found 3544 non-hydrogen protein atoms, 113 water molecules and three polyethylene glycol (PEG) 4000 molecules. As in other Lys49-PLA₂s structures, two of them are close to His48 in monomers A and B, and the third PEG 4000 molecule is sited between the interface of the monomers A and B. MjTX-I is stabilized by seven disulfide bridges and preserves the classical secondary structure elements found in this group of proteins, i.e., a N-terminal α -helix, a “short” helix, a non-functional Ca²⁺-binding loop, two anti-parallel α -helices (2 and 3), two short strands of anti-parallel β -sheet (β -wing), and a C-terminal loop (Figure 1A). The general stereochemical quality of the final MjTX-I structure is also satisfactory, since the Ramachandran plots shows that 95.1% and 98.2% of the total number of amino acid residues are present in the favored and allowed ϕ/ψ angle combinations, respectively. The residues Pro90 (monomer A), Glu87, Pro123, Phe125 (monomer B), Leu55, Asp67, Lys116, Phe125 (monomer D) are found in the outlier regions of the Ramachandran plot, which corresponds to 1.8% of the total amino acid residues of the final model. These residues are sited in regions with high flexibility: C-termini (Lys116, Pro123 and Phe125) and loop segments (Leu55, Asp67, Glu87 and Pro90). The amino acid composition of the interfaces between the monomers A, B, C and D are shown as Supporting Information (Table S1).

A detailed analysis of the AU shows that the monomers are roughly disposed in a plane along the four β -wings, with the C-termini occupying external positions in relation to the protein core (Figure 1A). Interestingly, C $^\alpha$ pairwise structural superposition between these protomers indicates that the chain D is slightly distinct, with a root mean square deviation (r.m.s.d.) around 0.8 Å in relation to the other protomers (Table 2). The main structural

alterations contributing to this C $^\alpha$ atom deviation are concentrated in the β -wing region of the monomer D, which is part of the interface between the chains C and D (Figure 1B). This feature of the monomer D is probably related to the different contacts observed for the A/B and C/D monomeric pairs, according to the PDBe PISA server (pdbe.org/pisa). In fact, the A/B interface presents seven hydrogen bonds and four salt bridges, whereas the C/D interface is formed by four hydrogen bonds and three salt bridges, as indicated in the (Table S2). In spite of the distinct number of contacts at the interfaces of pairs of monomers, they are formed between the same amino acid residues (Table S2). In addition, there is a PEG 4000 molecule at the A/B interface region which forms hydrophobic interactions with the ligand and the monomers, increasing the number of contacts and compacting the A/B dimer. Moreover, the absence of the PEG 4000 molecule at the interface of the C/D apparently allows a little dislocation of the monomer D and a subsequent displacement of its β -wing region in comparison to the other monomers. Furthermore, the monomers form two “conventional” dimers, similar to the conventional dimeric structure suggested for Lys49-PLA₂s [13]. These dimers are linked by the interfaces A/B and C/D (Figure 2) presenting a large number of van der Waals contacts that contribute significantly for oligomeric stabilization (Table S1).

Structural comparison of MjTX-I with other Lys49-PLA₂s

Superposition between C $^\alpha$ atoms of the MjTX-I and protomers of several bothropic Lys49-PLA₂s deposited in PDB resulted in an r.m.s.d. of approximately 1 Å. The same superposition including non-bothropic venoms resulted in an r.m.s.d. of approximately 1.4 Å (Table 2). The superposition between protomers of MjTX-I, BnSP-7 from *Bothrops pauloensis* (PDB ID 1PA0), Myo-II from *Bothrops asper* (PDB ID 1CLP), BthTX-I from *Bothrops jararacussu* (PDB ID 3HZD), godMT-II from *Cerrophidion godmani* (PDB ID 1GOD) and Acl-K49 from *Agkistrodon contortrix laticinctus* (PDB ID 1S8H) shows that the deviations are concentrated in the Ca²⁺-binding loop (Tyr25-Arg34), loops Cys51-Lys69 and Cys84-Cys91 and in the C-terminal region (Lys115-Phe125) (Figure 1C). C $^\alpha$ atoms superposition of this region (C-termini) between BthTX-I protomers and other Lys49-PLA₂s resulted in an average r.m.s.d. of 1.7 Å whereas the same superposition for MjTX-I protomers resulted in an average r.m.s.d. of 2.3 Å (Table 3). These data show that the C-terminal regions of MjTX-I present a higher structural deviation compared to other Lys49-PLA₂ C-termini.

Dynamic light scattering and analytical size exclusion chromatography

Dynamic light scattering (DLS) experiments show MjTX-I to be predominantly monomeric when dissolved in ultra-pure water at 1.5 mg·ml⁻¹ concentration, since there is a unimodal molecular distribution (Pd = 16.5%) with an average molecular weight (MW) of around 19 KDa, as calculated from a hydrodynamic radius (R_H) value of 2.1 nm (Table 4). This result is based on the fact that the average MW of MjTX-I is approximately 14 KDa. On the other hand, the DLS measurements also indicated molecular aggregation after a gradual increase in the concentration of the Tris-HCl (the same buffer used for crystallization) and two hours of incubation (Table 4). After the incubation, MjTX-I appears to assume a dimeric form at 0.5, 2.0, and 10.0 mM Tris-HCl concentration ($R_H = 2.7$ – 2.8 nm; average MW \approx 33–37 KDa), whereas at 20 mM Tris-HCl the main form of the protein is probably tetrameric ($R_H = 3.7$ nm; average MW \approx 70 nm). Additionally, it is interesting to highlight the Tris-HCl incubated solutions present higher polydispersity percentage compared to the other samples (water or not incubated Tris-HCl conditions),

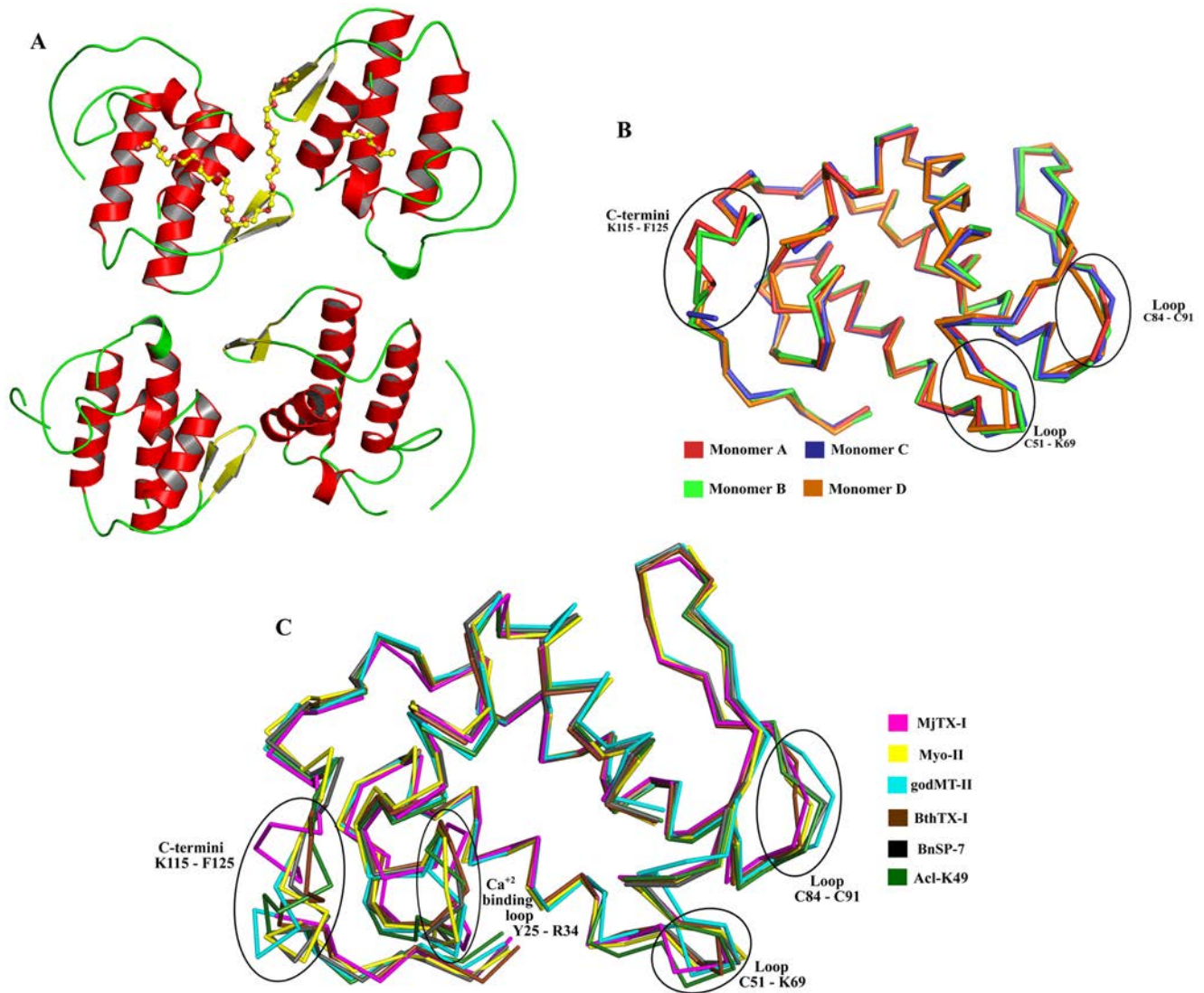


Figure 1. Overall crystallographic structure of MjTX-I. (A) Cartoon representation of MjTX-I structure. PEG4000 molecules are shown in sticks. (B) C^α superposition of monomers A (red), B (light green), C (blue) and D (orange) of MjTX-I structure highlighting the most important structural deviations between them. (C) C^α superposition of monomers A of MjTX-I (magenta), BnSP-7 (PDB ID 1PA0) (black) and Myo-II (PDB ID 1CLP) (yellow), monomer B of BthTX-I (PDB ID 3HZD) (brown) and overall structure of godMT-II (PDB ID 1GOD) (cyan) and Acl-K49 (PDB ID 1S8H) (dark green). doi:10.1371/journal.pone.0060610.g001

indicating the formation of multi-oligomeric assemblies of the toxin.

Analytical size exclusion chromatography experiment showed a broad curve of absorbance during the elution of the MjTX-I sample (Figure 3A), confirming the formation of several oligomeric

species at 20 mM Tris-HCl concentration and pH 8.0. Based on a calibration curve determined using standard proteins, it is also possible to attest the occurrence of monomers, dimers and tetramers in the eluted solution (Figure 3B).

Table 2. Superposition between protomers of MjTX-I, BthTX-I (PDB ID 3HZD), BnSP-7 (PDB ID 1PA0), godMT-II (PDB ID 1GOD), Acl-K49 (PDB ID 1S8H) and Myo-II (PDB ID 1CLP) (r.m.s. deviation (Å) of C^α atoms).

	MjTX-I A	MjTX-I B	MjTX-I C	MjTX-I D	BthTX-I A	BthTX-I B	BnSP-7 A	BnSP-7 B	godMT-II A	Acl-K49 A	Myo-II A	Myo-II B
MjTX-I A	–	0.8	0.6	0.8	1.0	1.2	1.2	1.2	1.4	1.4	1.5	1.5
B	–	–	0.5	0.8	0.7	1.1	1.2	0.9	1.5	1.3	1.5	1.5
C	–	–	–	0.8	0.8	0.9	1.0	0.9	1.4	1.2	1.4	1.4
D	–	–	–	–	1.0	1.1	1.2	1.0	1.5	1.3	1.2	1.5

doi:10.1371/journal.pone.0060610.t002

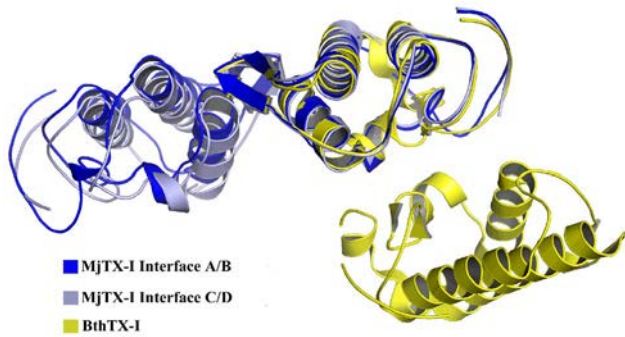


Figure 2. Two possible dimeric conformations for Lys49-PLA₂s structures. The alternative dimer formed by dimer of BthTX-I chemically modified by *p*-bromophenacyl bromide (yellow) (PDB ID 3HZW) and the conventional dimer formed by interfaces of the monomers A/B (blue) and C/D (gray) in MjTX-I crystal structure. doi:10.1371/journal.pone.0060610.g002

Small angle X-ray scattering

Radius of gyration (R_g) and molecular mass calculated for the main species in each SAXS experiment were 1.67 ± 0.50 nm and 18 ± 3 kDa in ultra-pure water and 2.62 ± 0.30 nm and 43 ± 6 kDa in the presence of 20 mM Tris-HCl pH 8.0, respectively, underlining the significant influence of the physical-chemical environment on the oligomerization of this protein (Figure 4). It is important to observe that high-order aggregates produce noticeable scattering intensity only to very small angle around the direct X-ray beam, consequently they cannot be detected [47].

The presence of a shoulder in the $p(r)$ curve obtained with MjTX-I in the buffered solution indicates a correlation distance within the structure which is a signature of dimeric structures. Monomeric and dimeric structures provided a very good fit for the sample in water and in buffered solution, respectively (Figure 4), supporting the monomer-dimer conversion caused by the buffer addition. In Figure 4, panels C and D present the superposition of the *ab initio* model obtained from the SAXS data and the conventional and alternative dimers [16]. The best agreement is between the *ab initio* model and the conventional dimer, whereas the superposition for the alternative dimer is unsatisfactory. Also, the alternative dimeric form provides a poor fitting of the scattering data (data not shown). Therefore, these results support the conclusion that MjTX-I does not form dimers with the alternative conformation in our experiments.

Table 3. Superposition between C-terminal segments (K115-F125) of MjTX-I, BthTX-I (PDB ID 3HZD), BnSP-7 (PDB ID 1PA0), godMT-II (PDB ID 1GOD), Acl-K49 (PDB ID 1S8H) and Myo-II (PDB ID 1CLP) (r.m.s. deviation (Å) of C $^{\alpha}$ atoms).

	BnSP-7 A	BnSP-7 B	godMT-II A	Acl-K49 A	Myo-II A	Myo-II B
BthTX-I A	2.8	0.4	2.6	2.4	2.6	2.8
B	0.2	2.7	0.9	1.7	0.8	0.8
MjTX-I A	2.9	2.2	2.9	2.7	3.0	3.0
B	2.7	1.3	2.6	1.9	2.5	2.7
C	2.3	1.2	2.2	1.1	2.6	2.0
D	2.7	1.5	2.7	0.7	3.0	3.1

doi:10.1371/journal.pone.0060610.t003

Myographic studies

MjTX-I induced a time- and concentration-dependent inhibition of the indirectly evoked twitches in mice phrenic diaphragm preparation (Figure 5A). At 1 μ M, the toxin slightly reduced the amplitude of twitches in about 15% after 90 minutes, while at 5 μ M the twitches were nearly abolished. At this same concentration (5 μ M), MjTX-I also depressed directly evoked twitches in about 80% (Figure 5B). The $t_{1/2}$ of indirectly and directly evoked twitches were not significantly different (29.6 ± 1.7 minutes; $n = 3$ vs. 39.5 ± 5.3 minutes; $n = 4$).

