

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Campus de Botucatu

Instituto de Biociências

Angelo José Magro

**Estudos estruturais experimentais e teóricos com
proteínas do veneno da serpente *Bothrops jararacussu***

Tese de Doutorado

Botucatu

2006

Angelo José Magro

**Estudos estruturais experimentais e teóricos com
proteínas do veneno da serpente *Bothrops jararacussu***

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

Orientador: Prof. Adjunto Marcos Roberto de Mattos Fontes

Botucatu
2006

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

Magro, Angelo José.

Estudos estruturais experimentais e teóricos com proteínas do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* / Angelo José Magro. – 2006.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu 2006.

Orientador: Marcos Roberto de Mattos Fontes

Assunto CAPES: 20901003

1. Serpente - Veneno 2. Fosfolipases A₂ 3. Biologia molecular estrutural
4. Metaloproteases

CDD 597.96

Palavras-chave: *Bothrops jararacussu*; Cristalografia de proteínas; Dinâmica molecular; Fosfolipase A₂; Metaloprotease

Dedico este trabalho a meus pais, sempre presentes em minha vida, e à Vanessa, pelo seu carinho e dedicação.

“Não sei como posso parecer ao mundo, mas para mim, eu pareço ser apenas como uma criança brincando na beira do mar, divertindo-me e encontrando um seixo mais liso ou uma concha mais bonita do que o ordinário, enquanto o grande oceano da verdade permanece todo indescoberto diante de mim.”

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo, o Professor Adjunto Marcos Roberto de Mattos Fontes, sempre solícito e paciente;

Aos meus companheiros e companheiras de trabalho, em especial ao pós-doutorando Antônio Sérgio Kimus Braz pelo precioso auxílio, sem o qual não teria sido possível realizar uma grande parte deste estudo;

À Fundação de Auxílio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), que financiou este projeto de pesquisa através da concessão de uma bolsa de Doutorado;

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

Aos nossos colaboradores, os Professores Andreimar Martins Soares e Raghuvir Krishnaswamy Arni, pelo auxílio e confiança em nosso trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	5
1.1 Fosfolipases A ₂ e metaloproteases: componentes protéicos de elevado interesse científico encontrados em venenos botrópicos.....	6
<i>1.1.1 Fosfolipases A₂</i>	6
<i>1.1.2 Metaloproteases</i>	7
1.2 Propriedades bioquímicas da BthA-I e importância do estudo estrutural experimental de sua forma nativa e do complexo BthA-I /pBPB.....	9
1.3 Características moleculares da BjussuMP-I e técnicas de bioinformática utilizadas para a realização de estudos teóricos relacionados ao seu domínio catalítico.....	10
2. OBJETIVOS.....	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1 Estudos estruturais experimentais realizados com a BthA-I nativa e o complexo BthA/pBPB.....	15
<i>3.1.1 Isolamento, clonagem do cDNA, seqüenciamento e modificação química da BthA-I e BjussuMP-I</i>	15
<i>3.1.2 Experimentos de cristalização</i>	15
<i>3.1.2.1 BthA-I nativa</i>	15
<i>3.1.2.2 Complexo BthA-I/pBPB</i>	16

3.1.3 Experimentos de difração de raios-X.....	17
3.1.4 Determinação estrutural e refinamento dos modelos experimentais tridimensionais.....	17
3.1.5 Avaliação dos modelos cristalográficos da BthA-I nativa (d-BthA-I) e do complexo BthA-I/pBPB e superposição estrutural das Asp49-PLA ₂ s.....	18
3.2 Estudos teóricos realizados com o domínio catalítico da BjussuMP-I.....	19
3.2.1 Identificação de seqüências protéicas em bancos de dados.....	19
3.2.2 Alinhamento das seqüências e análise filogenética.....	20
3.2.3 Modelagem molecular.....	22
3.2.4 Simulação de dinâmica molecular.....	22
3.2.5 Avaliação do modelo teórico do domínio catalítico da BjussuMP-I.....	23
3.2.6 Identificação de resíduos de superfície conservados.....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1 Estudo estrutural experimental da BthA-I nativa.....	25
4.1.1 Conformação oligomérica e qualidade estereoquímica do modelo cristalográfico da BthA-I nativa dimérica (d-BthA-I).....	25
4.1.2 Comparação estrutural entre a formas dimérica e monomérica da BthA-I nativa.....	28
4.1.3 Comparação estrutural entre a BthA-I nativa e outras Asp49-PLA ₂ s.....	31
4.2 Estudo estrutural experimental do complexo BthA-I/pBPB.....	34
4.2.1 Conformação oligomérica e qualidade estereoquímica do modelo cristalográfico do complexo BthA-I/pBPB.....	34
4.2.2 Disposição estrutural da molécula de pBPB no complexo.....	38
4.2.3 Comparação estrutural entre a BthA-I nativa e o complexo BthA-I/pBPB.....	40
4.2.4 Comparação estrutural entre PLA ₂ s quimicamente modificadas pelo pBPB.....	44

4.2.5 Inibição das atividades farmacológicas da BthA-I pelo pBPB.....	45
4.3 Estudos teóricos realizados com o domínio catalítico da BjussuMP-I.....	47
4.3.1 Análise filogenética do domínio catalítico da BjussuMP-I.....	47
4.3.2 Análise estrutural do modelo teórico do domínio catalítico da BjussuMP-I e sua comparação a outras SVMPs.....	50
5. CONCLUSÕES.....	59
6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	61
7. REFERÊNCIAS.....	64
APÊNDICE A.....	77
APÊNDICE B.....	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Bothrops jararacussu</i>	5
Figura 2: Cristais da BthA-I nativa.....	16
Figura 3: Cristal do complexo BthA-I/pBPB.....	16
Figura 4: Diagrama esquemático das interações presentes na interface dimérica da BthA-I nativa.....	26
Figura 5: Gráfico de Ramachandran da BthA-I nativa.....	27
Figura 6: Estrutura da BthA-I nativa.....	28
Figura 7: Contatos do íon Na ⁺ localizado no <i>loop</i> de ligação de Ca ⁺⁺ da BthA-I monomérica (m-BthA-I).....	30
Figura 8: Superposição dos átomos de C _α dos <i>loops</i> de ligação da Ca ⁺⁺ das formas dimérica e monomérica da BthA-I nativa.....	30
Figura 9: Alinhamento realizado com base nas estruturas secundárias de Asp49-PLA ₂ s isoladas de venenos de serpentes.....	31
Figura 10: Superposição realizada entre os C _α das hélices h1, h2 e h3 de Asp49-PLA ₂ s isoladas de venenos de serpentes.....	32
Figura 11: Alguns exemplos de PLA ₂ s diméricas isoladas de venenos de serpentes.....	33
Figura 12: Diagrama esquemático das interações presentes na interface dimérica do complexo BthA-I/pBPB.....	35

Figura 13: Estrutura do complexo BthA-I/pBPB.....	36
Figura 14: Gráfico de Ramachandran do complexo BthA-I/pBPB.....	37
Figura 15: <i>Omit map</i> $3 F_{obs} - 2 F_{calc} $ da região do sítio catalítico do monômero A do complexo BthA-I/pBPB exibindo a ligação covalente entre a molécula de pBPB e o resíduo His48 ($\sigma = 1,5$).....	38
Figura 16: Interações entre as moléculas de pBPB e os resíduos dos monômeros do complexo BthA/pBPB.....	39
Figura 17: Superposições realizadas entre os átomos C_{α} das hélices h1, h2 e h3 destas estruturas, mostrando a posição relativa dos resíduos componentes dos sítios ativos da forma dimérica da BthA-I nativa (d-BthA-I) e seus resíduos correspondentes no complexo BthA-I/pBPB.....	41
Figura 18: Superposição entre os átomos C_{α} das hélices h1, h2 e h3 da forma monomérica da BthA-I nativa (m-BthA-I) e dos monômeros A do complexo BthA-I/pBPB e da forma dimérica da BthA-I nativa (d-BthA-I).....	42
Figura 19: Superposição entre os átomos C_{α} das hélices h1, h2 e h3 dos monômeros A do complexo BthA-I/pBPB e da forma dimérica da BthA-I nativa (d-BthA-I), mostrando a disposição relativa dos monômeros B destas estruturas.....	43
Figura 20: Árvore filogenética construída com as seqüências de metaloproteases selecionadas nos bancos de dados.....	48
Figura 21: Árvore filogenética construída somente com as seqüências dos domínios catalíticos de SVMPs selecionadas nos bancos de dados.....	50
Figura 22: R.M.S.D. do domínio catalítico da BjussuMP-I durante a simulação de dinâmica molecular.....	51