Discussion

MjTX-I may adopt different oligomeric conformations in solution

Oligomerization is a common physical property of proteins and represents a recurring theme in biological systems [48,49]. To date, bothropic Lys49-PLA₂s have been reported in monomeric or dimeric forms in the PDB and structural studies have demonstrated the importance of the dimeric form to expression of their myotoxic activity [16]. In addition, results obtained from bioinformatics tools demonstrated that all bothropic Lys49-PLA₂s reported as monomeric in the crystal structures are probably dimeric in solution [10,17]. In the light of the novel crystallographic assembly obtained for MjTX-I, several other experimental and theoretical techniques were employed to evaluate its biological significance. Initially, the PDBe PISA program [50] was not able to identify any quaternary association that might be stable in solution. According to this theoretical analysis, no quaternary assembly found in the MjTX-I crystal structure reflects the functional unit of the toxin and, consequently, only the monomeric form must be considered as the feasible biological entity. Despite the absence of oligomerization according to the PDBe PISA Complexation Significance Score (CSS), this program was able to identify important interactions between the A/B and C/D interfaces (Table S2). Then, it seems reasonable to assume that the molecular arrangement which defines the AU is not a simple crystallization artifact. This supposition is well supported by the great number of dimeric Lys49-PLA₂s deposited in the PDB in comparison to the number of monomeric ones [10,16,23].

Table 4. Hydrodynamic radius, polydispersity percentage and mass obtained by dynamic light scattering (DLS) experiments.

	R (nm)	MW (kDa)	% Pd	% Mass
Water	2,1	19	16,5	99,6
0,5 mM	2,1	19	19,3	99,4
0,5 mM*	2,7	33	37,6	99,8
2,0 mM	1,9	15	17,6	99,8
2,0 mM*	2,8	37	32,3	99,3
10 mM	1,9	15	15,8	99,8
10 mM*	2,8	37	28,6	99,8
20 mM	3,7	71	25,3	97,6

*After two hours of TrisHCl addition

The percent mass represents the amount of mass of the molecule with the hydrodynamic radius obtained. Measurements were carried out with the protein dissolved in ultra-pure water or in different Tris-HCl pH 8.0 concentrations (0.5, 2.0, 5.0, 10.0, and 20.0 mM). In the case of the solutions containing buffer, the data were obtained immediately after the Tris-HCl pH 8.0 addition and two hours later.

doi:10.1371/journal.pone.0060610.t004

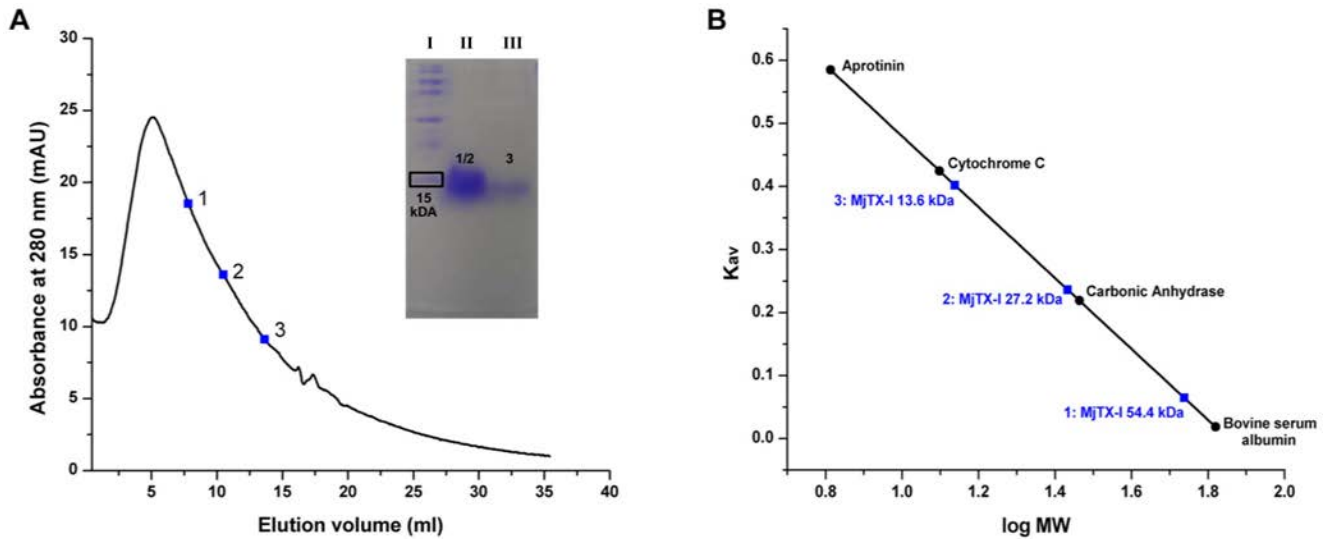


Figure 3. Analytical size-exclusion chromatography experiments for MjTX-I. (A) The inset shows the 13% SDS-PAGE of MjTX-I collected in different positions of the obtained peak. Lane I: unstained SDS-PAGE Standard from Bio-Rad Laboratories, Inc.; Lane II: MjTX-I collected at the elution volumes correspondent to points 1 and 2 in the chromatogram; Lane III: MjTX-I collected at the elution volume correspondent to point 3 in the chromatogram. (B) Calibration curve obtained using standard proteins shows the different oligomeric assemblies of MjTX-I in 20 mM Tris-HCl pH 8.0. The protein standards were obtained from a low molecular weight gel filtration calibration kit (Sigma-Aldrich) containing: blue dextran (2000 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), cytochrome C (12.4 kDa) and aprotinin (6.5 kDa). doi:10.1371/journal.pone.0060610.g003

Dynamic light scattering (DLS) experiments show that MjTX-I is predominantly monomeric when dissolved in ultra-pure water, but after the addition and gradual increase of the Tris-HCl concentration, a molecular aggregation process occurs, indicating that MjTX-I may assume a dimeric or tetrameric conformation and even high-order aggregates (as demonstrated by the high polydispersity percentage and mass percentage <99% after two hours of incubation of 10 mM Tris-HCl). Thus, considering the Tris-HCl concentration at crystallization condition (100 mM) and the similar pH values in these experiments (8.0 and 8.5, respectively, in crystallization and DLS conditions), the structural arrangement of the four monomers found in the AU could reflect a possible MjTX-I physiologically relevant assembly. In agreement

with the DLS results, the SAXS data also showed that MjTX-I oligomerizes in buffered solution. Further, the analytical size exclusion chromatography experiment (Figure 3) confirmed that MjTX-I has a remarkable tendency to oligomerization, confirming the formation of several oligomeric species at 20 mM Tris-HCl concentration and pH 8.0. Indeed, it was reported based on gel filtration experiments that this toxin presents a different proportion of oligomeric forms [25].

It has been observed that in several oligomeric proteins the frequency of charged and polar residues at the oligomeric interfaces is higher compared to their core regions, while hydrophobic residues are less frequent at the interfaces [51,52,53]. As shown in Table S1, eight polar or charged residues

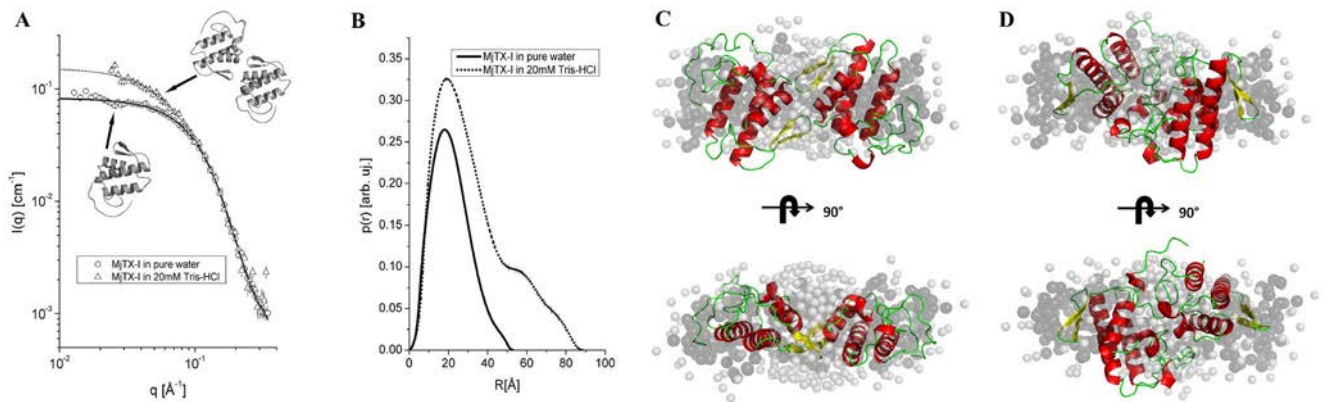


Figure 4. Small angle X-ray scattering experiments for MjTX-I. (A) Theoretical curve for monomeric state (continuous) corresponding to experimental SAXS data (circles), and theoretical curve for dimeric state (dashed) corresponding to experimental SAXS data (triangles). The theoretical curves were calculated by the program CRYSOLOG using the atomic resolution coordinates from the structures of the monomer and dimer respectively. (B) Pair distance distribution curve $p(r)$ calculated using the IFT procedure. (C) Conventional dimer (in cartoon) superposed on the SAXS *ab initio* dummy chain model (gray transparent surface) and after 90° rotation (D). Alternative dimer (in cartoon) superposed on the SAXS *ab initio* dummy chain model and shown after 90° rotation. doi:10.1371/journal.pone.0060610.g004

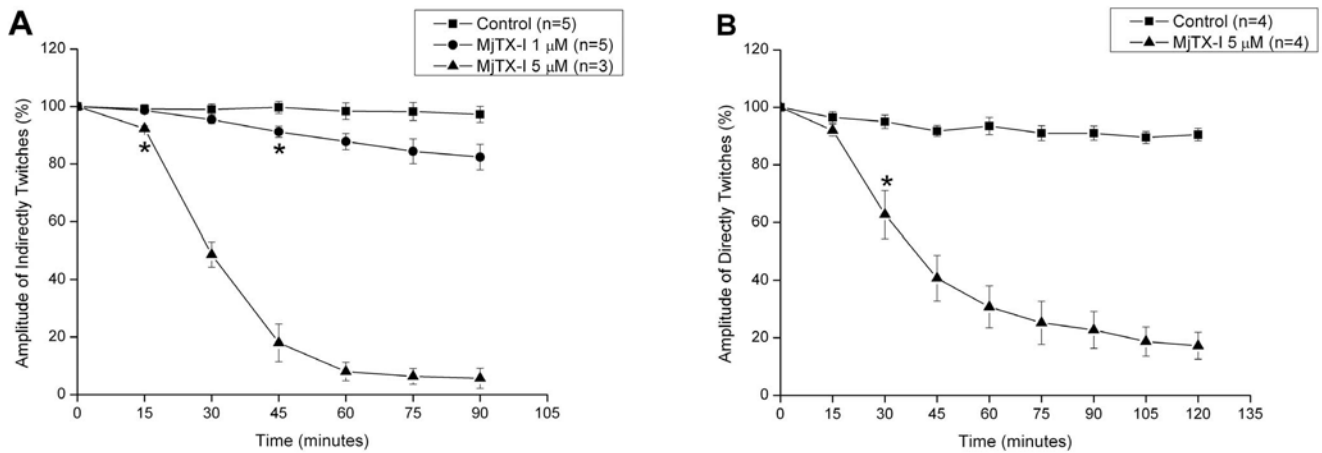


Figure 5. Effects of MjTX-I on indirectly (A) and directly (B) evoked twitches on isolated mouse preparations. Neuromuscular blockade was produced by 1 μ M (A) and 5 μ M (A, B) of MjTX-I in comparison to control. The ordinate represents the % amplitude of twitches relative to the initial amplitude. The abscissa indicates the time (min) after the addition of MjTX-I to the organ bath. Vertical bars represent mean \pm SEM. * indicates the point from which there are significant differences relative to control ($p < 0.05$). doi:10.1371/journal.pone.0060610.g005

(~29%) of interdimeric interfaces (A/C, B/D and A/D) are exclusively found in MjTX-I sequence. Remarkably, at least one of these residues are involved in 50% of van der Waals contacts between the interdimeric interfaces, highlighting the important role of the exclusive MjTX-I residues in the formation of the tetrameric oligomeric assembly not observed in any other Lys49-PLA₂s.

In conclusion, we can state that this protein may adopt different oligomeric under conditions close physiological.

MjTX-I biological oligomeric conformation and structural evidences for its lower myotoxic activity

In contrast with recently propositions supporting the alternative dimer [15,17,18], our crystallographic and SAXS analyses indicated that the probable dimeric conformation of MjTX-I in

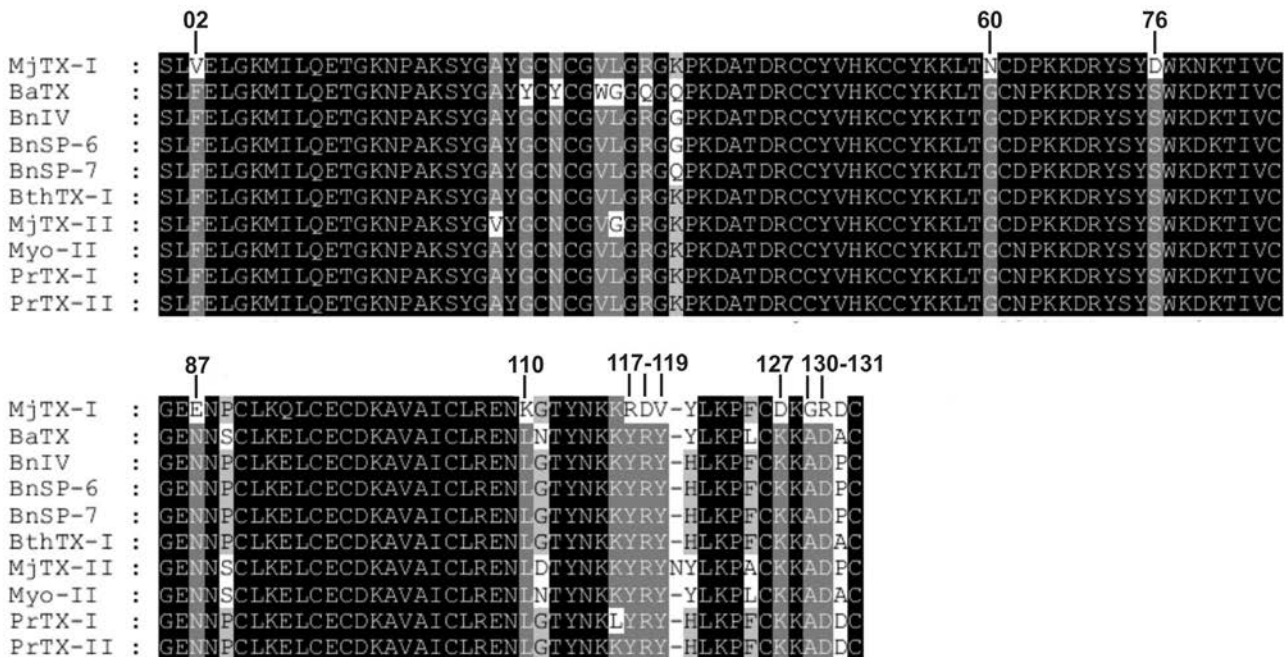


Figure 6. Amino acid alignment of Lys49-PLA₂s from venom of *Bothrops* genus. The numbers upside of the alignment correspond to residues that are exclusively from MjTX-I. **BaTX**: Lys49-PLA₂ from *Bothrops alternatus* venom (NCBI GI: 292630846); **BnIV**: Lys49-PLA₂ from *Bothrops pauloensis* venom (NCBI GI: 333361256); **BnSP-6**: Lys49-PLA₂ from *Bothrops pauloensis* venom (NCBI GI:49258448); **BnSP-7**: Lys49-PLA₂ from *Bothrops pauloensis* venom (NCBI GI: 239938675); **BthTX-I**: Bothroptoxin-I from *Bothrops jararacussu* venom (NCBI GI: 51890398); **MjTX-I**: Myotoxin-I from *Bothrops moojeni* venom (NCBI GI: 17368325); **MjTX-II**: Myotoxin-II from *Bothrops moojeni* venom (NCBI GI: 62738542); **Myo-II**: Myotoxin-II from *Bothrops asper* venom (BaspTX-II) (NCBI GI: 166215047); **PrTX-I**: Piratoxin-I from *Bothrops pirajai* venom (NCBI GI: 17433154); **PrTX-II**: Piratoxin-II from *Bothrops pirajai* venom (NCBI GI: 17368328). The *Bothrops pauloensis* species was recently reclassified as *Bothropoides pauloensis* [64]. doi:10.1371/journal.pone.0060610.g006