Figura 23: Gráfico de Ramachandran do modelo teórico final do domínio catalítico da BjussuMP-I.....	52
Figura 24: Gráfico de energia potencial dos resíduos do modelo teórico final do domínio catalítico da BjussuMP-I.....	53
Figura 25: Estrutura terciária e secundária do modelo teórico final do domínio catalítico da BjussuMP-I.....	53
Figura 26: Modelo teórico final do domínio catalítico da BjussuMP-I mostrando a disposição das cadeias laterais dos resíduos de histidina responsáveis pela reação de catálise.....	54
Figura 27: Representação do tipo <i>ribbons</i> do modelo teórico final do domínio catalítico da BjussuMP-I mostrando o grau de conservação entre os resíduos de todas as seqüências selecionadas nos bancos de dados.....	55
Figura 28: Resíduos de superfície eletricamente carregados conservados nos domínios catalíticos das metaloproteases.....	57
Figura 29: Cristal do complexo BthA-I/ α -tocoferol.....	77
Figura 30: Estruturas das formas monomérica e dimérica do complexo BthA-I/ α -tocoferol.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados dos experimentos de difração de raios-X realizados com a BthA-I nativa dimérica (d-BthA-I) e o complexo BthA-I/pBPB.....	18
Tabela 2: Estatísticas de refinamento da BthA-I nativa dimérica (d-BthA-I) e do complexo BthA-I/pBPB.....	19
Tabela 3: Seqüências homólogas ao domínio catalítico da BjussuMP-I encontradas nos bancos de dados do NCBI e UniProt.....	20
Tabela 4: Valores de <i>r.m.s.d.</i> (Å) das superposições realizadas entre os átomos C _α dos monômeros do complexo BthA-I/pBPB e das formas monomérica (m-BthA-I) e dimérica (d-BthA-I) da BthA-I nativa.....	40
Tabela 5: Resíduos de superfície conservados em cada grupo de metaloproteases.....	56
Tabela 6: Dados dos experimentos de difração de raios X e processamento das imagens das formas cristalinas monomérica e dimérica (m-BthA-I/α-tocoferol e d-BthA-I/α-tocoferol) do complexo BthA-I/α-tocoferol.....	79

RESUMO

Neste trabalho foram realizados estudos estruturais experimentais e teóricos com a BthA-I e a BjuSSuMP-I, duas proteínas isoladas do veneno de *Bothrops jararacussu*. A proteína BthA-I é uma fosfolipase A₂ (PLA₂) ácida com elevada atividade catalítica e que possui a capacidade de inibir a agregação de plaquetas e reduzir a pressão arterial. Cristais da BthA-I nativa e de sua forma quimicamente modificada pelo pBPB (brometo de p-bromofenacila), um conhecido inibidor de a PLA₂s que também é capaz de suprimir os mecanismos farmacológicos próprios desta proteína, foram obtidos e submetidos a experimentos de difração de raios-X. A estrutura cristalina da BthA-I foi elucidada a 1,9 Å de resolução e o processamento dos dados experimentais revelou a presença de dois monômeros na unidade assimétrica. A análise estrutural destes monômeros revelou que a BthA-I dimérica possui uma conformação oligomérica distinta das demais PLA₂s, onde os sítios catalíticos da molécula encontram-se expostos ao solvente. Apesar das condições de cristalização da BthA-I nativa, é possível sugerir que a forma dimérica desta proteína seja aquela encontrada predominantemente *in vivo*. A determinação estrutural da BthA-I quimicamente modificada pelo pBPB a 1,85 Å de resolução revelou a presença inequívoca de moléculas de inibidor covalentemente ligadas aos resíduos His48, localizados nos sítios de ligação de substrato dos dois monômeros do complexo. Três regiões do complexo BthA-I/pBPB são estruturalmente alteradas pela ligação do inibidor: os *loops* de ligação de Ca⁺⁺ e as regiões de β -wing e C-terminais. Estas mudanças estruturais são provavelmente derivadas da conformação oligomérica apresentada pelo complexo, cuja disposição pode explicar a supressão das atividades farmacológicas da BthA-I ocasionadas pela ligação do pBPB. Um resíduo presente nos *loops* “pancreáticos” desta proteína (Lys69), apontado como um dos componentes necessários à atividade anticoagulante mostrada pela BthA-I, encontra-se localizado na interface dimérica do complexo BthA-I/pBPB. Este fato corrobora a hipótese que relaciona a capacidade do pBPB de suprimir esta e outras atividades da proteína nativa à conformação oligomérica exibida pela proteína quando quimicamente modificada pelo inibidor.

O estudo teórico do domínio catalítico da BjuSSuMP-I, uma metaloprotease de classe P-III, foi executado com base em um modelo criado a partir de técnicas de *threading* e refinado por meio de uma simulação de dinâmica molecular. Este modelo foi então comparado a outras SVMPs (*Snake Venom Metalloproteases*) e proteínas da família das Reprolisinas com o intuito de identificar eventuais diferenças estruturais, as quais podem ser úteis para o entendimento pleno das atividades bioquímicas destas enzimas. A presença de grandes porções hidrofóbicas e alguns resíduos eletricamente carregados conservados nas superfícies das SVMPs e de outras metaloproteases foi um interessante achado resultante desta comparação. De forma adicional, uma análise filogenética

do domínio catalítico da BjussuMP-I foi realizada de modo a prover novas informações a respeito da evolução molecular desta e de outras moléculas pertencentes a esta mesma família de proteínas.

ABSTRACT

In this work were performed experimental and theoretical structural studies with BthA-I and BjussuMP-I, two proteins from the venom of *Bothrops jararacussu*. BthA-I, a high catalytic acidic phospholipase A₂ (PLA₂) with platelet aggregation inhibition, anticoagulant and hypotensive properties, was crystallized in its native form and complexed to pBPB (p-bromophenacyl bromide), a well-known inhibitor of PLA₂s which also abolishes the biochemical activities of this protein. The crystal structure of BthA-I native was solved at 1.9 Å and the data processing showed two monomers in the unit cell. A novel dimeric conformation of this native protein with the active sites of the monomers exposed to the solvent was observed. Despite of the conditions used in the crystallization experiments, it is possible to suggest that the dimeric form must be predominantly found *in vivo*. The structural determination of BthA-I chemically modified by pBPB at 1.85 Å revealed the unambiguous identification of inhibitor molecules covalently bound to residues His48 in the substrate-binding clefts of both monomers of the complex. Three regions of BthA-I/pBPB complex are structurally altered by the binding of the inhibitor: the Ca⁺⁺-binding loops, the β-wings and the C-terminal regions. These structural changes are probably derived from the oligomeric state presented by the complex, which could explain the abolition of pharmacological activities of the pBPB-chemically modified BthA-I. A residue present in the “pancreatic” loops (Lys69), which is usually related to the anticoagulant effect of the BthA-I, is in the dimeric interface of the complex, supporting this hypothesis regarding the abolition of this and other activities caused by pBPB.

The theoretical BjussuMP-I catalytic domain, a P-III metalloprotease, was built through folding recognition (threading) techniques and refined by molecular dynamics simulation. This model was compared to other SVMPs and Reprolysin family proteins in order to identify eventual structural differences, which could help to understand the biochemical activities of these enzymes. The presence of large hydrophobic areas and some conserved electrostatically-charged surface residues were identified as important features of the SVMPs and other metalloproteases. Additionally, a phylogenetic analysis of the BjussuMP-I metalloprotease/catalytic domain was performed to get new insights into the molecular evolution of this and other proteins from the same family.

1. INTRODUÇÃO

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 (mitos, religião, símbolos, etc). Este interesse também se refletiu na Ciência, com a conseqüente realização de muitos estudos a respeito das propriedades e componentes dos venenos de serpentes. A importância dada a tais estudos é claramente evidenciada pelo imenso volume de artigos que tratam do estudo dos venenos destes animais e seus constituintes publicados em periódicos especializados em Toxinologia (Guimarães & Carlini, 2004).

No Brasil, o estudo dos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* e potenciais moléculas inibidoras das frações biologicamente ativas destes venenos é especialmente relevante, uma vez que estes animais são responsáveis por mais de 70% dos acidentes ofídicos que ocorrem no país (Fundação Nacional de Saúde, 2001). Além disso, em virtude da grande variedade de efeitos farmacológicos e bioquímicos apresentados pelas proteínas que compõem os venenos destes répteis, o estudo aprofundado destas toxinas combinadas ou não a inibidores pode ser de grande utilidade para o desenvolvimento de novos medicamentos e produtos de interesse biotecnológico. Do mesmo modo, as informações adquiridas através destes estudos podem contribuir de forma decisiva para a aquisição de novos e importantes dados a respeito de processos bioquímicos, fisiológicos e patológicos que ocorrem nos seres vivos.

Neste trabalho, foram realizados estudos experimentais e teóricos com dois tipos de moléculas protéicas isoladas do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (Figura 1): a BthA-I, uma fosfolipase A₂ ácida enzimaticamente ativa (Asp49-PLA₂) (Andrião-Escarso et al., 2002), e a BjussuMP-I, uma metaloprotease de classe P-III recentemente isolada do veneno da mesma espécie (Mazzi et al., 2004).