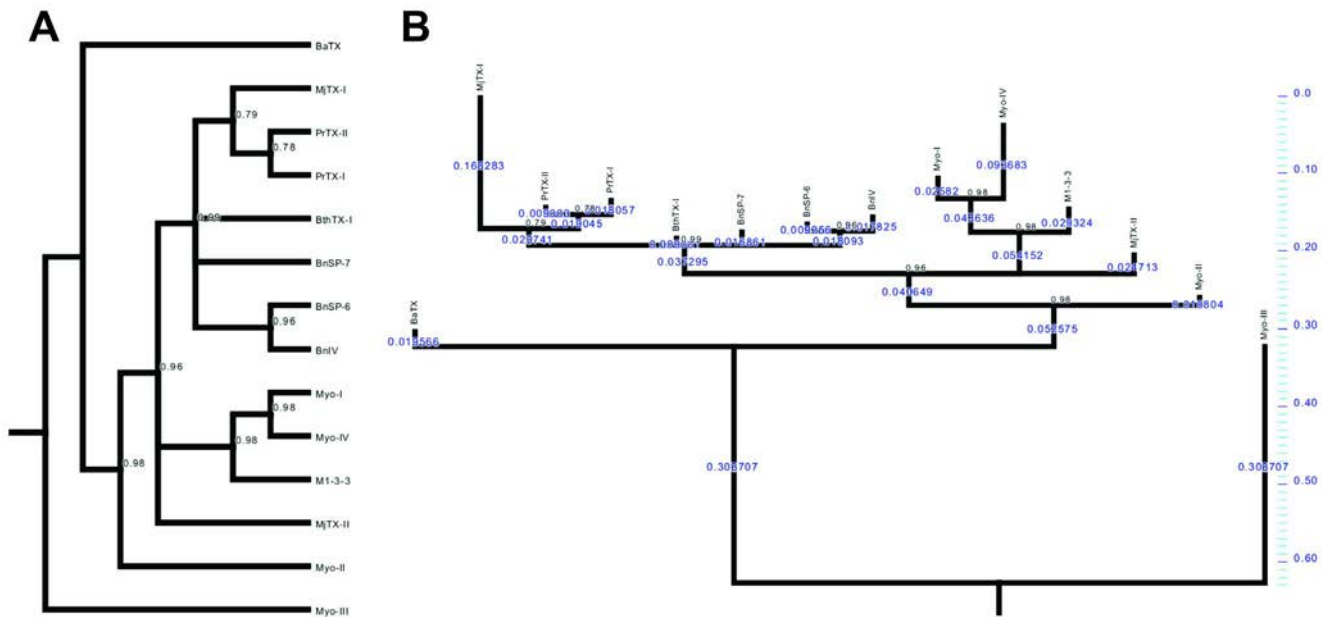


Figure 7. Phylogenetic tree of bothropic Lys49-PLA₂s visualized in square form (A) and computed branch lengths (in blue) (B). Posterior probability values after 1,000,000 cycles are indicated in internodes. Internodes with a posterior probability value less than 0.75 were collapsed. Minimum e-value is 3.10^{-47} . The sequences used to perform this phylogenetic tree are the same sequences used in amino acid alignment of Lys49-PLA₂s (see the legend for Figure 6) and **M1-3-3**: Lys49-PLA₂ from *Bothrops asper* venom (NCBI GI: 6492260); **Myo-I**: Myotoxin-I from *Bothrops atrox* venom (NCBI GI: 82201805); **Myo-IV**: Myotoxin IV from *Bothrops asper* venom (NCBI GI: 166216293). Outgroup: **Myo-III**: Asp49-PLA₂ Myotoxin III from *Bothrops asper* venom (NCBI GI: 166214965). doi:10.1371/journal.pone.0060610.g007

solution is similar to the conventional oligomeric form [13,21]. The crystal structure is formed by two conventional dimers and the comparison between the experimental data and the theoretical scattering curves of SAXS experiments indicate that the conventional dimer is the predominant configuration found in solution (Figure 4). Additionally, an analysis of the sequence alignment of MjTX-I with other bothropic Lys49-PLA₂s (Figure 6) also supports the results obtained by SAXS and crystallography techniques. MjTX-I has a Tyr→Val mutation at position 119 compared to other bothropic Lys49-PLA₂s, which is essential for the stabilization of the alternative dimer configuration and for their myotoxic activity. Tyr119 residues from both chains form a hydrogen bond when a ligand is present at their hydrophobic channels or His48 region, inducing the correct structural arrangement of the myotoxic site via C-termini organization [18,54]. In the alternative conformation both C-terminal regions lie in close proximity and form the proposed myotoxic site [18], while in the conventional dimer the C-termini are in opposite sides of the dimers [13]. Furthermore, MjTX-I crystallographic structure presents a higher deviation of C-terminal region in comparison with other Lys49-PLA₂s (Table 3) and the sequence of this region shows only partial conservation, with the occurrence of other mutations in addition to the Tyr119→Val cited above (e.g. Tyr117→Arg, Lys127→Asp and Asp130→Arg - Figure 6). These mutations may also affect the muscle damage activity due to the change of conserved residues to other with very distinct physical-chemical properties. Indeed, site-directed mutagenesis studies showed that these C-terminal residues play an important role in the myotoxic activity of the Lys49-PLA₂s [20,24].

All these structural data are in agreement with functional data obtained by us and also described in previous studies [27]. In our functional studies, isolated neuromuscular preparations have been used for discrimination between neurotoxic and myotoxic effects

of snake venoms or isolated toxins [55,56]. While neurotoxicity causes only the loss of the indirect twitches, myotoxicity induces depression of both direct and indirect twitches [54]. Thus, the observation that MjTX-I simultaneously depressed both indirectly and directly evoked twitches in phrenic–diaphragm preparation may be taken as an indicative of the myotoxic effect of this protein. Similar results, i.e. the blockage of indirect and direct twitches, were previously described for BthTX-I [57]. However, the myotoxic effect of MjTX-I is significantly weaker in comparison to other bothropic Lys49-PLA₂s [58]. While the blockage of the indirect twitches induced by MjTX-I (1 μM) did not reach 50% in 90 minutes, the reported $t_{1/2}$ for BthTX-I, PrTX-I from *Bothrops pirajai* and MjTX-II from *Bothrops moojeni* under the same experimental conditions were 40.3 ± 3.5 min, $n=8$; 49.0 ± 6.9 min, $n=6$ and 35.2 ± 2.0 min, $n=8$, respectively [58].

Based on our functional and structural data we suggest that the lower myotoxicity activity of MjTX-I in comparison to other Lys49-PLA₂s is associated with its oligomeric conformation (conventional dimer) and also due to its capacity to adopt different oligomeric conformations depending on the physical-chemical environment. These data corroborate previous results which demonstrated that decrease in myotoxicity is associated with the formation of high molecular weight complexes [25].

MjTX-I evolutionary aspects

The results presented above strongly suggest that MjTX-I is a unique Lys49-PLA₂, which is able to adopt a different dimeric conformation compared to other Lys49-PLA₂s and even a tetrameric assembly formed by the association of two dimers. In the light of this variability in oligomeric structure inherent to MjTX-I, it is possible to raise interesting questions on the evolution and biological functions of this toxin. As previously mentioned, MjTX-I has lower myotoxic activity compared to

other Lys49-PLA₂s probably due to: i) high structural deviation and mutation of some residues in the C-terminal region; ii) formation of multi-oligomeric assemblies; and iii) formation of conventional dimer. In order to examine these hypotheses from an evolutionary perspective, we performed a Bayesian phylogenetic analysis using bothropic Lys49-PLA₂s amino acid sequences deposited in the NCBI protein database (Figure 7). As observed previously, the bothropic Lys49-PLA₂s nest in a clade [59]. Despite its peculiar characteristics, MjTX-I is the sister group of PrTX-I and PrTX-II, proteins that present an alternative dimeric conformation (Figure 7). However, analyzing this phylogenetic tree considering the evolutionary distances of the Lys49-PLA₂s to their common ancestor, MjTX-I presents the largest branch length of the tree, accumulating more sequence differences from the common ancestor. This evolutionary feature could reflect the peculiar oligomeric characteristics of MjTX-I and may be a product of the accelerated evolution of these enzymes [60].

The oligomerization of multiple, identical subunits is a simple way of forming large, functional structures in a genetically economical manner [61]. In terms of venom evolution, the core set of venom genes found in the common ancestor of toxicoferans have evolved to form the more complex reptile venoms, improved posteriorly by toxin recruitment and neofunctionalisation events, including the assembling of covalently or non-covalently-linked multi-unit toxins [62,63]. In this regard, it is reasonable to suppose that oligomeric forms of MjTX-I can be associated to the emergence of new functionalities. Hence, the oligomeric conformation of MjTX-I may reflect an intermediate molecular state of this protein in a continuous evolutionary process that may be a response to environmental variation and adaptation to new preys.

Conclusion

MjTX-I may adopt different oligomeric conformations depending on the physical-chemical environment as demonstrated by different techniques. Basically, this protein adopts the form of one or two dimers in the conventional configuration. Consequently, it is likely that the oligomerization states presented by MjTX-I in

comparison to other Lys49-PLA₂s could be intrinsically related to its biological functions. In evolutionary terms, the oligomeric forms of MjTX-I may be also associated to the emergence of new functionalities, since these assemblies are associated with reduced myotoxic activity. Finally, this study presents a toxin with novel functional/structural and evolutionary characteristics which can contribute for a more complete understanding of Lys49-PLA₂s and development of structure-based drugs and other biotechnological products.

Atomic coordinates

The MjTX-I coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank with identification code 3TOR

Supporting Information

Table S1 Interfacial residues of the MjTX-I crystal structure.

(DOC)

Table S2 Interfacial salt bridges and hydrogen bonds of the MjTX-I crystal structure.

(DOC)

Acknowledgments

We acknowledge the use of the Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Brazil).

Author Contributions

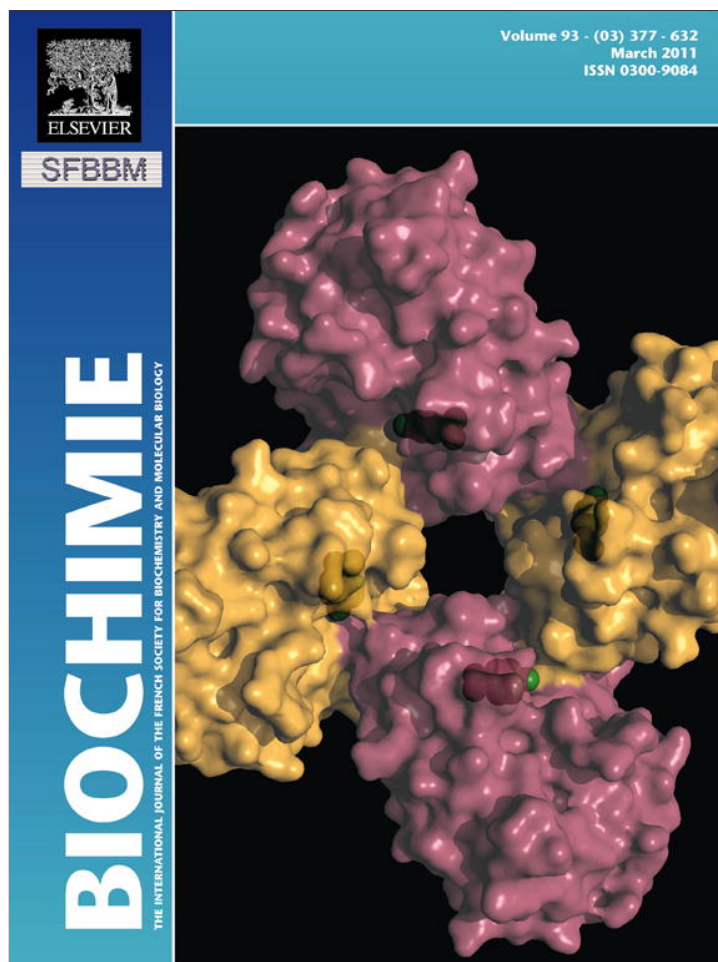
Supervision of the myographic studies: MG. Supervision of the protein purification: AMS. Supervision of the SAXS experiments: CLPO. Supervision of the entire project: MRMF. Conceived and designed the experiments: CAHF AJM WLG MG AMS CLPO MRMF. Performed the experiments: GHMS CAHF DPMS WLG RMF. Analyzed the data: GHMS CAHF AJM WLG CLPO MRMF. Contributed reagents/materials/analysis tools: MG AMS CLPO MRMF. Wrote the paper: CAHF AJM WLG CLPO MRMF.

References

- Uetz P (2012) The Reptile Database.
- Williams D, Gutierrez JM, Harrison R, Warrell DA, White J, et al. (2010) The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. *Lancet* 375: 89-91.
- Kasturiratne A, Wickremasinghe AR, de Silva N, Gunawardena NK, Pathmeswaran A, et al. (2008) The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths. *Plos Medicine* 5: 1591-1604.
- Harrison RA, Hargreaves A, Wagstaff SC, Faragher B, Laloo DG (2009) Snake envenoming: a disease of poverty. *PLoS Negl Trop Dis* 3: e569.
- Gutierrez JM, Lomonte B (1995) Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* 33: 1405-1424.
- de Oliveira RCW (2009) Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Envenenamentos. São Paulo: Sarvier.
- Saúde Fnd (2001) Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. Brasília: MS/FUNASA.
- Schaloske RH, Dennis EA (2006) The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta* 1761: 1246-1259.
- Holland DR, Clancy LL, Muchmore SW, Ryde TJ, Einspahr HM, et al. (1990) The Crystal-Structure of a Lysine-49 Phospholipase-A₂ from the Venom of the Cottonmouth Snake at 2.0 Å Resolution. *Journal of Biological Chemistry* 265: 17649-17656.
- Fernandes CA, Marchi-Salvador DP, Salvador GM, Silva MC, Costa TR, et al. (2010) Comparison between apo and complexed structures of bothropstoxin-I reveals the role of Lys122 and Ca²⁺-binding loop region for the catalytically inactive Lys49-PLA₂s. *Journal of Structural Biology*.
- da Silva Giotto MT, Garratt RC, Oliva G, Mascarenhas YP, Giglio JR, et al. (1998) Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: conformational changes in bothropstoxin I, a dimeric Lys49-phospholipase A₂ homologue. *Proteins* 30: 442-454.
- Arni RK, Fontes MR, Barberato C, Gutierrez JM, Diaz C, et al. (1999) Crystal structure of myotoxin II, a monomeric Lys49-phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of *Cerrophidion (Bothrops) godmani*. *Arch Biochem Biophys* 366: 177-182.
- Arni RK, Ward RJ (1996) Phospholipase A₂-a structural review. *Toxicon* 34: 827-841.
- Magro AJ, Soares AM, Giglio JR, Fontes MR (2003) Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A₂: quaternary structure and inhibition mechanism insights. *Biochem Biophys Res Commun* 311: 713-720.
- Murakami MT, Arruda EZ, Melo PA, Martinez AB, Calil-Elias S, et al. (2005) Inhibition of myotoxic activity of *Bothrops asper* myotoxin II by the anti-trypansomal drug suramin. *J Mol Biol* 350: 416-426.
- dos Santos JI, Fernandes CA, Magro AJ, Fontes MR (2009) The intriguing phospholipases A₂ homologues: relevant structural features on myotoxicity and catalytic inactivity. *Protein Pept Lett* 16: 887-893.
- Murakami MT, Vicoti MM, Abrego JR, Lourenzoni MR, Cintra AC, et al. (2007) Interfacial surface charge and free accessibility to the PLA₂-active site-like region are essential requirements for the activity of Lys49 PLA₂ homologues. *Toxicon* 49: 378-387.
- dos Santos JI, Soares AM, Fontes MR (2009) Comparative structural studies on Lys49-phospholipases A₂ from *Bothrops* genus reveal their myotoxic site. *Journal of Structural Biology* 167: 106-116.
- Nunez CE, Angulo Y, Lomonte B (2001) Identification of the myotoxic site of the Lys49 phospholipase A₂ from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* snake venom: synthetic C-terminal peptides from Lys49, but not from Asp49 myotoxins, exert membrane-damaging activities. *Toxicon* 39: 1587-1594.
- Chioato L, De Oliveira AH, Ruller R, Sa JM, Ward RJ (2002) Distinct sites for myotoxic and membrane-damaging activities in the C-terminal region of a Lys49-phospholipase A₂. *Biochemical Journal* 366: 971-976.
- Ward RJ, Chioato L, de Oliveira AH, Ruller R, Sa JM (2002) Active-site mutagenesis of a Lys49-phospholipase A₂: biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis. *Biochemical Journal* 362: 89-96.