Figura 1 – *Bothrops jararacussu*.

A forma nativa da BthA-I e seu complexo com um inibidor de fosfolipases A₂ (PLA₂S) – o pBPB (brometo de para-bromofenacila) – foram estudados através do emprego da técnica de

cristalografia de proteínas. Já os estudos estruturais teóricos do domínio catalítico da B_jussuMP-I foram executados por meio do emprego de técnicas de bioinformática (modelagem e simulação de dinâmica molecular). Adicionalmente, foi realizado um estudo filogenético do domínio catalítico da B_jussuMP-I, com o intuito de se obter informações a respeito da origem desta toxina e, conseqüentemente, um melhor entendimento do papel que a família destas proteínas desempenha nos mais diferentes organismos. As propriedades e atividades bioquímicas das moléculas protéicas e inibidores utilizados neste trabalho, bem como os aspectos relacionados às técnicas experimentais e teóricas empregadas, são abordados nos próximos tópicos desta seção. Os artigos científicos relativos aos trabalhos desta tese de doutoramento são apresentados no Apêndice B.

1.1 Fosfolipases A₂ e metaloproteases: componentes protéicos de elevado interesse científico encontrados em venenos botrópicos

1.1.1 Fosfolipases A₂

As PLA₂s são enzimas que se caracterizam por promover a hidrólise da ligação éster *sn*-2 de fosfolipídios, liberando lisofosfolipídios e ácidos graxos (Dennis, 1994). A superfamília das PLA₂s é dividida em 15 diferentes grupos (Schaloske & Dennis, 2006), sendo que as enzimas pertencentes a cinco destas classes (I, II, III, V e X) são abundantemente encontradas em uma grande variedade de fluidos biológicos, particularmente em secreções pancreáticas, exudatos inflamatórios e venenos de répteis e artrópodes (Rosenberg, 1990). As PLA₂s classificadas dentro das cinco classes citadas são enzimas extracelulares estáveis e cálcio-dependentes, com um peso molecular aproximado de 14 kDa, que apesar de suas distribuições e ocorrências variadas possuem em comum um alto grau de identidade seqüencial e diferenciam-se entre si somente pela localização de suas pontes dissulfeto e comprimento de seus *loops* (Dennis, 1994). As PLA₂s dos grupos I e II também são os componentes principais dos venenos de serpentes, sendo aquelas pertencentes ao grupo IIA os compostos predominantemente encontrados nos venenos das serpentes pertencentes à família Viperidae (entre as quais também se incluem as espécies do gênero *Bothrops*) (Rosenberg, 1990).

Apesar da pequena variação seqüencial e estrutural mencionada, as PLA₂s encontradas nos venenos ofídicos destacam-se pelo seu grande espectro de atividades biológicas, entre as quais incluem-se: neurotoxicidade, miotoxicidade, cardiotoxicidade, efeitos na agregação de plaquetas, ação anticoagulante, atividade convulsiva e hipotensiva, capacidade hemolítica e de indução de edema, entre outros efeitos (Kini & Evans, 1989; Rosenberg, 1990; Evans & Kini, 1997; Gutiérrez & Lomonte, 1997; Kini, 1997; Ownby, 1998; Andrião-Escarso et al., 2000; Braud et al., 2000;

Valentin & Lambeau, 2000; Andrião-Escarso et al., 2002; Soares et al., 2004; Kini, 2005). De acordo com estes trabalhos, várias destas atividades estão relacionadas ao mecanismo catalítico descrito por Scott et al. (1990), onde o posicionamento dos substratos no sítio enzimático é sustentado por um conjunto específico de resíduos de aminoácidos auxiliados por um íon Ca^{++} coordenado pelo resíduo Asp49). No entanto, de modo intrigante, alguns dos processos acima citados desencadeados pelas PLA₂s não são dependentes da atividade catalítica destas toxinas, o que demonstra de modo inequívoco a existência de outros sítios protéicos funcionalmente importantes.

Como é facilmente notado, o aparente paradoxo relacionado à incongruência existente entre a uniformidade estrutural e o leque de ações farmacológicas e bioquímicas é um dos fatores principais que despertaram o interesse da comunidade científica por este grupo de proteínas. As pequenas variações existentes entre estas moléculas facilitam a identificação de prováveis relações estruturais/funcionais que possam esclarecer os mecanismos pelos quais as PLA₂s desempenham suas variadas funções. O conhecimento destas relações estruturais/funcionais pode, portanto, ser de extrema valia para o desenvolvimento de medicamentos e/ou derivados que possam inibir as atividades deletérias das PLA₂s presentes nos venenos ofídicos e agir sobre outras enzimas similares encontradas em mamíferos. Estas últimas atuam de maneira bastante ativa no estabelecimento de processos inflamatórios através da síntese de eicosanóides (Needleman et al., 1986) e estão relacionadas a vários processos patológicos que ocorrem em humanos, tais como doenças inflamatórias degenerativas, mal de Alzheimer, mal de Parkinson e esquizofrenia (Nojonen et al., 1993; Ross et al., 1997; Ross et al., 2001; Bazan et al., 2002).

1.1.2 Metaloproteases

Além das PLA₂s, outros importantes componentes dos venenos botrópicos são as metaloproteases ou SVMPs (*Snake Venom Metalloproteases*) (Ramos & Selistre-de-Araújo, 2006). Estas moléculas são enzimas elipsoidais multimodulares que podem ser classificadas, de acordo com o número e tipo de domínios que apresentam, em quatro classes distintas: P-I, P-II, P-III e P-IV (Bjarnason & Fox, 1994; Fox & Serrano, 2005). As moléculas de classe P-I são constituídas por uma seqüência polipeptídica sinalizadora, um pró-domínio e um domínio catalítico (também conhecido como domínio metaloprotease). As demais classes são caracterizadas pela adição progressiva de novos domínios C-terminais àqueles que já constituem as moléculas de classe P-I: as metaloproteases de classe P-II apresentam mais um domínio do tipo desintegrina; as de classe P-III um domínio *disintegrin-like* e mais outro rico em cisteínas (*cysteine-rich domain*); e aquelas da

classe P-IV um domínio *disintegrin-like*, um rico em cisteínas e outro classificado como *C-type lectin-like* (Ramos & Selistre-de-Araújo, 2006).

Todas as SVMPs fazem parte da subfamília das reprotinas, um grupo de proteínas que é completado pelas ADAMs (*A Disintegrin And Metalloprotease-homologous proteins*), enzimas que pertencem a uma categoria específica de metaloproteases encontradas até o momento em apenas alguns tipos de organismos (entre os quais incluem-se também espécies de mamíferos) (Jia et al., 1996). As SVMPs e ADAMs são classificadas dentro da mesma subfamília por compartilharem um *motif* de ligação de zinco (Zn^{++}) estruturalmente similar (HEBxHxBGBxHD) (Ramos & Selistre-de-Araújo, 2006). Por sua vez, as reprotinas fazem parte do clã das Metzincinas, cujas moléculas apresentam um resíduo de metionina presente em um β -turn localizado junto ao *motif* de ligação do Zn^{++} (Gomis-Rüth, 2003).

O papel principal das SVMPs na fisiopatologia do envenenamento está relacionado à indução de processos hemorrágicos locais e sistêmicos (Matsui et al., 2000), apesar de certas moléculas pertencentes a este grupo de enzimas não provocarem hemorragia (Ahmed et al., 1990; Toombs, 2001; Ramos et al., 2003). Estes processos hemorrágicos originam-se a partir de alterações bioquímicas e biofísicas da estrutura dos vasos sanguíneos provocadas pela ação das SVMPs, responsáveis pela hidrólise seletiva de importantes ligações peptídicas de componentes da membrana basal, tais como a laminina, fibronectina e colágeno do tipo IV (Gong et al., 1998; Gutiérrez & Rucavado, 2000; Rodrigues et al., 2000; Kawano et al., 2002). Além disso, as SVMPs também são capazes de afetar o processo de coagulação sanguínea através da ativação e/ou quebra do fibrinogênio, fibrinólise e modulação da atividade plaquetária (Ouyang et al., 1992; Kamiguti et al., 1996; Markland, 1996; Francischetti et al., 1998; White, 2005). Portanto, a partir destas informações, é possível concluir que as SVMPs exercem sua atividade hemorrágica através de diferentes mecanismos bioquímicos. Neste sentido, importantes correlações têm sido estabelecidas entre os domínios estruturais das SVMPs e certas atividades relacionadas às propriedades hemorrágicas destas moléculas. As SVMPs de classe P-III são classificadas como as mais potentes toxinas hemorrágicas isoladas de venenos de serpentes, devido ao papel desempenhado pelos domínios adicionais nos processos hemorrágicos locais e sistêmico (Bjarnason & Fox, 1994; Fox & Serrano, 2005). Outros estudos estruturais mais recentes envolvendo SVMPs hemorrágicas e não-hemorrágicas sugeriram que modificações pós-traducionais como a glicosilação de determinados sítios protéicos podem contribuir para o incremento da atividade hemorrágica de certas moléculas (Ramos & Selistre-de-Araújo, 2006).