22. Lomonte B, Angulo Y, Santamaria C (2003) Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115-129 in Lys49 myotoxic phospholipases A₂ from snake venoms. *Toxicon* 42: 307-312.
23. Ambrosio AL, Nonato MC, de Araujo HS, Arni R, Ward RJ, et al. (2005) A molecular mechanism for Lys49-phospholipase A₂ activity based on ligand-induced conformational change. *J Biol Chem* 280: 7326-7335.
24. Chioato L, Aragao EA, Lopes Ferreira T, Medeiros AI, Faccioli LH, et al. (2007) Mapping of the structural determinants of artificial and biological membrane damaging activities of a Lys49 phospholipase A₂ by scanning alanine mutagenesis. *Biochim Biophys Acta* 1768: 1247-1257.
25. Soares AM, Andriao-Escarso SH, Angulo Y, Lomonte B, Gutierrez JM, et al. (2000) Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops moojeni* (Caissaca) snake venom. *Arch Biochem Biophys* 373: 7-15.
26. Marchi-Salvador DP, Silveira LB, Soares AM, Fontes MR (2005) Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of myotoxin I, a Lys49-phospholipase A₂ from *Bothrops moojeni*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 61: 882-884.
27. Andriao-Escarso SH, Soares AM, Rodrigues VM, Angulo Y, Diaz C, et al. (2000) Myotoxic phospholipases A₂ in *bothrops* snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. *Biochimie* 82: 755-763.
28. Soares AM, Rodrigues VM, Homsí-Brandeburgo MI, Toyama MH, Lombardi FR, et al. (1998) 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* 36: 503-514.
29. Jancarik J, Kim SH (1991) Sparse-Matrix Sampling - a Screening Method for Crystallization of Proteins. *Journal of Applied Crystallography* 24: 409-411.
30. McPHERSON A (1989) Crystallization of biological macromolecules. Malabar: Krieger Publishing Company .
31. Otwinowski Z, Minor W (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Macromolecular Crystallography, Pt A* 276: 307-326.
32. Vagin A, Teplyakov A (1997) MOLREP: an automated program for molecular replacement. *Journal of Applied Crystallography* 30: 1022-1025.
33. Potterton E, Briggs P, Turkenburg M, Dodson E (2003) A graphical user interface to the CCP4 program suite. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59: 1131-1137.
34. Lee WH, da Silva Giotto MT, Marangoni S, Toyama MH, Polikarpov I, et al. (2001) Structural basis for low catalytic activity in Lys49 phospholipases A₂-a hypothesis: the crystal structure of piratoxin II complexed to fatty acid. *Biochemistry* 40: 28-36.
35. Brunger AT, Adams PD, Clore GM, DeLano WL, Gros P, et al. (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54: 905-921.
36. Emsley P, Cowtan K (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60: 2126-2132.
37. Chen VB, Arendall WB 3rd, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, et al. (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66: 12-21.
38. Mihel J, Sikić M, Tomić S, Jeren B, Vlahovick K (2008) PSAIA - protein structure and interaction analyzer. *BMC Struct Biol* 8: 21.
39. DeLano WS (2002) The PyMOL Molecular Graphics System. San Carlos: Delano Scientific.
40. Glatter O (1977) Data Evaluation in Small-Angle Scattering - Calculation of Radial Electron-Density Distribution by Means of Indirect Fourier Transformation. *Acta Physica Austriaca* 47: 83-102.
41. Oliveira CL, Behrens MA, Pedersen JS, Erlacher K, Otzen D (2009) A SAXS study of glucagon fibrillation. *J Mol Biol* 387: 147-161.
42. Svergun D, Barberato C, Koch MHJ (1995) CRYSOLE - A program to evaluate x-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *Journal of Applied Crystallography* 28: 768-773.
43. Svergun DI, Petoukhov MV, Koch MH (2001) Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering. *Biophys J* 80: 2946-2953.
44. Schwartz AS, Pachter L (2007) Multiple alignment by sequence annealing. *Bioinformatics* 23: e24-29.
45. Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755.
46. Maddison WP, Maddison DR (2011) Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.72 ed.
47. Craievich A (2005) Small-angle X-ray scattering by nanostructured materials, Chapter 8, *Handbook of Sol-Gel Science and Technology*. New York: Kluwer Academic Publishers.
48. Goodsell DS, Olson AJ (2000) Structural symmetry and protein function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29: 105-153.
49. Marianayagam NJ, Sunde M, Matthews JM (2004) The power of two: protein dimerization in biology. *Trends in Biochemical Sciences* 29: 618-625.
50. Krissinel E, Henrick K (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol* 372: 774-797.
51. Janin J, Miller S, Chothia C (1988) Surface, subunit interfaces and interior of oligomeric proteins. *J Mol Biol* 204: 155-164.
52. Tsai CJ, Lin SL, Wolfson HJ, Nussinov R (1997) Studies of protein-protein interfaces: a statistical analysis of the hydrophobic effect. *Protein Sci* 6: 53-64.
53. D'Alessio G (1999) The evolutionary transition from monomeric to oligomeric proteins: tools, the environment, hypotheses. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 72: 271-298.
54. Marchi-Salvador DP, Fernandes CA, Silveira LB, Soares AM, Fontes MR (2009) Crystal structure of a phospholipase A₂ homologue complexed with p-bromophenacyl bromide reveals important structural changes associated with the inhibition of myotoxic activity. *Biochim Biophys Acta* 1794: 1583-1590.
55. Harvey AL, Barfaraz A, Thomson E, Faiz A, Preston S, et al. (1994) Screening of snake venoms for neurotoxic and myotoxic effects using simple in vitro preparations from rodents and chicks. *Toxicon* 32: 257-265.
56. Gallacci M, Cavalcante WL (2010) Understanding the in vitro neuromuscular activity of snake venom Lys49 phospholipase A₂ homologues. *Toxicon* 55: 1-11.
57. Gallacci M, Oliveira M, Dal Pai-Silva M, Cavalcante WL, Spencer PJ (2006) Paralyzing and myotoxic effects of a recombinant bothropstoxin-I (BthTX-I) on mouse neuromuscular preparations. *Exp Toxicol Pathol* 57: 239-245.
58. Cavalcante WL, Campos TO, Dal Pai-Silva M, Pereira PS, Oliveira CZ, et al. (2007) Neutralization of snake venom phospholipase A₂ toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. *J Ethnopharmacol* 112: 490-497.
59. dos Santos JI, Cintra-Francischinelli M, Borges RJ, Fernandes CA, Pizzo P, et al. (2011) Structural, functional, and bioinformatics studies reveal a new snake venom homologue phospholipase A₂ class. *Proteins* 79: 61-78.
60. Ogawa T, Nakashima K, Nobuhisa I, Deshimaru M, Shimohigashi Y, et al. (1996) Accelerated evolution of snake venom phospholipase A₂ isozymes for acquisition of diverse physiological functions. *Toxicon* 34: 1229-1236.
61. Pereira-Leal JB, Levy ED, Kamp C, Teichmann SA (2007) Evolution of protein complexes by duplication of homomeric interactions. *Genome Biol* 8: R51.
62. Fry BG, Vidal N, van der Weerd L, Kochva E, Renjifo C (2009) Evolution and diversification of the Toxicofera reptile venom system. *Journal of Proteomics* 72: 127-136.
63. Fry BG (2005) From genome to "venome": Molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. *Genome Research* 15: 403-420.
64. Fenwick AM, Gutberlet RL, Evans JA, Parkinson CL (2009) Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothropsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 156: 617-640.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Research paper

Molecular cloning and biochemical characterization of a myotoxin inhibitor from *Bothrops alternatus* snake plasma

Norival A. Santos-Filho^{a,b,*}, Carlos A.H. Fernandes^c, Danilo L. Menaldo^b, Angelo J. Magro^c, Consuelo L. Fortes-Dias^d, Maria Inácia Estevão-Costa^d, Marcos R.M. Fontes^c, Camila R. Santos^e, Mário T. Murakami^e, Andreimar M. Soares^{a,b,*}

^a Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, FMRP-USP, Ribeirão Preto-SP, Brazil

^b Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, FCFRP-USP, Ribeirão Preto-SP, Brazil

^c Departamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu-SP, Brazil

^d Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte-MG, Brazil

^e Laboratório Nacional de Biociências, Centro Nacional de Pesquisas em Energia e Materiais, Campinas, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 July 2010

Accepted 26 November 2010

Available online 7 December 2010

Keywords:

Phospholipase A₂

Myotoxin inhibitor

cDNA

Protein modeling

Molecular dynamics

Bothrops alternatus

Snake plasma

ABSTRACT

Phospholipases A₂ (PLA₂s) are important components of *Bothrops* snake venoms, that can induce several effects on envenomations such as myotoxicity, inhibition or induction of platelet aggregation and edema. It is known that venomous and non-venomous snakes present PLA₂ inhibitory proteins (PLIs) in their blood plasma. An inhibitory protein that neutralizes the enzymatic and toxic activities of several PLA₂s from *Bothrops* venoms was isolated from *Bothrops alternatus* snake plasma by affinity chromatography using the immobilized myotoxin BthTX-I on CNBr-activated Sepharose. Biochemical characterization of this inhibitory protein, denominated α BaltMIP, showed it to be a glycoprotein with Mr of ~24,000 for the monomeric subunit. CD spectra of the PLA₂/inhibitor complexes are considerably different from those corresponding to the individual proteins and data deconvolution suggests that the complexes had a relative gain of helical structure elements in comparison to the individual protomers, which may indicate a more compact structure upon complexation. Theoretical and experimental structural studies performed in order to obtain insights into the structural features of α BaltMIP indicated that this molecule may potentially trimerize in solution, thus strengthening the hypothesis previously raised by other authors about snake PLIs oligomerization.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Accidents caused by venomous snakes represent a significant public health problem especially in tropical countries, considering the frequency of occurrence and the mortality they induce [1].

The constitution of snake venoms is complex, containing more than 20 different components and with more than 90% of their dry weight corresponding to proteins. Among the protein content of these venoms, there is a wide variety of enzymes, and the non-protein part is composed by carbohydrates, lipids, metals, amino acids, nucleotides, among other constituents [2].

Phospholipases A₂ (PLA₂s, E.C. 3.1.1.4) are enzymes that catalyze the hydrolysis of 2-acyl ester bonds of 3-sn-phospholipids, releasing free fatty acids and lysophosphatides [3]. These enzymes are widely distributed in nature and are found in the interior and exterior of cells [4], pancreatic secretions [5], inflammatory exudates [6] and arthropod and snake venoms [7].

Independently of their primary catalytic function, the PLA₂s can induce several pharmacological and/or toxic effects, such as myonecrosis, anticoagulation, inhibition of platelet aggregation, neurotoxicity, cardiotoxicity, arterial hypotension, increase of the microvascular permeability and edema formation [8–13]. Besides, PLA₂s are also associated with muscular necrosis, an important local effect induced by some snake venoms, which may lead to permanent loss of tissue and function that may result in the amputation of the affected limb [14].

Considering these factors, several studies have been carried out in search of natural inhibitors of snake venom PLA₂s. Some authors already described the presence of these inhibitors in the plasma of

* Corresponding authors. Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, FCFRP-USP, Ribeirão Preto-SP, Brazil. Tel.: +55 16 602 4714; fax: +55 16 3602 4725.

E-mail addresses: norival@fcrp.usp.br (N.A. Santos-Filho), andreims@fcrp.usp.br (A.M. Soares).

mammals as *Didelphis albiventris* [15,16] and *Didelphis marsupialis* [17], in plants as *Withania somnifera* [18], *Cordia verbenacea* [19], *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* [20], *Bauhinia forficata* [21], and also in the plasma of snakes [22–25].

Plasma of venomous and non-venomous snakes possesses PLA₂ inhibitory proteins, denominated PLIs [25]. According to several studies, these PLIs are responsible for the natural resistance of snakes against the toxic components of their own venoms, or to those of other species [23,26–29].

The PLA₂ inhibitors can be classified into three types (α , β and γ), according to structural aspects [30]. Nevertheless, their mechanisms of action remain unknown, which incites new structural and functional studies. α -type inhibitors (α PLIs) isolated from the plasma of Crotalinae snakes are acidic glycoproteins constituted of more than two subunits and possess sequential similarity to the carbohydrate recognition domain (CRD) of C-type lectins [31]. At the moment, it is believed that the mechanism by which α PLIs neutralize the toxic effects of snake venom PLA₂s involves the CRD region, particularly CRD4, which recognizes and binds to these enzymes, preventing their enzymatic activity on the cell membrane [32].

The present study reports the isolation of a phospholipase A₂ inhibitory protein from *Bothrops alternatus* snake plasma (α BaltMIP) and also highlights interesting biochemical, structural and functional features related to this molecule.

2. Materials and methods

2.1. Materials

A specimen of *B. alternatus* snake was supplied by the serpentarium of Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. Blood was collected in 0.38% sodium citrate and centrifuged for 10 min at 450 × g and room temperature for obtainment of the corresponding plasma, which was then lyophilized and stored at –20 °C. Another specimen of the same species was obtained from the serpentarium of Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG. At the time of sampling, the snake was euthanized with CO₂ before dissection. Liver samples were collected, quickly frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C until RNA extraction. Animal care was in accordance with the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the Committee for Ethics in Animal Utilization of Universidade de São Paulo (No. 09.1.329.53.3) and IBAMA (No. 11781-1). Activated Sepharose 4B-CNBr and Sephacryl S-200 were purchased from Amersham Pharmacia Biotech (GE-Healthcare) and the oligonucleotides from Gibco BRL. All other reagents used for chemical and biological characterization were acquired from Sigma Chem. Co., BioLab, Gibco BRL or Mediatech.

2.2. Phospholipases A₂ and synthetic peptides

BthA-I-PLA₂, bothropstoxins I and II (BthTX-I and -II) from *Bothrops jararacussu*, piratoxins I and III (PrTX-I and -III) from *Bothrops pirajai* and crotoxin B (CB) from *Crotalus durissus terrificus* were isolated by ion-exchange chromatography on CM-Sepharose using 0.05 M ammonium bicarbonate (AMBIC) buffer, pH 8.0, as previously described [33,34]. Peptides were synthesized by Fmoc chemistry, with native endings by a commercial provider (Chiron Mimotopes, Victoria, Australia or PepMetric Technologies Inc., Vancouver, Canada). Their estimated molecular masses were in agreement with corresponding calculated values, with final purity levels of at least 95% by RP-HPLC analysis. Peptides were kept dry at –20 °C, and dissolved in 0.12 M NaCl, 40 mM sodium phosphate (PBS), pH 7.2, immediately before being tested for their activities. Peptides were

derived from the C-terminal region 115–129 of the Lys49 PLA₂ – like BthTX-I (pepBthTX-I = ₁₁₅KKYRYHLKPFCKK₁₂₉).

2.3. Purification of the inhibitor

α BaltMIP was isolated from *B. alternatus* blood plasma as follows. *B. jararacussu* BthTX-I (40 μ g) was coupled to 10 ml of CNBr-activated Sepharose 4B as described by the manufacturer. It was then settled in a 1.0 × 8.0 cm column and equilibrated with 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2. *B. alternatus* plasma (10 ml) was diluted with the same buffer (50 ml, buffer 1) and applied on the column at a flow rate of 2.0 ml/min. Absorbance was recorded at 280 nm and sample was refluxed for 2 h followed by an extensive washing with the same buffer. The PLA₂-bound inhibitor was then eluted with 0.1 M glycine-HCl buffer, pH 2.8 (buffer 2), and the pH of the eluted sample was immediately adjusted to pH 7.0 with 0.5 M Tris-HCl buffer, pH 8.0. The α BaltMIP was desalted and concentrated using a YM-10,000 Amicon membrane by successive washings with 0.05 M AMBIC, pH 8.0, aliquoted in 1.0 ml portions, lyophilized and stored at –20 °C [25,35].

2.4. Biochemical characterization

Polyacrylamide gel electrophoresis was performed in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE), following a previously described method [36]. A PPSQ-33A (Shimadzu) automatic sequencer was used for the N-terminal sequencing. The phenylthiohydantoin (PTH) amino acids were identified by comparing their retention times with the 20 PTH-amino acid of the standard mixture. The peptides obtained were compared with the sequences of other related proteins in the SWISS-PROT/TREMBL databases using the FASTA and BLAST programs. To confirm the purity degree, reverse-phase HPLC was performed using a C18 column of 4.6 × 100 mm (GE-Healthcare). C18 column was equilibrated with solvent A (0.1% trifluoroacetic acid), and eluted with a concentration gradient of solvent B (70% acetonitrile, 0.1% trifluoroacetic acid) from 0 to 100%, at a flow rate of 1 ml/min during approximately 90 min. The peaks were monitored by absorbance at 280 nm.

2.5. Inhibitory effect of α BaltMIP on biological activities of snake venom PLA₂s

2.5.1. Inhibition of anticoagulant and PLA₂ activities

The ability of α BaltMIP to inhibit the enzymatic activity of the basic Asp49 PLA₂s BthTX-II, BthA-I-PLA₂, PrTX-III and CB was evaluated by previous incubation of these toxins (25 μ g) with the inhibitor at different molar ratios. Anticoagulant activity was assayed on platelet poor plasma and the PLA₂ assay on agarose gel containing red blood cells and egg yolk phospholipids [25,33,37].

2.5.2. Inhibition of cytotoxic activity

Cytotoxicity induced by PLA₂s (20 μ g) in the presence or absence of α BaltMIP was assayed on endothelial cells (tEnd) according to Angulo et al. [38]. In order to establish the 100% cytotoxic level for tEnd cells, 150 μ l of 0.1% triton X-100 in culture medium were incubated with the cells. For the 0% reference, the culture medium was used alone. After 3 h of incubation at 37 °C, aliquots of 100 μ l from the supernatants were assayed for lactate dehydrogenase (LDH) activity according to the Sigma 500 colorimetric method. Results were expressed as the percentage of cytotoxicity relative to LDH released by the detergent alone. In order to measure the cytotoxic activity upon muscular cells, mouse myoblast cell lines (C2C12) were assayed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) staining, as described by Mosmann [39]. Cells were disposed in 96-well plates at a density of 1 × 10⁵ cells per well. After 24 h of

culture, the medium was removed and fresh medium, with or without different concentrations of indicated compounds, as pepBthTX-I (100 μg), pepBthTX-I/ $\alpha\text{BaltMIP}$ (1:1, molar ratio) and $\alpha\text{BaltMIP}$ (100 μg), was added to the wells and incubated for 24 h.

2.5.3. Inhibition of myotoxicity

In vivo myotoxic activity was assayed measuring the creatine kinase (CK) levels in mice plasma ($n = 6$, 20–25 g) after i.m. injection of 50 μl of PBS (phosphate buffered saline) alone or PBS containing 50 μg of Asp49 or Lys49 myotoxin, previously incubated with $\alpha\text{BaltMIP}$, into the right gastrocnemius muscle. CK activity was assayed by the CK–UV kinetic kit (Bioclin, Brazil) as instructed by the manufacturer. The activity was expressed in U/l, one unit corresponding to the production of 1 mmol of NADH per minute [40].

2.6. Circular dichroism spectroscopy

CD measurements were carried out in a JASCO model J-810 CD spectropolarimeter equipped with a peltier thermo-controller within a spectral range of 190–260 nm. The experiments were performed at 20 °C using an optical path-length of 1 mm with a 20 nm/min scanning speed and response time of 2 s. Twenty spectra were accumulated, averaged and corrected from the baseline for buffer solution contribution and the resultant spectra were normalized to residual molar ellipticity [0]. Samples (protein individually and complexes) were analyzed in 5 mM phosphate buffer (pH 7.4) at molar concentration of 10 μM . The enzyme/inhibitor complex was prepared by mixing 1:1 M ratio, followed by incubation for 2 h at 4 °C. All solutions prior to experimentation were centrifuged at 20,000 \times g for 10 min to remove any aggregates and insoluble particles. Data analysis and deconvolution were conducted using algorithms implemented on the Dychroweb server [41].

2.7. Dynamic light scattering

The dynamic light scattering (DLS) measurements were performed with native $\alpha\text{BaltMIP}$ at 4 °C (277 K) and 10 °C (283 K) at the concentration of 1.0 mg ml⁻¹ using a DynaPro TITAN equipment (Wyatt Technology). The results were analyzed with the Dynamics v.6.10 software. The data were measured one hundred times in triplicate.

2.8. RNA extraction and cDNA synthesis

Approximately 120 mg of frozen liver of *B. alternatus* was ground to a fine powder with a mortar and pestle in the presence of liquid nitrogen and used for total RNA isolation, following the guanidine thiocyanate-Trizol[®] method (Invitrogen, USA). RNA integrity was analyzed by electrophoresis of 0.5–2 mg on a 1% agarose gel. Electrophoresis was run at 100 V/cm using TBE (89 mM Tris base, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA, pH 8.0) as the running buffer. The gel was examined under UV light, in the presence of ethidium bromide, for the presence of 18S and 28S bands corresponding to ribosomal RNA. cDNA was synthesized from 2 to 5 mg of total RNA by using a cDNA synthesis kit with oligo(dT)_{12–18} primer, in the presence of dithiothreitol (First-Strand Synthesis kit, Invitrogen, USA). PCR reactions were carried out with specific oligonucleotides designed on the basis of the published nucleotide sequence encoding for the αPLIs from *Trimeresurus flavoviridis* [42]. Amplification conditions were 5 min at 94 °C, 35 cycles of 3 min at 94 °C, 30 s at 55 °C and 30 s at 72 °C, followed by an extension period of 7 min at 72 °C (Perkin Elmer 2400 Thermocycler). A negative control was carried out with no DNA. Aliquots of the amplification reaction were analyzed by electrophoresis on 1.0% agarose gels in TBE buffer, in the presence of ethidium bromide.

2.9. Cloning and cDNA sequence of $\alpha\text{BaltMIP}$

Fresh PCR products were cloned in TA pCR 2.1 plasmid according to manufacturer's instructions (TA Cloning kit, Invitrogen, USA). After transformation of *Escherichia coli* strain INVaF' competent cells, putative positive colonies were confirmed by PCR with αPLIs primers [42]. Five positive clones were randomly selected for growth in liquid culture and the recombinant DNA was purified using a commercial kit (Wizard Plus Minipreps, Promega, USA). DNAs were completely sequenced by the dideoxy chain termination method (Sanger et al., 1977) on an automated ABI Prism 310 Genetic Analyser (Perkin Elmer Applied Biosystem, USA), using M13 forward and M13 reverse oligonucleotides as primers in the Big Dye Terminator Cycle sequencing Ready Reaction (Perkin Elmer Applied Biosystems, CA, USA). The complete cDNA sequences were deposited in the NCBI GenBank (EU421901 to EU421905).

2.10. Selection and alignment of homologous sequences

The sequences homologous to $\alpha\text{BaltMIP}$ were obtained from NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using the algorithm BLASTP and a BLOSUM45 matrix. The multiple alignment between $\alpha\text{BaltMIP}$ sequence and the selected homologue sequences was executed by the program AMAP v.2.2 using default parameters [43].

2.11. Protein modeling

The crystallographic model of lung surfactant protein D (SP-D) from *Homo sapiens* (PDB code 1pwb_chain A) was selected as the best template for the building of the initial theoretical $\alpha\text{BaltMIP}$ structural model, according to data obtained from the based-threading method program HHpred [44] (score = 203.9; e-value = 1.1e-32), available at the Max-Planck Institute for Developmental Biology server (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>). The initial theoretical $\alpha\text{BaltMIP}$ structural model was generated by the program MODELLER 8v2 [45] using the selected template.

2.12. Molecular dynamics simulation

The $\alpha\text{BaltMIP}$ model from program MODELLER 8v2 was submitted to a molecular dynamics (MD) simulation executed by the program GROMACS (Groningen Machine for Chemical Simulation) v.4.0.2 [46,47] in presence of explicit water molecules [48], using an Intel Core 2 Quad \times 64 equipped with an Ubuntu v.10.04 Linux operational system. Protonation states of charged groups were set according to pH 7.0. Counter ions were added to neutralize the system and the GROMOS 96 53a6 force field [49] was chosen to perform the MD simulation. The minimum distance between any atom of the protein and the box wall was 1.0 nm. An energy minimization (EM) using a steepest descent algorithm was performed to generate the starting configuration of the system. After this step, 200 ps of MD simulation with position restraints applied to the protein (PRMD) was executed in order to relax the system gently. Then, 10 ns of unrestrained MD simulation were calculated to evaluate the stability of the structures. All the MD simulations were carried out in a periodic truncated dodecahedron box under constant temperature (298 K) and pressure (1.0 bar) maintained by the coupling to an external heat and an isotropic.

2.13. Evaluation of the theoretical $\alpha\text{BaltMIP}$ structural models and assembling of the hypothetical oligomeric structure

Overall quality of all the theoretical $\alpha\text{BaltMIP}$ models obtained after modeling, MD simulation, and simulated annealing refinement were checked with the programs RAMPAGE [50] and ProSA-web

(<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) [51]. Average RMSF values of the backbone atoms from the final monomeric α BaltMIP MD model were calculated and converted to B-factor values using the program GROMACS v.4.0.2 [46,47]. The radii of gyration presented by the α BaltMIP model during the MD simulation were also calculated with the program GROMACS v.4.0.2. The assembling of the theoretical trimeric α BaltMIP structure was performed with the program O v.11.0.5 [52] by means of C α atom alignments between the final α BaltMIP MD model and each one of the monomers of the trimeric human lung surfactant protein D (SP-D). A simulated annealing refinement using the program CNS v.1.2 [53] was performed in order to check the feasibility of the theoretical α BaltMIP trimer assembled with the program O v.11.0.5.

2.14. Statistical analysis

Results are presented as mean \pm S.D. obtained with the indicated number of animals. The statistical significance of differences between groups was evaluated using Student's unpaired *t*-test and analysis of variance (ANOVA). A *P* value < 0.05 was considered to indicate significance.

3. Results and discussion

In the present work, an α -type phospholipase A₂ inhibitor (α PLI) was purified from *B. alternatus* snake plasma by an affinity chromatography using BthTX-I, a basic Lys49 PLA₂, coupled on CNBr-activated Sepharose 4B (Fig. 1A). In order to confirm its purity degree, the isolated α PLI, named α BaltMIP, was analyzed by reverse-phase HPLC column and electrophoresis in presence of the reducing agent β -mercaptoethanol (Fig. 1B). The inhibitor appeared as a single polypeptide chain, showing to present a relative molecular weight of 24,000 under reducing conditions (Fig. 1B). Some other α PLIs were purified from a variety of snakes, as *T. flavoviridis* [54], *Agkistrodon blomhoffii* [55], *Atropoides nummifer* [23], *Protobothrops flavoviridis* [24], *Bothrops asper* [32], *Bothrops moojenii* [35] and *B. jararacussu* [25].

The ability of α BaltMIP to inhibit phospholipase A₂ and anticoagulant activity was tested (Fig. 2A and B). The specific activity for each PLA₂ alone was considered as 100%. α BaltMIP was more effective in inhibiting the PLA₂ and anticoagulant activity of BthTX-II and PrTX-III, showing to be less active against the activities induced by crotoxin B and BthA-I-PLA₂.

α BaltMIP inhibited between 38 and 41% of the enzymatic activity of BthTX-II and PrTX-III, respectively, showing maximum inhibition in the proportion of 1:1 PLA₂/PLI (mol/mol) (Fig. 2A). It has been reported that α PLIs isolated from American crotaline snakes are more selective towards basic PLA₂s [22,56], while those of Asian species preferentially interact with acidic PLA₂s [31]. Nevertheless, no evident differences in the amino acid sequences of α PLIs could be ascribed to justify this variation in the inhibitory profiles [56]. Quirós and co-workers [23] proposed that an intra specific specialization of the inhibitor towards particular PLA₂s coevolving in its own venom would seem a more reasonable explanation than an early subdivision of the specificity of these inhibitors in Asian and American crotalines.

As previously mentioned, α BaltMIP presented higher anticoagulant inhibition against BthTX-II and PrTX-III (Fig. 2B). A large number of PLA₂s from snake venoms display anticoagulant activity [57,58]. Some authors suggest that the capacity of PLA₂s to bind and cleave membrane phospholipids indicates that snake venom PLA₂s inhibit blood coagulation through the destruction of pro-coagulating phospholipids, being the catalytic activity of PLA₂s directly responsible for its anticoagulant effects [59,60]. Our results corroborate with this hypothesis, since anticoagulant and catalytic activity showed to be similar.

α BaltMIP was also tested for its capacity in inhibiting PLA₂ cytotoxicity, presenting high inhibition of the cytotoxicity (about 80%) induced by Lys49 PLA₂s (BthTX-I and PrTX-I) (Fig. 2C). Some studies involving Lys49 PLA₂s have demonstrated that the C-terminal region is related to the cytotoxic and bactericidal effects of these proteins [61].