Devido a estas e outras atividades bioquímicas, as SVMPs também apresentam um amplo potencial de uso farmacológico e biotecnológico. Assim, as SVMPs podem ser empregadas, por exemplo, como poderosos agentes trombolíticos. Com este fim, a fibrolase, uma metaloprotease

fibrinolítica de *Agkistrodon contortrix contortrix*, foi utilizada em diversos ensaios pré-clínicos e clínicos que envolveram o estudo de seu potencial antitrombótico (Ramos & Selistre-de-Araújo, 2006). Além destas possíveis aplicações clínicas, estas enzimas também podem ser utilizadas como ferramentas em estudos moleculares e para o *design* de inibidores de metaloproteases em geral.

1.2 Propriedades bioquímicas da BthA-I e importância do estudo estrutural experimental de sua forma nativa e do complexo BthA-I/pBPB

A BthA-I é uma Asp49-PLA₂ ácida (pI = 4,3) não-letal recentemente isolada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (Andrião-Escarso et al., 2000). Esta PLA₂ é desprovida de atividade miotóxica ou citotóxica e possui um poder de catálise três a quatro vezes superior a outras PLA₂s básicas miotóxicas presentes no veneno de *Bothrops jararacussu* (BthTX-I e II) ou em outros venenos de serpentes do gênero *Bothrops* (Andrião-Escarso et al., 2002). Além de apresentar estas características peculiares, a BthA-I também é capaz de induzir edema dependente de tempo (apesar de ser atóxica), reduzir a pressão arterial em ratos e inibir a agregação plaquetária (Andrião-Escarso et al., 2002).

As atividades bioquímicas particulares da BthA-I a tornam um alvo interessante para a realização de estudos estruturais que possam eventualmente revelar relações estruturais/funcionais e, conseqüentemente, levantar hipóteses a respeito dos mecanismos de ação desta proteína e de outras PLA₂s ainda não completamente elucidados. Um outro caminho bastante utilizado para a obtenção de dados referentes ao funcionamento das PLA₂s tem sido o de se analisar os complexos formados entre estas proteínas e diversos tipos de ligantes. De maneira geral, o papel dos ligantes nestes complexos é o de inibir de forma completa ou parcial as propriedades farmacológicas das PLA₂s, revelando a natureza das interações existentes entre as moléculas inibidoras e seus sítios protéicos de ligação. Recentemente foi observado que a alquilação dos resíduos His48 das PLA₂s pelo brometo de p-bromofenacila (pBPB) leva à supressão da atividade catalítica destas proteínas (inclusive da BthA-I) e à diminuição de seus efeitos tóxicos e farmacológicos (Rodrigues et al., 1998; Soares et al., 2000; Andrião-Escarso et al., 2002).

Com base nestas informações, é possível notar que o estudo estrutural da forma nativa da BthA-I e de sua associação com o pBPB não somente servirá para aumentar o conhecimento científico a respeito das PLA₂s, como também poderá contribuir para o desenvolvimento de medicamentos mais eficazes que atuem sobre doenças provocadas ou agravadas pela ação destas moléculas.

1.3 Características moleculares da BjussuMP-I e técnicas de bioinformática utilizadas para a realização de estudos teóricos relacionados ao seu domínio catalítico

A BjussuMP-I, uma metaloprotease hemorrágica de classe P-III de peso molecular aproximado de 60 kDa, foi recentemente isolada a partir do veneno de *Bothrops jararacussu* (Mazzi et al., 2004). Esta molécula é capaz de promover a lise de aglomerados de fibrina e inibir a agregação plaquetária induzida pelo colágeno e ADP (Mazzi et al., 2004), o que a torna uma potencial ferramenta clínica a ser utilizada no tratamento de doenças e distúrbios que afetam o sistema de coagulação sanguínea. A BjussuMP-I também foi a primeira metaloprotease de classe P-III a apresentar um domínio desintegrina típico (Mazzi et al., 2006). Geralmente, tais domínios desintegrina são encontrados em metaloproteases de classe P-II e apresentam um *motif* RGD (Arg-Gly-Asp), o qual está relacionado à interação destas toxinas com integrinas dos tipos $\beta 1$ (ex. $\alpha 5\beta 1$, receptor de fibronectina) e $\beta 3$ (ex. $\alpha IIb\beta 3$, receptor de fibrinôgio de plaquetas) (Rahman et al., 2000; Okuda & Morita, 2001; Yahalom et al., 2002). Já em metaloproteases de classe P-III, a presença de *motifs* alternativos (exs.: DCD (Asp-Cys-Asp) e ECD (Glu-Cys-Asp)) faz com que os domínios onde tais estruturas encontram-se inseridas sejam considerados como do tipo *disintegrin-like* (Paine et al., 1992; Hite et al., 1994; Zhou et al., 1995; Selistre-de-Araújo et al., 1997).

Os estudos de cunho teórico deste trabalho tiveram como objeto de análise o domínio catalítico da BjussuMP-I devido ao reconhecido papel exercido por tais domínios na interrupção do equilíbrio hemostático e na hidrólise de inúmeras proteínas (plasmáticas, da matriz extracelular e de superfície celular) causadas pelas SVMPs. Topologicamente, tais domínios são classificados como do tipo α/β , apresentando cinco fitas β (sendo a quarta delas antiparalela em relação às demais) e cinco α -hélices (Gomis-Rüth, 2003; Watanabe et al., 2003). Seus sítios catalíticos são caracterizados pela presença de três resíduos de histidina responsáveis pela coordenação do íon Zn^{++} , o qual, por sua vez, atua em conjunto com um resíduo de glutamato para realizar a hidrólise dos substratos (Stöcker & Bode, 1995). A concavidade formada pelos resíduos do sítio catalítico também divide de forma clara o domínio catalítico das SVMPs em duas partes bem determinadas: um subdomínio N-terminal maior e um subdomínio C-terminal menor, que são mantidos unidos por duas ou três pontes dissulfeto (Stöcker et al., 1995).

Para a execução da análise estrutural teórica do domínio catalítico da BjussuMP-I, um modelo inicial foi gerado através de uma modelagem molecular utilizando técnicas de *threading*, logo após a seleção de modelos estruturais experimentais adequados nos bancos de dados *on-line* de proteínas disponíveis. Este método de modelagem molecular baseia-se no fato de que proteínas que apresentam relações funcionais e evolutivas podem guardar grande similaridade entre o *fold* de determinados *motifs* ou entre a totalidade de seus *folds* e arquitetura (Chothia & Lesky, 1986; Holm

& Sander, 1993, 1995). Desta forma, os métodos de *threading* (igualmente denominados *fold recognition techniques*) não apenas se baseiam na identidade seqüencial dos modelos estruturais experimentais selecionados, mas também no *fold* das moléculas envolvidas (a predição da estrutura secundária no caso da molécula-alvo, o domínio catalítico da BjussuMP-I, é realizada com base em sua seqüência de resíduos de aminoácidos). Em seguida, o modelo inicial do domínio catalítico da BjussuMP-I foi refinado por meio de um processo de simulação de dinâmica molecular, que é capaz de refinar a estrutura tridimensional de uma macromolécula em solução. Estes cálculos clássicos de dinâmica molecular são baseados em campos de força conservativos e levam em consideração as propriedades físico-químicas e bioquímicas de átomos e moléculas para determinar as coordenadas cartesianas finais dos componentes dos sistemas moleculares de interesse (Berendsen et al., 1995). Concomitantemente, a realização de uma análise filogenética do domínio catalítico da BjussuMP-I forneceu pistas bastante interessantes a respeito da origem evolutiva das metaloproteases e dos motivos pelos quais estas enzimas apresentam características tão distintas entre si.