The myotoxicity induced by *Bothrops* Asp49 (BthTX-II and PrTX-III) and Lys49 (BthTX-I and PrTX-I) PLA₂s at an inhibitor:toxin molar ratio of 0.4:1 showed that α BaltMIP presented a strong inhibition of

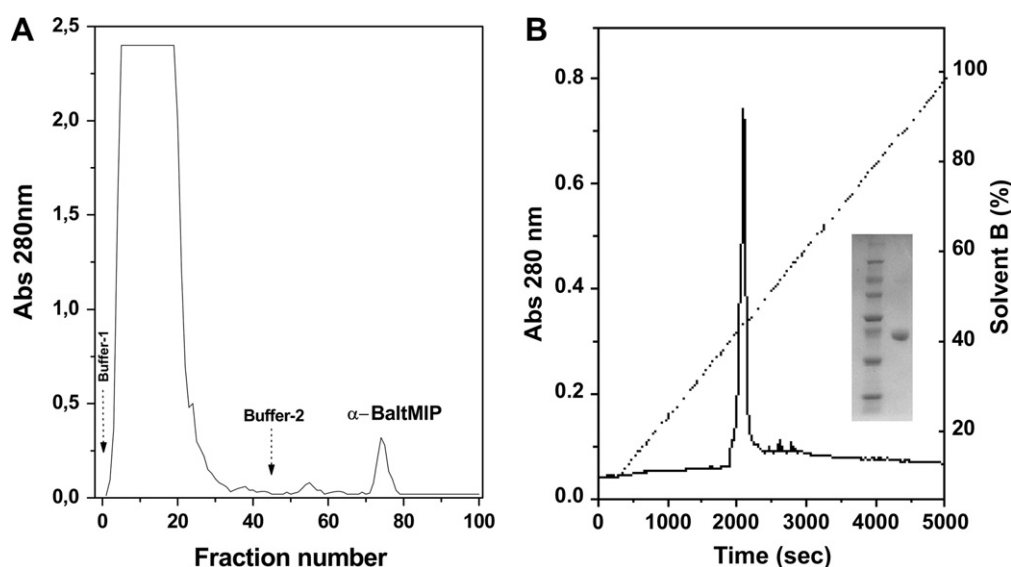


Fig. 1. (A) Purification of the α -type PLA₂ inhibitor from *Bothrops alternatus* snake plasma. *B. alternatus* plasma (~10 ml) was diluted in 50 ml of 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2 and applied on a CNBr-activated Sepharose chromatographic column, using a flow rate of 2 ml/min. The inhibitor was eluted with 0.1 M Glycine-HCl, pH 2.8. (B) Evaluation of the purity degree of α BaltMIP by 12% SDS-PAGE (MMW-66,000; 45,000; 36,000; 29,000; 24,000; 20,100; 14,200 and α BaltMIP Mr 24,000) and RP-HPLC using a C18 column and a concentration gradient of solvent B (0–100% of 70% acetonitrile plus 0.1% trifluoroacetic acid).

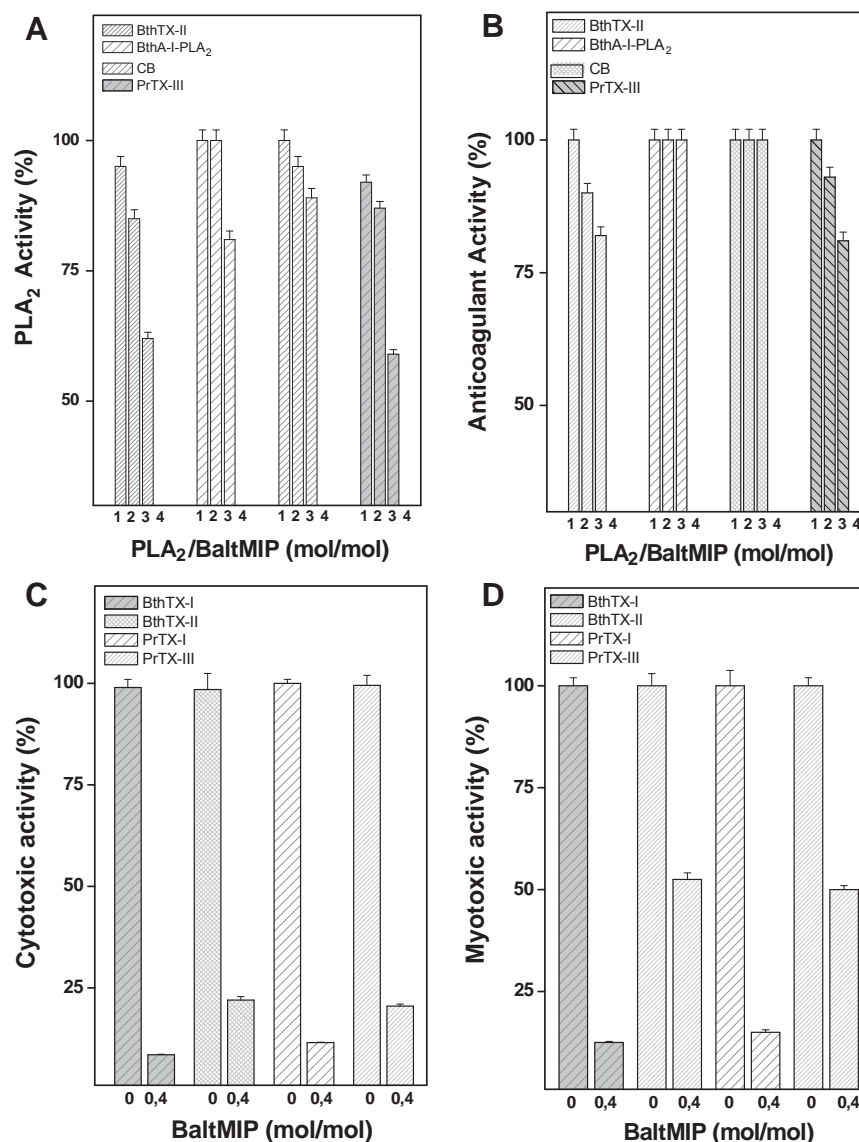


Fig. 2. Inhibitory properties of the α BaltMIP. Inhibition of (A) PLA₂ and (B) anticoagulant activities of isolated PLA₂s from *B. jararacussu*, *B. pirajai* and *Crotalus durissus terrificus* by α BaltMIP (PLA₂/αBaltMIP) at different molar ratios (mol/mol): (1) 1:0.2; (2) 1:0.6; (3) 1:1; (4) 0:1. (C) Neutralization of cytotoxic activity induced by myotoxins BthTX-I, PrTX-I and BthTX-II after incubation with α BaltMIP for 30 min at 37 °C. (D) Neutralization of myotoxic activity of Lys49 and Asp49 myotoxins after incubation with α BaltMIP for 30 min at 37 °C. The total activity of each PLA₂ alone was considered as 100%. Results are expressed as mean \pm S.D. ($n = 6$).

about 80% upon Lys49 PLA₂s, and about 40% of inhibition upon Asp49 PLA₂s (Fig. 2D).

According to some authors, the main responsible for the toxic effect in Lys49 PLA₂s is the C-terminal region. This hypothesis could be confirmed by using synthetic peptides belonging to the C-terminal region (amino acids 115–129), which was responsible for the toxic activities of some myotoxic Lys49 PLA₂s [62,63]. This region combines cationic and hydrophobic amino acid residues responsible for the damage mechanism of cellular membranes. The cationic residues can interact with anionic groups of an acceptor site, probably negatively loaded membrane phospholipids [63], while the hydrophobic residues, especially the aromatic ones, can interact with and possibly penetrate the phospholipid bilayer, resulting in its destabilization [62]. However, the fact that a single peptide plays all the main toxic activities of the origin molecule does not prevent the existence of other motifs that can participate or complement the action of the toxic effector site [63].

In contrast, C-terminal peptides of some myotoxic Asp49 PLA₂s showed no membrane direct damage activity, suggesting that the toxic mechanism exercised by these proteins probably involves its catalytic activity as an important step, differently from that used by myotoxic Lys49 PLA₂s [62]. According to this hypothesis, some studies have suggested that myotoxic Asp49 PLA₂s may induce muscle cell damage by affecting the integrity of plasmatic membranes, thereby leading to hyper contraction and other intracellular effects [13,64]. These membranes are formed by different types of phospholipids, mainly phosphatidylcholine, which can be hydrolyzed by Asp49 PLA₂s producing free fatty acids and lysophospholipids, causing cellular damage [13].

In order to bring some light to this discussion, the cytotoxic activity was assayed upon mouse myoblast cell line (C2C12 cells), testing BthTX-I (a Lys49 myotoxin), pepBthTX-I (a synthetic peptide derived from the C-terminal of BthTX-I) and α BaltMIP. The native BthTX-I presented a high cytotoxicity on C2C12 cells, which was

considered as 100%. The synthetic peptide pepBthTX-I also showed cytotoxic activity against the evaluated cell line, even though this activity was less significant (about 76%). When α BaltMIP was previously incubated with BthTX-I and pepBthTX-I, a remarkable reduction on their cytotoxic activity was observed (about 40% of activity to BthTX-I/ α BaltMIP and 25% to pepBthTX-I/ α BaltMIP, both in the molar ratio of 1:1).

The C-terminal region of Lys49 PLA₂s is possibly responsible for the cytotoxic effect of these enzymes [61–63], and this hypothesis was confirmed by the present work. However, the participation of other regions of the protein in the toxic mechanism cannot be excluded. The interaction between inhibitor and protein (e.g. α BaltMIP/BthTX-I) seems to occur in several ways and not only in the C-terminal region, given that the toxic activity was not abolished using C-terminal synthetic peptides.

As previously mentioned, α BaltMIP was able to inhibit both Lys49 and Asp49 PLA₂ myotoxic/cytotoxic activities, suggesting there might be several ways of inhibition. Soares and co-workers [35] suggested at least two mechanisms through which α PLIs could neutralize PLA₂s: (1) α PLIs could bind to PLA₂ domains via its CRD region and block, through steric hindrance, interaction between the cytotoxic domain and the cell membrane or (2) α PLIs could directly bind to other domains of myotoxins, avoiding direct contact with the membrane.

Furthermore, the secondary structure contents of the Lys49 (BthTX-I) and Asp49 PLA₂s (BthTX-II and CB), the inhibitor α BaltMIP and their respective complexes were analyzed by CD spectroscopy. All three PLA₂s showed characteristic curves of helical proteins featuring well-defined peaks at 208 and 222 nm as expected for a snake venom PLA₂ structure (Fig. 3A). Analogously, the inhibitor CD spectrum indicates a high content of helical structure elements in its structure (Fig. 3A). CD spectra of the PLA₂/inhibitor complexes are considerably different from those corresponding to the individual proteins (Fig. 3B, for more details, see Fig. 3C). Data deconvolution suggests that the complexes had a relative gain of helical structure elements in comparison to the individual protomers (Table 1), which may indicate a more compact structure upon complexation.

The N-terminal sequence of α BaltMIP, comprising the first 31 amino acid residues, was determined by automatic sequencing using the Edman degradation method, showing the sequence HEQDPDGKLLNSLIDALMHLQREFAKLRGAF. The comparison of the N-terminal sequence of α BaltMIP and an amino acid sequence

Table 1

Data deconvolution of CB, BthTX-I, BthTX-II and their complexes with α BaltMIP, using the CDSSTR method.

	Helix	Strand	Turn	Unordered	Total
CB	0.39	0.14	0.19	0.27	0.99
BthTX-I	0.44	0.17	0.13	0.16	1.00
BthTX-II	0.54	0.12	0.14	0.20	1.00
α BaltMIP	0.50	0.13	0.16	0.22	1.01
Complex1	0.48	0.13	0.16	0.24	1.01
Complex2	0.60	0.15	0.11	0.14	1.00
Complex3	0.55	0.11	0.14	0.20	1.00

deduced from cDNA of an α PLI from *B. alternatus* (EU421904.1) showed 100% of identity. The deduced mature sequence shows 147 residues, presenting the conserved cysteine residues at positions 64, 119, 133 and 141, and the putative glycosylation site at N103, characteristic of α PLIs (Fig. 4).

Additionally, in an attempt to obtain insights into the structural features of α BaltMIP, a theoretical three-dimensional structure of α BaltMIP was constructed using a threading modeling technique and improved by a 10 ns molecular dynamics (MD) simulation [44–47]. The initial theoretical α BaltMIP structural model calculated by the program MODELLER 8v2 showed a good stereochemical configuration, with 99.3% of its amino acid residues in the favoured and allowed regions of Ramachandran plot [50]. Furthermore, the residues of the initial theoretical α BaltMIP structural model have also presented an adequate overall quality (Z-score = -4.43) in comparison with experimentally-determined native proteins of similar size deposited in the Protein Data Bank (PDB) [51]. The structural characteristics of the initial model are kept in the theoretical α BaltMIP model obtained after a 10 ns molecular dynamics simulation, which presents 97.9% of its residues distributed in the favoured and allowed regions of Ramachandran plot [50] and also an overall good quality (Z-score = -4.99) [51]. The analysis of the overall α BaltMIP structure calculated after the MD simulation showed the two main structural features of α PLIs were conserved at the final model: the α -helical neck and the carbohydrate recognition domain (CRD), whose main secondary structural elements are two α -helices and five β -strains (Fig. 5A).

The comparison of the deduced amino acid sequence of α BaltMIP with other snake α PLIs – including the theoretical model of GbPLI α (an α PLI from *Gloydius brevicaudus*) [65] – and SP-D proteins from *H. sapiens* and *Rattus norvegicus* shows the mammal amino acid

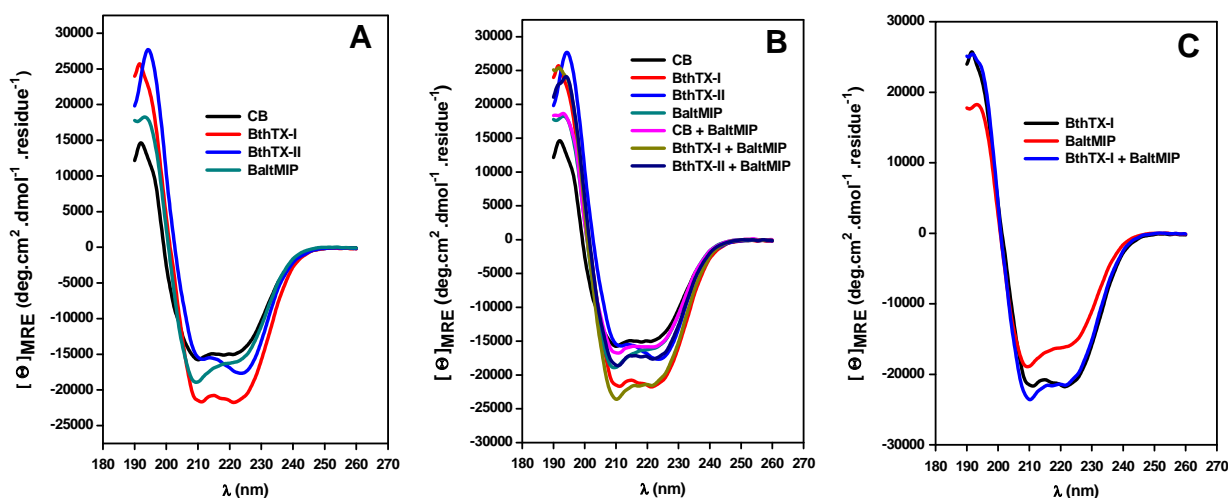


Fig. 3. Far UV-CD spectra for α BaltMIP, PLA₂s and association of PLI/PLA₂. Spectra for CB, BthTX-I, BthTX-II and α BaltMIP alone (A) and for the complexes of these enzymes with α BaltMIP (B); for more details graph (C) presents only BthTX-I and α BaltMIP at a 1:1 M ratio.

```

ATG CGC CTG ATT CTG CTT TCC GGT CTT CTT CTT TTG GGA ATC TTT CTG GCC
M R L I L L S G L L L L G I F L A
AAC GGA CAT GAA CAA GAT CCT GAT GGA AAA TTG CTG AAT TCA TTG ATT GAT
N G H E Q D P D G K L L N S L I D
GCC CTA ATG CAC CTT CAA AGA GAG TTC GCC AAA CTG AGA GGC GCC TTC CTG
A L M H L Q R E F A K L R G A F L
ACA GTC TAC AAA GCC CGA TCC TTT GGG AAT GGC AGT GAA AGA TTG TAC GTG
T V Y K A R S F G N G S E R L Y V
ACC AAC AAG GAA ATC AAA AAC TTT GAA GCT CTG AGA CAG ATC TGT GAG CAA
T N K E I K N F E A L R Q I C E Q
GCC GGG GGC CAT ATC CCT TCC CCT CAA CTC GAA AAT CAG AAC AAG GCC TTC
A G G H I P S P Q L E N Q N K A F
GCA AAT GTT CTG GAG AGG CAC AAC AAA GAA GCC TAC CTT GTT GTG GGT GAC
A N V L E R H N K E A Y L V V G D
TCA GCA AAC TTC ACC AAC TGG GCT GCG GGA GAA CCG AAT AAG GCT GCT GGA
S A N F T N W A A G E P N K A A G
GCC TGT GTG AAA GCA GAT ACA CAC GGC TCC TGG CAC TCT ACG TCC TGT GAT
A C V K A D T H G S W H S T S C D
GAC AAC CTC TTA GTC GTG TGT GAG TTT TAT TTC ATT TTA TGA
D N L L V V C E F Y F I L --
    
```