2. OBJETIVOS

Este trabalho foi dividido, basicamente, em duas etapas principais, que são relacionadas a seguir:

1. Elucidação e análise, por meio da técnica de cristalografia, das estruturas tridimensionais da BthA-I nativa e de seu complexo com o inibidor pBPB. O estudo de tais estruturas experimentais tem por objetivo identificar possíveis relações estruturais/funcionais que possam fornecer informações a respeito dos mecanismos bioquímicos desta proteína e de outras Asp49-PLA₂s e indicar as prováveis bases estruturais relativas à capacidade inibitória do pBPB frente às PLA₂s.
2. Construção e análise, com base em métodos computacionais teóricos, da estrutura tridimensional do domínio catalítico BjussuMP-I, com a finalidade de estabelecer relações estruturais/funcionais entre as SVMPs e outras proteínas da família das metaloproteases. Adicionalmente, árvores filogenéticas do domínio catalítico da BjussuMP-I foram geradas e analisadas de modo a permitir a elaboração de uma hipótese relativa à possível origem e história evolutiva desta proteína.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Estudos estruturais experimentais realizados com a BthA-I nativa e o complexo BthA-I/pBPB

3.1.1 Isolamento, clonagem do cDNA, seqüenciamento e modificação química da BthA-I e BjussuMP-I

A BthA-I foi purificada por meio de uma cromatografia de troca iônica em uma coluna *CM-Sepharose*, seguida por uma cromatografia de troca-reversa em uma coluna *RP-HPLC C-18* (Andrião-Escarso et al., 2002). A seqüência de resíduos de aminoácidos da BthA-I foi deduzida com base no cDNA obtido a partir do RNA presente nas glândulas de veneno da serpente, sendo em seguida depositada no GenBank com o código AY145836 (Roberto et al., 2004a, 2004b). A modificação química do resíduo His48 da BthA-I pelo pBPB foi executada como descrito por Andrião-Escarso et al. (2002). As amostras de pBPB utilizadas para a realização destes procedimentos foram adquiridas junto à *Sigma Chemical Company*[®].

A purificação da BjussuMP-I foram realizados através de uma cromatografia de troca iônica em uma coluna *Phenyl Sepharose CL-4B*, seguida por uma cromatografia de fase-reversa em uma coluna *RP-HPLC C-18* (Mazzi et al., 2004). A seqüência primária da BjussuMP-I foi obtida de forma análoga à da BthA-I e depositada no GenBank com o código DQ408681 (Mazzi et al., 2006).

Todas as etapas citadas e outras relacionadas a este item foram executadas pela equipe do Prof. Dr. Andreimar Martins Soares, do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP/Ribeirão Preto-SP.

3.1.2 Experimentos de cristalização

3.1.2.1 BthA-I nativa

Os cristais da BthA-I nativa (Figura 2) foram obtidos utilizando-se a técnica de difusão de vapor do tipo *hanging drop* (MacPherson, 1982). Os experimentos de cristalização com a BthA-I nativa foram realizados a partir de uma solução da proteína com a concentração de 12,0 mg/ml, preparada a partir da dissolução de amostras liofilizadas em água ultra-pura. Após um período aproximado de 30 dias sob temperatura constante de 291 K, cristais da proteína formaram-se sob a

seguinte condição de cristalização: 0,2 M de sulfato de amônio e 22,0% (w/v) de polietilenoglicol 6000.

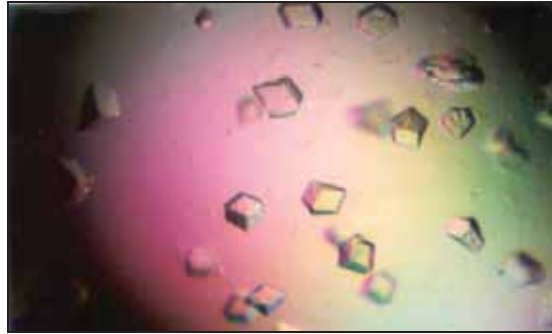


Figura 2 – Cristais da BthA-I nativa.

3.1.2.2 Complexo BthA-I/pBPB

O crescimento dos cristais do complexo BthA-I/pBPB deu-se através da utilização do método de difusão de vapor do tipo *hanging-drop* (McPherson, 1982). As amostras liofilizadas do complexo BthA-I/pBPB foram diluídas em água ultra-pura e um *screening* inicial baseado no método de matriz esparsa de Jancarik & Kim (1991) foi realizado devido ao fato de que cristais do complexo BthA-I/pBPB não puderam ser obtidos a partir das condições de cristalização da BthA-I nativa. As gotas onde se formaram os cristais foram preparadas a partir de uma solução do complexo BthA-I/pBPB com concentração de 10,0 mg/ml e de outra solução contendo 0,2 M de cloreto de magnésio, 32,0% (w/v) de polietilenoglicol 4000 e 0,1 M de Tris-HCl pH8,5 (Takeda et al., 2004). Os melhores cristais foram obtidos após um período de crescimento de 10 a 14 dias sob uma temperatura de 291 K (Figura 3).

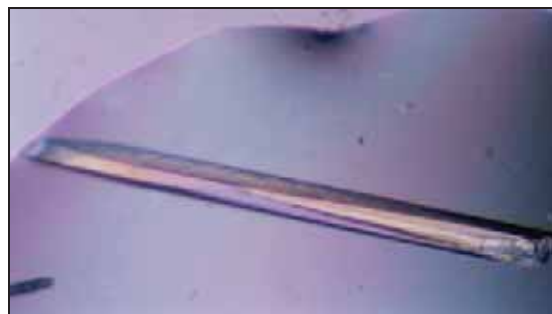


Figura 3 – Cristal do complexo BthA-I/pBPB.

3.1.3 Experimentos de difração de raios-X

Os experimentos de difração de raios-X realizados com os cristais da BthA-I nativa e do complexo BthA-I/pBPB foram executados nas instalações do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas-SP) com a utilização de radiação com comprimento de onda (λ) de 1,38 Å. Todos os cristais submetidos aos experimentos de difração foram acondicionados em *loops* de *nylon* e congelados com o emprego de um fluxo de nitrogênio (Oxford Cryosystems[®]) à temperatura de 100 K. As informações referentes à coleta dos dados de difração de raios-X e ao processamento das imagens da BthA-I nativa e do complexo BthA-I/pBPB, realizado por intermédio dos programas DENZO e SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1997), são apresentadas na Tabela 1.

3.1.4 Determinação estrutural e refinamento dos modelos experimentais tridimensionais

As estruturas cristalinas da BthA-I nativa dimérica (d-BthA-I) e do complexo BthA-I/pBPB foram elucidadas pelo método da substituição molecular, utilizando-se o programa AMoRe (Navaza, 1994) e as coordenadas tridimensionais de uma forma monomérica (m-BthA-I) desta mesma proteína obtida paralelamente pelo doutorando Mário T. Murakami, sob supervisão do Prof. Dr. Raghuvir K. Arni (código PDB 1umv) (Magro et al., 2004). Os modelos escolhidos após a execução da substituição molecular foram aqueles que apresentaram os melhores resultados de correlação e *R-factor* calculados pelo programa AMoRe. Após um ciclo de refinamento do tipo *simulated annealing* executado com o programa CNS (Brünger et al., 1998), as densidades eletrônicas de ambos os modelos foram inspecionadas por meio do programa O (Jones et al., 1990) para que a seqüência de resíduos da BthA-I, como determinada pela análise de seu cDNA (Roberto et al., 2004a, 2004b), pudesse ser inserida. No caso do complexo BthA-I/pBPB, o resíduo His48 da BthA-I nativa foi substituído por seu equivalente quimicamente modificado. Os arquivos de dicionário utilizados pelos programas CNS e O relativos ao complexo foram gerados através dos programas XPLO2D e MOLEMAN2 (Kleywegt & Jones, 1997). Ambos os modelos foram submetidos a vários ciclos alternados de modelagem manual e refinamento cristalográfico realizados, respectivamente, através dos programas O e CNS. Após a realização de cada ciclo de refinamento cristalográfico (correspondente a um refinamento de posição e dos fatores de temperatura isotrópicos individuais precedidos por refinamentos do fator de temperatura geral anisotrópico e correção do *bulk* de solvente), os modelos experimentais da d-BthA-I e do complexo BthA-I/pBPB foram aperfeiçoados com base em seus respectivos valores de *R_{free}-factor* (Brünger et

al., 1992). Moléculas de solvente foram adicionadas e refinadas também com o emprego do programa CNS. As estatísticas de refinamento são mostradas na Tabela 2.

3.1.5 Avaliação dos modelos cristalográficos da BthA-I nativa (d-BthA-I) e do complexo BthA-I/pBPB e superposição estrutural das Asp49-PLA₂s

As qualidades estereoquímicas dos modelos cristalográficos da BthA-I nativa (d-BthA-I) e do complexo BthA-I/pBPB foram avaliadas com o emprego do programa PROCHECK v.3.5.4 (Laskowski et al., 1993). As superposições estruturais entre os átomos C_α das Asp49-PLA₂s foi realizada através do programa O (Jones et al., 1990). As coordenadas estruturais dos modelos cristalográficos da d-BthA-I e do complexo BthA-I/pBPB foram depositadas no *RCSB Protein Data Bank* (PDB), respectivamente, sob os códigos de identificação 1u73 e 1z76.

Tabela 1 – Dados dos experimentos de difração de raios-X realizados com a BthA-I nativa dimérica (d-BthA-I) e o complexo BthA-I/pBPB.

	d-BthA-I	BthA-I/pBPB
Cela unitária (Å)	a = 33,19; b = 63,14; c = 47,40; β = 102,3°	a = 41,0; b = 83,2; c = 45,6; β = 112,7°
Grupo espacial	P2 ₁	P2 ₁
Resolução de coleta (Å)	29,7 - 1,9 (2,02 - 1,9) ^a	40,0 - 1,85 (1,95 - 1,85) ^a
Reflexões únicas	14151 (2084) ^a	22730 (3390) ^a
Completeza (%)^b	93,3 (87,7) ^a	94,4 (91,2) ^a
R_{merge}^c (%)	4,5 (29,3) ^a	6,0 (37,1) ^a
Temperatura de coleta (K)	100	100
I/σ	20,1 (5,0) ^a	25,8 (3,5) ^a
Redundância	3,5 (3,4) ^a	11,3 (5,6) ^a

^a Números entre parênteses representam os valores para a faixa de mais alta resolução; ^b Porcentagem do número total de reflexões possível de ser obtido a esta resolução; ^c $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} (\sum_i (|I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle|))}{\sum_{hkl,i} \langle I_{hkl} \rangle}$, onde $I_{hkl,i}$ é a intensidade de uma medida individual com os índices de Miller h, k and l, e $\langle I_{hkl} \rangle$ é a intensidade média de cada reflexão. Calculado para $I > -3\sigma(I)$.

Tabela 2 – Estatísticas de refinamento da BthA-I nativa dimérica (d-BthA-I) e do complexo BthA-I/pBPB.

	d-BthA-I	BthA-I/pBPB
Resolução do refinamento (Å)	50,0 - 1,9	50,0 - 1,85
R_{cryst}^b (%)	19,0 (23,8) ^a	20,2 (28,9) ^a
R_{free}^c (%)	24,7 (28,5) ^a	25,5 (33,8) ^a
Número de átomos (exceto hidrogênios):		
Proteína	1900	1900
H₂O	381	290
Fator de temperatura médio (Å²)		
Geral^e	27,8	25,5
Cadeia principal	24,4	23,2
Cadeias laterais	26,4	24,8
Moléculas de água	40,1	39,9
Desvio quadrático médio (r.m.s) dos valores ideais^d		
Comprimento das ligações (Å)	0,005	0,034
Ângulo das ligações (°)	1,3	2,1
Gráfico de Ramachandran^e		
Resíduos (regiões mais favoráveis) (%)	90,7	93,5
Resíduos (regiões permitidas) (%)	9,3	6,5
Resíduos (regiões não permitidas) (%)	0,0	0,0
Erros nas coordenadas (Å)		
Gráfico de Luzzati (cross-validated Luzzati plot)	0,20 (0,28)	0,22 (0,28)
SIGMAA (cross-validated SIGMAA)	0,22 (0,22)	0,12 (0,15)

^a Números entre parênteses representam a faixa de mais alta resolução; ^b $R_{cryst} = \sum_{hkl} (|F_{obs_{hkl}}| - |F_{calc_{hkl}}|) / |F_{obs_{hkl}}|$, onde $|F_{obs_{hkl}}|$ e $|F_{calc_{hkl}}|$ são as amplitudes dos fatores de estrutura observados e calculados; ^c R_{free} é equivalente ao R_{cryst} (calculado com base em 5,0% do total de reflexões obtidas); ^d Calculado com o programa CNS (Brünger et al., 1998); ^e Calculado com o programa PROCHECK (Laskowski et al., 1993).

3.2 Estudos teóricos realizados com o domínio catalítico da BjussuMP-I

3.2.1 Identificação de seqüências protéicas em bancos de dados

A seqüência de resíduos de aminoácidos do domínio catalítico da BjussuMP-I foi utilizada para a busca de seqüências homólogas nos bancos de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e do *Universal Protein Resource* (UniProt) (<http://www.pir.uniprot.org>). O programa BLAST P foi empregado para identificar seqüências homólogas no banco de dados do NCBI, utilizando-se uma matriz BLOSUM45 e os demais parâmetros padrão definidos para esta ferramenta de busca. O maior *e-value* das seqüências

selecionadas através do BLAST P foi de 1e-28. A busca realizada no banco de dados do UniProt foi executada através do *website* Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>). A relação das seqüências de proteínas selecionadas e seus respectivos códigos de identificação são mostrados na Tabela 3.

3.2.2 Alinhamento das seqüências e análise filogenética

O alinhamento das seqüências selecionadas utilizado para a realização da análise filogenética do domínio catalítico da BjussuMP-I foi executado pelo programa ClustalX v.1.83 (Thompson et al., 1997). O alinhamento final de todas as seqüências utilizadas resultou de alinhamentos múltiplos e par-a-par realizados com base em matrizes PAM. As penalidades utilizadas para a abertura e extensão de *gaps* foram aquelas definidas como padrão para o programa.

As árvores filogenéticas foram geradas pelo programa MEGA v.2.1 (Kumar et al., 2001), através do emprego do método de *Neighbor-Joining* com os seguintes parâmetros: *complete deletion*, método de correção de Poisson e *bootstrap* com 2000 replicatas. As seqüências utilizadas nesta análise e seus respectivos códigos de identificação de quatro letras presentes nas árvores filogenéticas são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 – Seqüências homólogas ao domínio catalítico da BjussuMP-I encontradas nos bancos de dados do NCBI e UniProt.

Seqüências (códigos de identificação de quatro letras)	Espécie ou subespécie	Código do banco de dados
Família Viperidae		
Metalloprotease BOJUMET I (Bjus)	<i>Bothrops jararacussu</i>	gb AAP78952.1
Metalloprotease BaP1 (Basp)	<i>Bothrops asper</i>	pdb 1ND1
Metalloprotease precursor (Gsax)	<i>Gloydius saxatilis</i>	gb AAP20642.1
Insularinase and insularin precursor (Bins)	<i>Bothrops insularis</i>	gb AAU47334.1
Piscivostatin beta chain (Apis)	<i>Agkistrodon piscivorus piscivorus</i>	dbj BAC55947.1
Metalloprotease (Ghal)	<i>Gloydius halys</i>	gb AAD02655.1
Lebetase isoform Le-4 (Mleb-1)	<i>Macrovipera lebetina</i>	gb AAY45880.1
Non-hemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease (Bneu)	<i>Bothrops neuwiedi</i>	gb AAF28364.1
Jararhagin (Bjar)	<i>Bothrops jararaca</i>	emb CAA48323.1
Hemorrhagic metalloprotease HR1b (Tfla-1)	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	dbj BAB92014.1
Adamalysin II (Cada)	<i>Crotalus adamanteus</i>	pdb 1IAG
Metalloprotease 4 (Bgab)	<i>Bitis gabonica</i>	gb AAR19273.1
Metalloprotease atrolysin E (Catr)	<i>Crotalus atrox</i>	gb AAB23201.1
Stejnihagin-A (Vste-1)	<i>Viridovipera stejnegeri</i>	gb ABA40760.1
Acutolysin A (Dacu-1)	<i>Deinagkistrodon acutus</i>	gb AAD51824.1

Tabela 3 – Sequências homólogas ao domínio catalítico da BjussuMP-I encontradas nos bancos de dados do NCBI e UniProt.