Fig. 4. cDNA and amino acid sequence of a phospholipase A₂ inhibitor from *Bothrops alternatus* snake plasma (EU421904.1). The underlined amino acids correspond to the N-terminal peptide, which was determined by chemical sequencing of the purified α BaltMIP. The mature polypeptide chain presents 147 amino acid residues.

sequences present an insertion in the 97–109 region (corresponding to 294–306 region according to the human sequence numeration) (Fig. 6). Interestingly, a structural comparison between the final α BaltMIP MD model and the SP-D crystallographic structure from *H. sapiens* indicates this insertion that corresponds to a loop where the residues Asp297 and Glu301 are placed, which are involved in the coordination of two Ca²⁺ ions (Fig. 6). One of these Ca²⁺ ions is also responsible for coordination of important structural elements (a loop and another Ca²⁺ ion) involved in carbohydrate binding [66]. Therefore, the absence of this “Ca²⁺-binding” loop in the α BaltMIP theoretical model seems to strengthen the hypothesis that snake α PLIs do not bind to carbohydrates and present a Ca²⁺-independent inhibitory activity, as previously observed by Okumura

et al. [65]. In this same work, it was also stated that the α -helical neck regions of snake α PLIs lead to trimerization of these proteins, resulting in the formation of a central pore responsible for binding and inhibition of PLA₂s. Indeed, the dynamic light scattering (DLS) experiments carried out with the purified α BaltMIP strengthen the possible importance of oligomerization for this protein and, possibly, for other snake α PLIs. The DLS data showed α BaltMIP presents a narrow unimodal size distribution at 4 °C (277 K) and 10 °C (283 K), with, respectively, polydispersity values of 3.3% and 13.4% and mean hydrodynamic radii (R_H) of 3.4 nm and 3.6 nm. Remarkably, the R_H values of the scattering centers formed in the tested conditions are considerably distinct from the radius of gyration values (~2.0–2.5 nm) presented by the α BaltMIP model

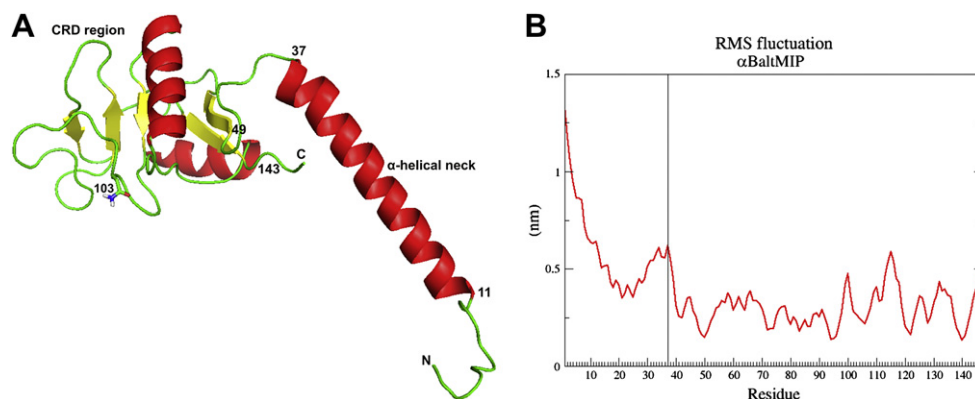


Fig. 5. (A) Cartoon representation of the final theoretical α BaltMIP model obtained after a 10 ns molecular dynamics (MD) simulation [46,47]. The residues 11–37 and 49–143 correspond, respectively, to the α -helical neck region and carbohydrate recognition domain (CRD); the residue Asn103 (stick representation) corresponds to a glycosylation site and it is preserved in all snake α PLI sequences. Illustration generated by the program PyMOL v.1.0 [67]. (B) Average backbone atom RMSF values of the final monomeric α BaltMIP MD model calculated by the program GROMACS v.4.0.2 [46,47]. The vertical line separates the α -helical neck region from the carbohydrate recognition domain (CRD) to emphasize the high flexibility presented by the first segment in comparison to the second during the MD simulation.

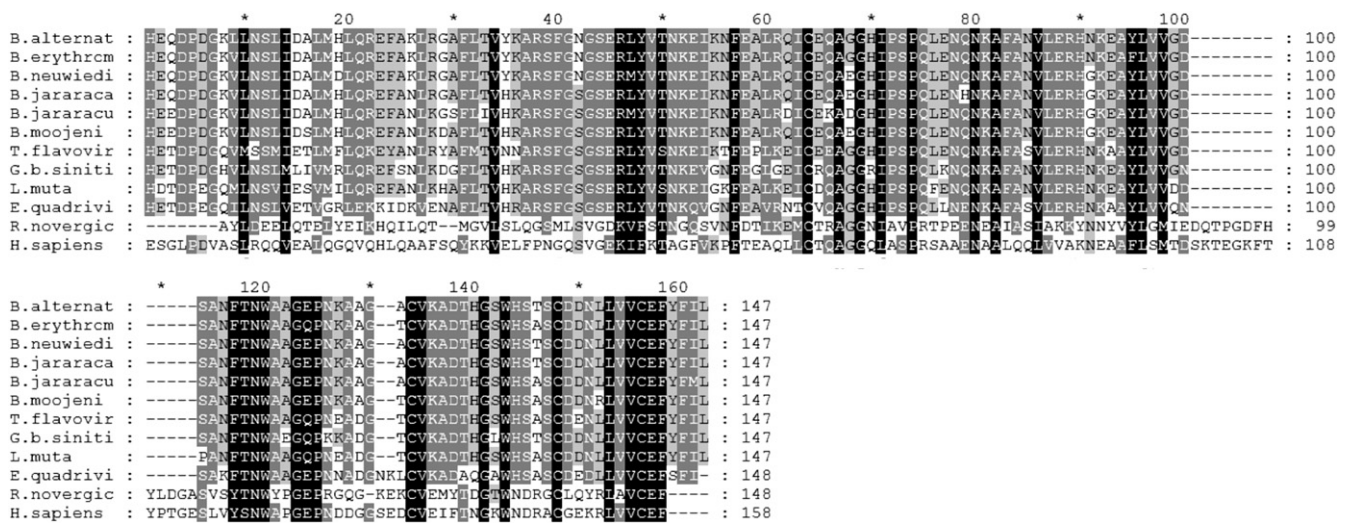


Fig. 6. Multiple alignment between the amino acid sequences of α BaltMIP and other snake α PLI sequences and mammalian lung surfactant proteins D (SP-D) generated with the program AMAP v.2.2 [43]. All the sequences were obtained in the NCBI protein database. α PLIs: *Bothrops alternatus* (gi:215275473); *Bothrops erythromelas* (gi:215275474); *Bothrops neuwiedi* (gi:218546740); *Bothrops jararaca* (gi:215275475); *Bothrops jararacussu* (gi:167547115); *Bothrops moojeni* (gi:218546738); *Gloydus blomhoffii siniticus* (gi:6467183); *Lachesis muta* (gi:218546736); *Trimeresurus flavoviridis* (gi:160357989); *Elaphe quadrivirgata* (gi:82133672). Mammalian lung surfactant proteins D (SP-D): *Rattus norvegicus* (gi:39654792); *Homo sapiens* (gi:34810883).

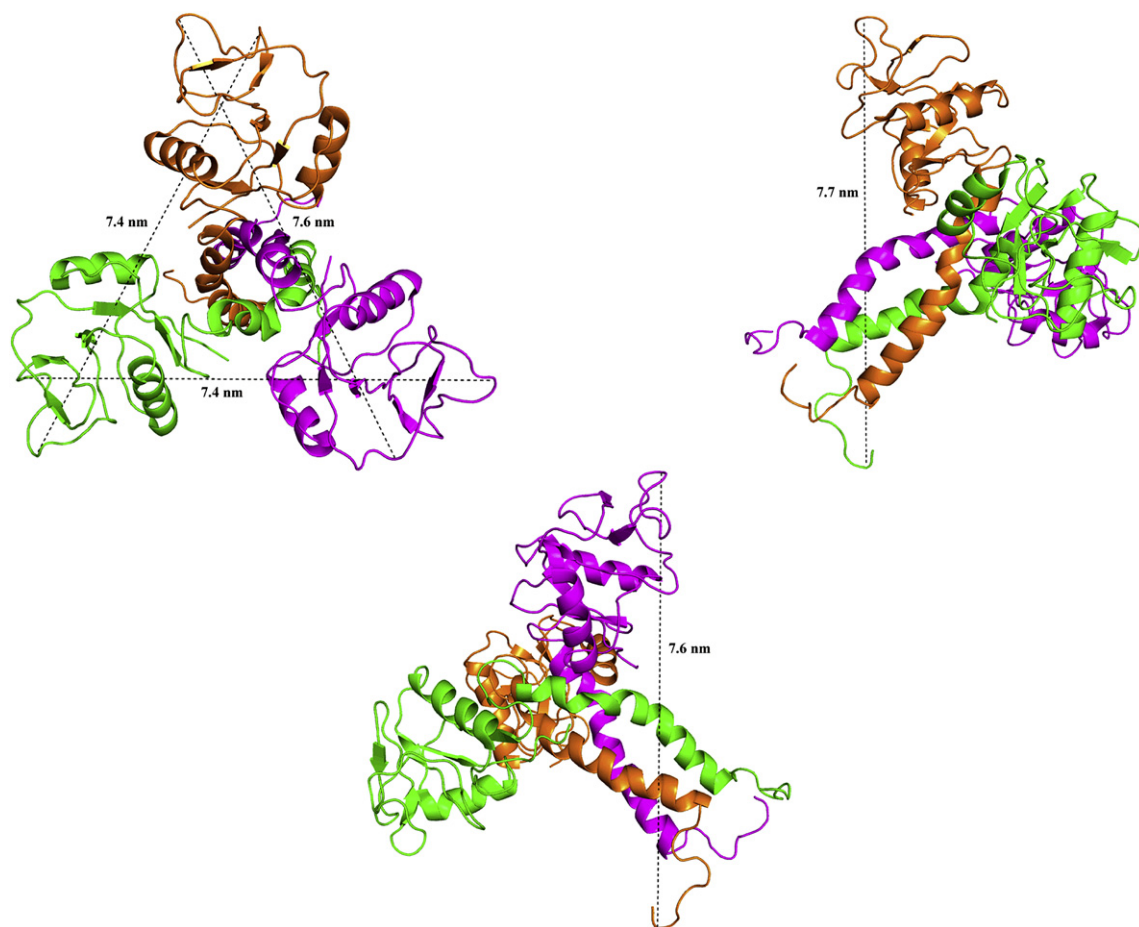


Fig. 7. Hypothetical α BaltMIP trimeric assembling obtained after a simulated annealing refinement [52,53]. The three α BaltMIP monomers fitted well in a trimeric spherical arrangement whose maximum dimensions (about 7.5 nm) indicate that the approximate radius of the oligomer is quite close to the broader R_H value (3.6 nm) calculated in the DLS experiments at 10 °C. It is also possible to observe a slightly twist between the α -helical neck regions, suggesting the probable importance of these regions for the oligomeric assembling. Illustration generated by the program PyMOL v.1.0 [67].

during the MD simulation [46,47]. Hence, since the MD simulation was performed with a single monomer, a trimeric oligomer was assembled and submitted to a simulated annealing refinement [52,53] in order to check specifically if α BaltMIP could also trimerize like other snake α PLs, as proposed by Okumura et al. [65]. The result of this simulated annealing refinement showed the three α BaltMIP monomers fitted well in a spherical trimeric arrangement whose approximate radius (3.75 nm) is quite close to the R_H value (3.6 nm) calculated in the DLS experiments at 10 °C (Fig. 7). Another interesting feature about the theoretical α BaltMIP trimeric model was a noticeable twist between the α -helical neck regions of the model, thus indicating these parts of the molecule may play an important role in trimerization. Interestingly, the root mean square fluctuation (RMSF) of the backbone atoms from α -helical necks during the MD simulation indicates these regions are highly flexible in relation to other segments of the monomeric molecule (Fig. 5B). This structural feature becomes more evident when the RMSF of each α BaltMIP backbone atom is converted into a B-factor value: the backbone atoms of the α -helical neck region present an average B-factor around 1096.9 Å², whereas the overall B-factor average is approximately 467.4 Å² [46,47]. Consequently, a possible α BaltMIP trimeric arrangement held by tight interactions between the α -helical neck regions could present the additional benefit of avoiding potential unfavorable contacts of these segments with unspecific PLA₂ sites in a complex whose molar ratio was 1:1. Otherwise, the circular dichroism (CD) trials have showed that the α BaltMIP/PLA₂ complex is probably more compact in relation to the separated protomers due to the relative increase of helical segments in relation to the separated protomers. This finding indicates that the PLA₂ binding could even induce structural modifications in α BaltMIP and other α PLI protomers to optimize and/or accelerate the formation of intricate inhibitory complexes as that suggested here (formed by one trimeric α PLI oligomer and one PLA₂ molecule). Such hypothesis seems reasonably probable when it is taken into account that the concentration of α PLs in the snake tissues must be far lower in comparison to the conditions of the experimental procedures performed with the purified α BaltMIP.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Instituto de Ciência e Tecnologia em Toxinas (INCTTox) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the financial support, and also to Prof. Dr. Auro Nomizo and Isabela Gobbo Ferreira (FCFRP-USP) for their technical support on the cytotoxic activity upon C2C12 cells.

Appendix. Supplementary material

Supplementary materials related to this article can be found online at doi:10.1016/j.biochi.2010.11.016.