Continuação		
Seqüências (códigos de identificação de quatro letras)	Espécie ou subespécie	Código do banco de dados
Berythactivase (Bery)	<i>Bothrops erythromelas</i>	gb AAL47169.1
Stejnihagin-B (Vste-2)	<i>Viridovipera stejnegeri</i>	gb ABA40759.1
Metalloprotease (Epyr)	<i>Echis pyramidum</i>	emb CAA55566.1
Trimutase precursor (Pmuc)	<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	gb AAB94016.1
Zinc metalloprotease flavoridin precursor (Tfla-2)	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	sp P18619
Prothrombin activator EoMP06 (Eoce)	<i>Echis ocellatus</i>	gb AAP92424.1
Acutolysin C (Aacu)	<i>Agkistrodon acutus</i>	sp P60244
Coagulation factor X activating enzyme heavy chain (Vrus)	<i>Vipera russelli</i>	gb AAB22477.1
Aculysin-1 (Dacu-2)	<i>Deinagkistrodon acutus</i>	emb CAB46429.1
Metalloprotease precursor (Cmol)	<i>Crotalus molossus molossus</i>	UniProt/TrEMBL Q8JJ51
Hemorrhagic factor II (Lmut)	<i>Lachesis muta muta</i>	UniProt P22796
Metalloprotease precursor (Acon)	<i>Agkistrodon contortrix</i>	gb AAC59703
Fibrolase (Mleb-2)	<i>Macrovipera lebetina</i>	sp P83255
Família Elapidae		
Mocarhagin 1 (Nmos)	<i>Naja mossambica mossambica</i>	gb AAM51550.1
Hemorrhagic metalloprotease kaouthiagin (Nkao)	<i>Naja kaouthia</i>	UniProt/Swiss-Prot P82942
Cobrin precursor (Nnaj)	<i>Naja naja</i>	UniProt/TrEMBL Q9PVK7
Metalloprotease precursor (Amic-1)	<i>Atractaspis microlepidota andersoni</i>	gb AAF01040.1
Metalloprotease precursor (Amic-2)	<i>Atractaspis microlepidota andersoni</i>	gb AAF01041.1
Outras seqüências relacionadas		
ADAM metallopeptidase domain 28 (Ggal-1)	<i>Gallus gallus</i>	ref NP_001026058.1
Protein similar to ADAM 13 (Ggal-2)	<i>Gallus gallus</i>	ref XP_420886.1
ADAM metallopeptidase domain 9 (Ggal-3)	<i>Gallus gallus</i>	ref NP_001026567.1
Protein similar to a disintegrin and metalloprotease domain 21 preproprotein (Ggal-4)	<i>Gallus gallus</i>	ref XP_428276.1
Disintegrin and metalloprotease domain 28 isoform 1 (Mmus-1)	<i>Mus musculus</i>	ref NP_034212.1
Disintegrin and metalloprotease domain 8 (Mmus-2)	<i>Mus musculus</i>	ref NP_031429.1
Unnamed protein product (Mmus-3)	<i>Mus musculus</i>	dbj BAE27990.1
Disintegrin and metalloprotease domain 7 (Mmus-4)	<i>Mus musculus</i>	ref NP_031428.1
ADAM metallopeptidase domain 12 isoform 2 preproprotein (Hsap-1)	<i>Homo sapiens</i>	gb AAH60804.1
Metalloprotease-disintegrin meltrin beta (Hsap-2)	<i>Homo sapiens</i>	gb AAG50282.1
ADAM metallopeptidase domain 8 precursor (Hsap-3)	<i>Homo sapiens</i>	ref NP_001100.2
ADAM metallopeptidase domain 28 isoform 1 preproprotein (Hsap-4)	<i>Homo sapiens</i>	ref NP_055080.1
Disintegrin and metalloprotease domain 7 (Hsap-5)	<i>Homo sapiens</i>	ref NP_003808.1
Unknown protein (Xlae-1)	<i>Xenopus laevis</i>	gb AAH91726.1
ADAM 13 (Xlae-2)	<i>Xenopus laevis</i>	gb AAB51194.1
Metalloprotease-disintegrin (Xlae-3)	<i>Xenopus laevis</i>	gb AAC61846.1
Protein similar to a disintegrin and metalloprotease domain 28 isoform 1 preproprotein (Drer-1)	<i>Danio rerio</i>	ref XP_686264.1
Protein similar to a disintegrin and metalloprotease domain 8 (Drer-2)	<i>Danio rerio</i>	ref XP_684931.1
Disintegrin and metalloprotease domain 8 (Drer-3)	<i>Danio rerio</i>	ref NP_956931.1
SD04095p (Dmel)	<i>Drosophila melanogaster</i>	gb AAO39439.1
Hypothetical protein C04A11.4 (Cele)	<i>Caenorhabditis elegans</i>	emb CAA94147.1

3.2.3 Modelagem molecular

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://protevo.eb.tuebingen.mpg.de/toolkit>), foi utilizado para a construção dos alinhamentos realizados entre o domínio catalítico da BjussuMP-I e outras seqüências homólogas depositadas nos *RCSB Protein Data Bank* (PDB). O modelo tridimensional cristalográfico da BaP1 – uma metaloprotease do veneno de *Bothrops asper* (código PDB: 1nd1) (Watanabe et al., 2003) – foi selecionado e utilizado pelo programa MODELLER 8v2 (Marti-Renom et al., 2000) para a construção do modelo teórico inicial do domínio catalítico da BjussuMP-I. O íon Zn^{++} e as águas estruturais presentes na BaP1 foram adicionados ao modelo pelo programa MODELLER 8v2.

Os modelos estruturais teóricos da mocarragina 1 de *Naja mossambica mossambica* (Nmos) e de uma proteína hipotética* (Xlae-1) e da ADAM 13 (Xlae-2) de *Xenopus laevis* foram também gerados através do método de *threading* utilizando-se o programa *on-line* Fugue (Shi et al., 2001) (<http://www-cryst.bioc.cam.ac.uk/fugue/prfsearch.html>).

3.2.4 Simulação de dinâmica molecular

A simulação de dinâmica molecular realizada com o domínio catalítico da BjussuMP-I foi executada através do programa GROMACS (*Groningen Machine for Chemical Simulation*) v.3.3.1 (Lindahl et al., 2001), utilizando-se um sistema operacional SuSe Linux instalado em uma estação de trabalho *Dell Precision 670*[®] biprocessada (*Intel Pentium 4 Xeon 64*[®]). O modelo Simple Point Charge (SPC) foi utilizado para representar as moléculas de água explícitas (Berendsen et al., 1981) empregadas na simulação. Os grupos carregados do modelo foram ajustados para pH 7,0 e o sistema foi neutralizado por meio da adição de contra-íons. O campo de força escolhido para a simulação de dinâmica molecular foi o GROMOS 96 53a6 (Oostenbrinck et al., 2005). Todas as etapas da simulação de dinâmica molecular foram realizadas sob temperatura (298 K) e pressão constantes (1,0 bar) em uma caixa dodecaédrica truncada periódica. A distância mínima entre qualquer átomo da proteína e a parede da caixa foi fixada em 1,2 nm.

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

* Proteína possivelmente expressa pelo genoma de *Xenopus laevis* sem função conhecida.

restrição de posicionamento dos átomos da cadeia principal da proteína (método PRMD). Em seguida, outros cinco nanossegundos (ns) de cálculo foram executados para possibilitar a estabilização estrutural do modelo. Todos os passos deste protocolo foram executados com o intuito de promover o relaxamento gradual do sistema. As distâncias entre as histidinas do sítio catalítico do modelo e o íon Zn^{++} foram mantidas de acordo com os valores propostos por Andreini et al. (2005).

3.2.5 Avaliação do modelo teórico do domínio catalítico da BjussuMP-I

A qualidade estereoquímica geral do modelo teórico final do domínio catalítico da BjussuMP-I foi avaliada através dos programas PROCHECK v.3.5.4 (Laskowski et al., 1993) e ProSa2003 (Sippl, 1993). As coordenadas estruturais do modelo teórico do domínio catalítico da BjussuMP-I foram depositadas no *RCSB Protein Data Bank* (PDB) sob o código de identificação 2dx9.

3.2.6 Identificação de resíduos de superfície conservados

A identificação e localização de resíduos de superfície conservados foi realizada com o emprego do programa Chimera (Pettersen et al., 2004), com base no modelo teórico final do domínio catalítico da BjussuMP-I e nos modelos (gerados pelo método de *threading*) da mocarragina 1 de *Naja mossambica mossambica* (Nmos) e da proteína hipotética (Xlae-1) e ADAM 13 (Xlae-2) de *Xenopus laevis*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo estrutural experimental da BthA-I nativa

4.1.1 Conformação oligomérica e qualidade estereoquímica do modelo cristalográfico da BthA-I nativa dimérica (d-BthA-I)

A elucidação estrutural da BthA-I nativa mostrou que a unidade assimétrica do cristal utilizado nos experimentos de difração de raios-X era constituída por um dímero. A análise da interface dimérica da BthA-I nativa mostrou que os resíduos localizados na α -hélice h3 de cada monômero são responsáveis pela estabilização do dímero, o que ocorre por meio do estabelecimento de interações hidrofóbicas, uma ponte de hidrogênio intermolecular e uma ponte salina de 2,36 Å formada entre o átomo N ζ do resíduo Lys93 do monômero A e o átomo O2 do resíduo Asp108, localizado no monômero B (Figura 4).

A qualidade estereoquímica do modelo cristalográfico da BthA-I nativa dimérica (d-BthA-I) mostrou-se superior ao esperado para uma estrutura média com mesma resolução, uma vez que o gráfico de Ramachandran gerado a partir do modelo final não mostrou a presença de resíduos em suas regiões estereoquimicamente desfavoráveis (Figura 5). Do mesmo modo, o valor de *G-factor* geral do modelo cristalográfico da d-BthA-I calculado pelo programa PROCHECK v.3.5.4 (Laskowski et al., 1993) foi de 0,4, o que confirma a boa qualidade estereoquímica da estrutura. Sob o ponto de vista estrutural, os monômeros da BthA-I são bastante similares às demais PLA₂s da classe IIA: todas estas proteínas apresentam sete pontes dissulfetos e um alto grau de conservação de seus principais elementos de estrutura secundária. Assim, a estrutura cristalográfica de cada monômero da d-BthA-I é constituída por uma α -hélice N-terminal (h1), uma *short helix*, um *loop* de ligação do íon Ca⁺⁺, duas α -hélices anti-paralelas (h2 e h3), duas fitas β anti-paralelas (β -*wings*) e um *loop* C-terminal (Figura 6). A análise da Figura 6 também mostra a existência de uma simetria não-cristalográfica (NCS) entre os monômeros da BthA-I, determinada por uma rotação aproximada de 180° de um eixo perpendicular às hélices h3.