References

- [1] F.M.O. Pinho, I.D. Pereira, *Ofidismo*, Revista da Associação Médica Brasileira 47 (2001) 24–29.
- [2] E.A. Varanda, M.J.S. Giannini, *Bioquímica de venenos de serpentes*, In: Venenos. Aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos (1999) pp. 205–223.
- [3] E.A. Dennis, Diversity of group types, regulation and function of phospholipases A₂, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 13057–13060.
- [4] M. Murakami, I. Kudo, Phospholipase A₂, *J. Biochem.* 131 (2002) 285–292.
- [5] A.G. Buckland, E.L. Heeley, D.C. Wilton, Bacterial cell membrane hydrolysis by secreted phospholipases A₂: a major physiological role of human group IIa sPLA₂ involving both bacterial cell wall penetration and interfacial catalysis, *Biochim. Biophys. Acta* 1484 (2000) 195–206.
- [6] M.L. Touqui, Alaoui-El-Azher, Mammalian secreted phospholipase A₂ and their pathophysiological significance in inflammatory diseases, *Curr. Mol. Med.* 1 (2001) 739–754.
- [7] R.M. Kini, in: *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism*, John Wiley and Sons, Chichester, 1997, pp. 1–28.
- [8] J.M. Gutiérrez, B. Lomonte, Phospholipases A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms, in: *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism*, John Wiley and Sons, 1997, pp. 321–352.
- [9] J.B. Harris, B.D. Grubb, C.A. Maltin, R. Dixon, The neurotoxicity of the venom phospholipases A₂, netoxin and taipoxin, *Exp. Neurol.* 161 (2000) 517–526.
- [10] S.B. Singh, A. Armugam, R.M. Kini, J. Kandiah, Phospholipase A₂ with platelet aggregation inhibitor activity from *Austrelaps superbus* venom: protein purification and cDNA cloning, *Arch. Biochem. Biophys.* 375 (2000) 289–303.
- [11] C.F.P. Teixeira, E.C.T. Landucci, E. Antunes, M. Chacur, Y. Cury, Inflammatory effects of snake venoms myotoxic phospholipase A₂, *Toxicon* 42 (2003) 947–962.
- [12] 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) 1–14.
- [13] N.A. Santos-Filho, L.B. Silveira, C.Z. Oliveira, C.P. Bernardes, D.L. Menaldo, A.L. Fuly, E.C. Arantes, S.V. Sampaio, C.C. Mamede, M.E. Beletti, F. Oliveira, A.M. Soares, A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inducer phospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom, *Toxicon* 52 (2008) 908–917.
- [14] S.A. Nishioka, P.V. Silveira, A clinical and epidemiologic study of 292 cases of lanceheaded viper bite in a Brazilian teaching hospital, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47 (1992) 805–810.
- [15] A.M. Soares, V.M. Rodrigues, M.H. Borges, S.H. Andrião-Escarso, O.A.B. Cunha, M.I. Homsí-Brandesburgo, J.R. Giglio, Inhibition of phospholipases A₂ from *Bothrops* venoms by the heteromeric protein complex of *Didelphis albiventris* opossum serum, *Biochem. Mol. Biol. Int.* 43 (1997) 1091–1099.
- [16] E.P. Trento, O.S. Garcia, A. Rucavado, S.C. França, C. Batalini, E.C. Arantes, J.R. Giglio, A.M. Soares, Inhibitory properties of the anti-bothropic complex from *Didelphis albiventris* serum on toxic and pharmacological actions of metalloproteases and myotoxins from *Bothrops asper* venom, *Biochem. Pharmacol.* 62 (2001) 1521–1529.
- [17] S.L.G. Rocha, B. Lomonte, A.G.C. Neves-Ferreira, G.B. Domont, J.M. Gutiérrez, J. Perales, Functional analysis of DM64 an antimyotoxic protein with immunoglobulin-like structure from *Didelphis marsupialis* serum, *Eur. J. Biochem.* 269 (2002) 6052–6062.
- [18] M. Deepa, T.V. Gowda, Purification and characterization of a glycoprotein inhibitor of toxic phospholipase from *Withania somnifera*, *Arch. Biochem. Biophys.* 408 (2002) 42–50.
- [19] F.K. Tielci, L.I.S. Hage, R.S. Cambraia, P.S. Pereira, A.J. Magro, M.R.M. Fontes, R.G. Stábilie, J.R. Giglio, S.C. França, A.M. Soares, S.V. Sampaio, Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A₂ inhibitor from *Cordia verbenácea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction, *Toxicon* 46 (2005) 318–327.
- [20] V. Nuñez, V. Castro, R. Murillo, L.A. Ponce-Soto, I. Merfort, B. Lomonte, Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts towards myotoxic phospholipase A₂ from *Bothrops* snake venoms: isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle, *Phytochemistry* 66 (2005) 1017–1025.
- [21] C.Z. Oliveira, V.A. Maiorano, S. Marcussi, C.D. Sant'Ana, C.D. Januário, M.V. Lourenço, S.V. Sampaio, S.C. França, P.S. Pereira, A.M. Soares, Anticoagulant and antifibrinolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms, *J. Ethnopharmacol.* 98 (2005) 213–216.
- [22] S. Lizano, G. Domont, J. Perales, Natural phospholipase A₂ myotoxin inhibitor proteins from snakes mammals and plants, *Toxicon* 42 (2003) 963–977.
- [23] S. Quirós, A. Alape-Girón, Y. Angulo, B. Lomonte, Isolation, characterization and molecular cloning of AnMIP, a new alpha-type phospholipase A₂ myotoxin inhibitor from the plasma of the snake *Atropoides nummifer* (Viperidae: Crotalinae), *Comp. Biochem. Physiol. B* 146 (2007) 60–68.
- [24] A. Shimada, N. Ohkura, K. Hayashi, Y. Samejima, T. Omori-Satoh, S. Inoue, K. Ikeda, Subunit structure and inhibition specificity of alpha-type phospholipase A₂ inhibitor from *Protobothrops flavoviridis*, *Toxicon* 51 (2008) 787–796.
- [25] C.Z. Oliveira, D.L. Menaldo, S. Marcussi, N.A. Santos-Filho, L.B. Silveira, J. Boldrini-França, V.M. Rodrigues, A.M. Soares, An alpha-type phospholipase A₂ inhibitor from *Bothrops jararacussu* snake plasma: structural and functional characterization, *Biochimie* 90 (2008) 1506–1514.
- [26] J. Perales, G.B. Domont, Are inhibitors of metalloproteinases, phospholipases A₂ and myotoxins members of the innate immune system, in: A. Ménez (Ed.), *Perspectives in Molecular Toxicology*, Wiley, Chichester, 2002, pp. 435–456.
- [27] G. Faure, Natural inhibitors of toxic phospholipases A₂, *Biochimie* 82 (2000) 833–840.
- [28] C.L. Fortes-Dias, Endogenous inhibitors of snake venom phospholipase A₂ in the blood plasma of snakes, *Toxicon* 40 (2002) 481–484.
- [29] S. Marcussi, C.D. Sant'ana, C.Z. Oliveira, A.Q. Rueda, D.L. Menaldo, R.O. Belebóni, R.G. Stábilie, J.R. Giglio, M.R.M. Fontes, A.M. Soares, Snake venom phospholipase A₂ inhibitors: medicinal chemistry and therapeutic potential, *Curr. Top. Med. Chem.* 7 (2007) 2328–2339.

- [30] M.M. Thwin, R.L. Satish, S.T.F. Chan, P. Gopalakrishnakone, Functional site of endogenous phospholipase A₂ inhibitor from python serum. *Phospholipase A₂ binding and anti-inflammatory activity*, *Eur. J. Biochem.* 269 (2002) 719–727.
- [31] S. Inoue, A. Shimada, N. Ohkura, K. Ikeda, Y. Samejima, T. Omori-Satoh, K. Hayashi, Specificity of two types of phospholipase A₂ inhibitors from plasma of venomous snakes, *Biochem. Mol. Biol. Int.* 41 (1997) 529–537.
- [32] S. Lizano, B. Lomonte, J.W. Fox, J.M. Gutiérrez, Biochemical characterization and pharmacological properties of an inhibitor of basic phospholipase A₂ myotoxins from the plasma of the snake of *Bothrops asper*, *Biochem. J.* 326 (1997) 853–859.
- [33] S.H. Andrião-Escarso, A.M. Soares, M.R.M. Fontes, A.L. Fuly, F.M.A. Correa, 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.
- [34] A.M. Soares, V.M. Rodrigues, M.I. Homs-Brandeburgo, M.H. Toyama, F.R. Lombardi, R.K. Arni, J.R. Giglio, 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* 36 (1998) 503–514.
- [35] A.M. Soares, S. Marcussi, R.G. Stábeli, S.C. França, J.R. Giglio, R.J. Ward, E.C. Arantes, Structural and functional analysis of BmjMIP, a phospholipase A₂ myotoxin inhibitor protein from *Bothrops moojeni* snake plasma, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302 (2003) 193–200.
- [36] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [37] S.H. Andrião-Escarso, A.M. Soares, V.M. Rodrigues, Y. Angulo, C. Diaz, B. Lomonte, J.M. Gutiérrez, J.R. Giglio, Myotoxic phospholipases A₂ in *Bothrops* snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*, *Biochimie* 82 (2000) 755–763.
- [38] Y. Angulo, C.E. Nunez, S. Lizano, A.M. Soares, B. Lomonte, Immunochemical properties of the N-terminal helix of myotoxin II, a lysine-49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom, *Toxicon* 39 (2001) 879–887.
- [39] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55–63.
- [40] R.G. Stábeli, S.F. Amui, C.D. Sant'Ana, M.G. Pires, A. Nomizo, M.C. Monteiro, P.R. Romão, R. Guerr-Sá, C.A. Vieira, J.R. Giglio, M.R.M. Fontes, A.M. Soares, *Bothrops moojeni* myotoxin-II a Lys49-phospholipase A₂ homologue: an example of functional versatility of snake venom proteins, *Comp. Biochem. Physiol. C* 142 (2006) 371–381.
- [41] L. Whitmore, B.A. Wallace, Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases, *Biopolymers* 89 (2008) 392–400.
- [42] I. Nobuhisa, M. Deshimaru, T. Chiwata, K. Nakashima, T. Ogawa, Y. Shimohigashi, Y. Fukumaki, Y. Sakaki, S. Hattori, H. Kihara, M. Ohno, Structures of genes encoding phospholipase A₂ inhibitors from the serum of *Trimeresurus flavoviridis* snake, *Gene* 191 (1997) 31–37.
- [43] A.S. Schwartz, L. Pachter, Multiple alignment by sequence annealing, *Bioinformatics* 23 (2007) 24–29.
- [44] J. Söding, A. Biegert, A.N. Lupas, The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction, *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) 244–248.
- [45] M.A. Marti-Renom, A. Stuart, A. Fiser, R. Sánchez, F. Melo, A. Sali, Comparative protein structure modeling of genes and genomes, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29 (2000) 291–325.
- [46] H.J.C. Berendsen, D. van der Spoel, R. van Drunen, GROMACS: a message-passing parallel molecular dynamics implementation, *Comput. Phys. Commun.* 91 (1995) 43–56.
- [47] E. Lindahl, B. Hess, R. van der Spoel, GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis, *J. Mol. Model.* 7 (2001) 306–317.
- [48] H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postma, W.F. van Gunsteren, J. Hermans, Interaction models for water in relation to protein hydration. in: B. Pullman (Ed.), *Intermolecular Forces*. D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, 1981, pp. 331–342.
- [49] C. Oostenbrink, T.A. Soares, N.F.A. van der Vegt, W.F. van Gunsteren, Validation of the 53A6 GROMOS force field, *Eur. Biophys. J.* 34 (2005) 273–284.
- [50] S.C. Lovell, I.W. Davis, W.B. Arendall III, P.I.W. de Bakker, J.M. Word, M.G. Prisant, J.S. Richardson, D.C. Richardson, Structure validation by Calpha geometry: phi, psi and Cbeta deviation, *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 50 (2003) 437–450.
- [51] M. Wiederstein, M.J. Sippl, ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) W407–W410.
- [52] 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.
- [53] A.T. Brünger, P.D. Adams, G.M. Clore, W.L. DeLano, P. Gros, R.W. Grosse-Kunstleve, J.S. Jiang, J. Kuszewski, M. Niiges, N.S. Pannu, R.J. Read, L.M. Rice, T. Simonson, G.L. Warren, Crystallography and NMR system (CNS): a new software system for macromolecular structure determination, *Acta Crystallogr. D* 54 (1998) 905–921.
- [54] H. Kogaki, S. Inoue, K. Ikeda, Y. Samejima, T. Omori-Satoh, K. Hamaguchi, Isolation and fundamental properties of a phospholipase A₂ inhibitor from the blood plasma of *Trimeresurus flavoviridis*, *J. Biochem.* 106 (1989) 966–971.
- [55] N. Ohkura, S. Inoue, K. Ikeda, K. Hayashi, Isolation and amino acid sequence of a phospholipase A₂ inhibitor from the blood plasma of *Agkistrodon blomhoffii siniticus*, *J. Biochem.* 113 (1993) 413–419.
- [56] S. Lizano, Y. Angulo, B. Lomonte, J.W. Fox, G. Lambeau, M. Lazdunski, J.M. Gutiérrez, Two phospholipase A₂ inhibitors from the plasma of *Cerrophidian (Bothrops) godmani* which selectively inhibit two different group II phospholipase A₂ myotoxins from its own venom: isolation molecular cloning, and biological properties, *J. Biochem.* 346 (2000) 631–639.
- [57] C. Ouyang, C.M. Teng, T.F. Huang, Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function, *Toxicon* 30 (1992) 945–966.
- [58] D.A. Higuchi, C.M.V. Barbosa, C. Bincoletto, J.R. Chagas, A. Magalhaes, M. Richardson, E.F. Sanchez, J.B. Pesquero, R.C. Araujo, J.L. Pesquero, Purification and partial characterization of two phospholipases A₂ from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) snake venom, *Biochimie* 89 (2006) 1–10.
- [59] R.M. Kini, Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes, *Toxicon* 42 (2003) 827–840.
- [60] L. Chioato, R. Ward, Mapping structural determinants of biological activities in snake venom phospholipases A₂ by sequence analysis and site directed mutagenesis, *Toxicon* 42 (2003) 869–883.
- [61] T.R. Costa, D.L. Menaldo, C.Z. Oliveira, N.A. Santos-Filho, S.S. Teixeira, A. Nomizo, A.L. Fuly, M.C. Monteiro, B.M. De Souza, M.S. Palma, R.G. Stábeli, S.V. Sampaio, A.M. Soares, Myotoxic phospholipases A₂ isolated from *Bothrops brazili* snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: cytotoxic effect on microorganism and tumor cells, *Peptides* 29 (2008) 1645–1656.
- [62] C.E. Núñez, Y. Angulo, B. Lomonte, Identification of the myotoxic site of the Lys49 phospholipase A₂ from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* snake venom: synthetic C-terminal peptides from Lys49, but not from Asp49 myotoxins, exert membrane-damaging activities, *Toxicon* 39 (2001) 1587–1594.
- [63] B. Lomonte, Y. Angulo, C. Santamaría, Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115–129 in Lys49 myotoxic phospholipases A₂ from snake venoms, *Toxicon* 42 (2003) 307–312.
- [64] A.L. Fuly, S. Calil-Elias, A.M.B. Martinez, P.A. Melo, J.A. Guimarães, Myotoxicity induced by an acidic Asp-49 phospholipase A₂ isolated from *Lachesis muta* snake venom comparison with lysophosphatidylcholine, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35 (2003) 1470–1481.
- [65] K. Okumura, A. Ohno, M. Nishida, K. Hayashi, K. Ikeda, S. Inoue, Mapping the region of the α -type phospholipase A₂ inhibitor responsible for its inhibitory activity, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 37651–37659.
- [66] A.K. Shrive, H.A. Tharia, P. Strong, U. Kishore, I. Burns, P.J. Rizkallah, K.B.M. Reid, T.J. Greenough, High-resolution structural insights into ligand binding and immune cell recognition by human lung surfactant protein D, *J. Mol. Biol.* 331 (2003) 509–523.
- [67] W.L. Delano, The PyMOL Molecular Graphics System. DeLano Scientific, San Carlos, 2002.