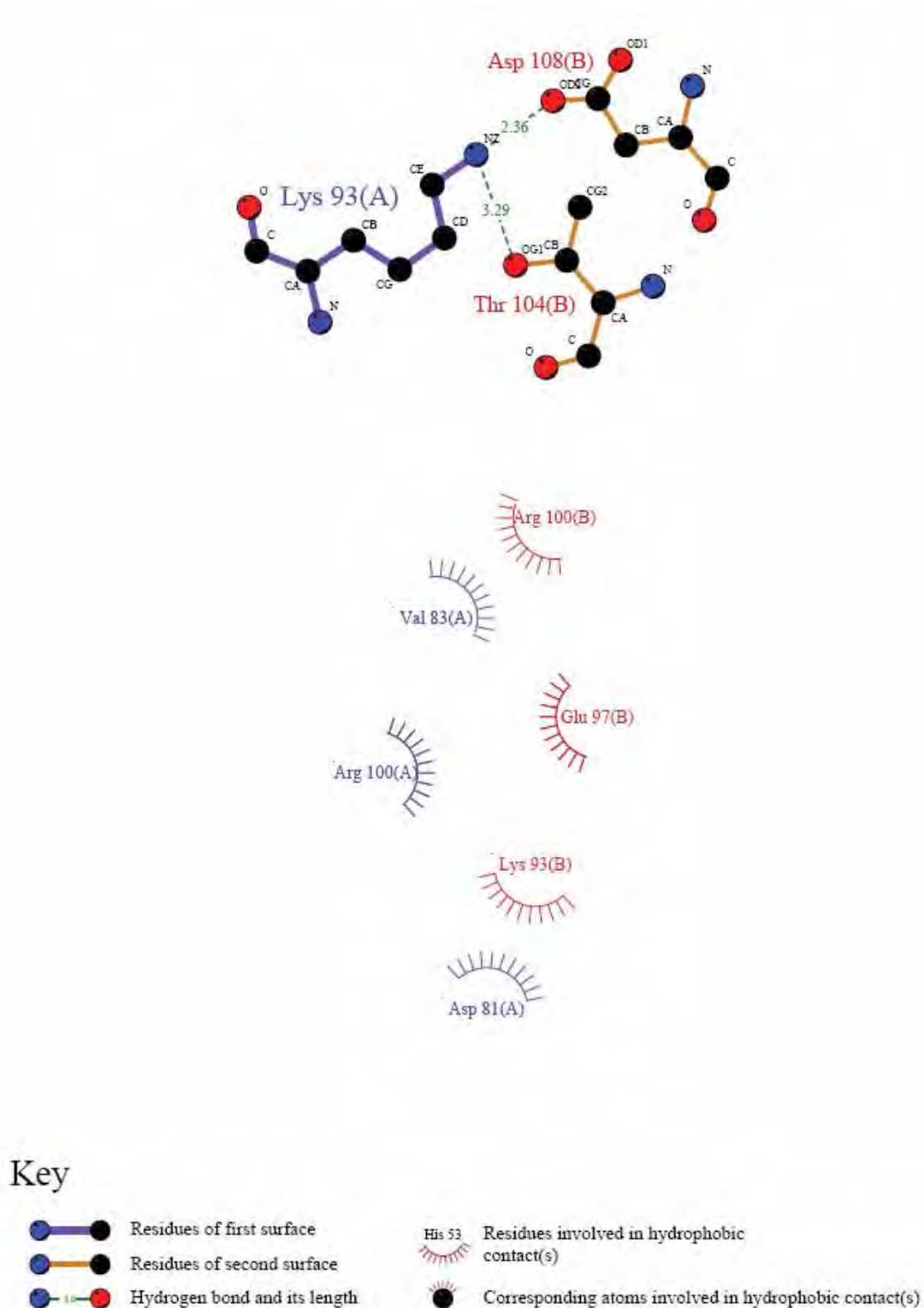
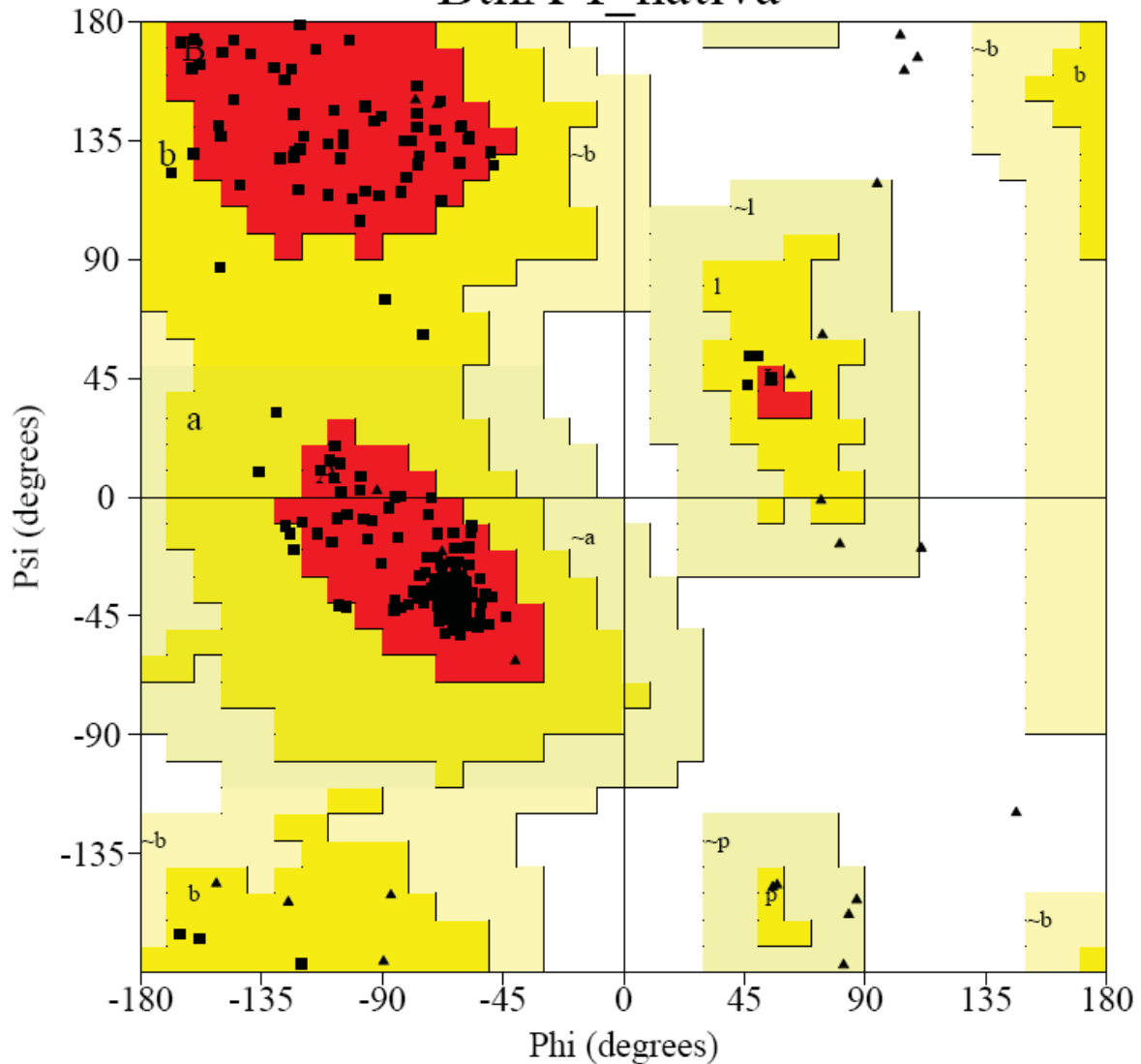


Figura 4 – Diagrama esquemático das interações presentes na interface dimérica da BthA-I nativa. Os contatos polares são representados por linhas entrecortadas e as interações hidrofóbicas por segmentos de círculo com projeções radiais. Os resíduos do monômero A estão identificados em azul e as ligações entre seus átomos são mostradas como linhas púrpuras; já os resíduos do monômero B estão identificados em vermelho e as ligações entre seus átomos são mostradas em dourado. Os átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio são representados, respectivamente, como esferas negras, azuis e vermelhas. Esta figura foi gerada através do programa LIGPLOT (Wallace et al., 1995).

PROCHECK

Ramachandran Plot

BthA-I_nativa



Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	185	90.7%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	19	9.3%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	0	0.0%
Residues in disallowed regions	0	0.0%

Number of non-glycine and non-proline residues	204	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	4	
Number of glycine residues (shown as triangles)	28	
Number of proline residues	8	

Total number of residues	244	

Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.

Figura 5 – Gráfico de Ramachandran da BthA-I nativa. Gerado através do programa PROCHECK v.3.5.4 (Laskowski et al., 1993).

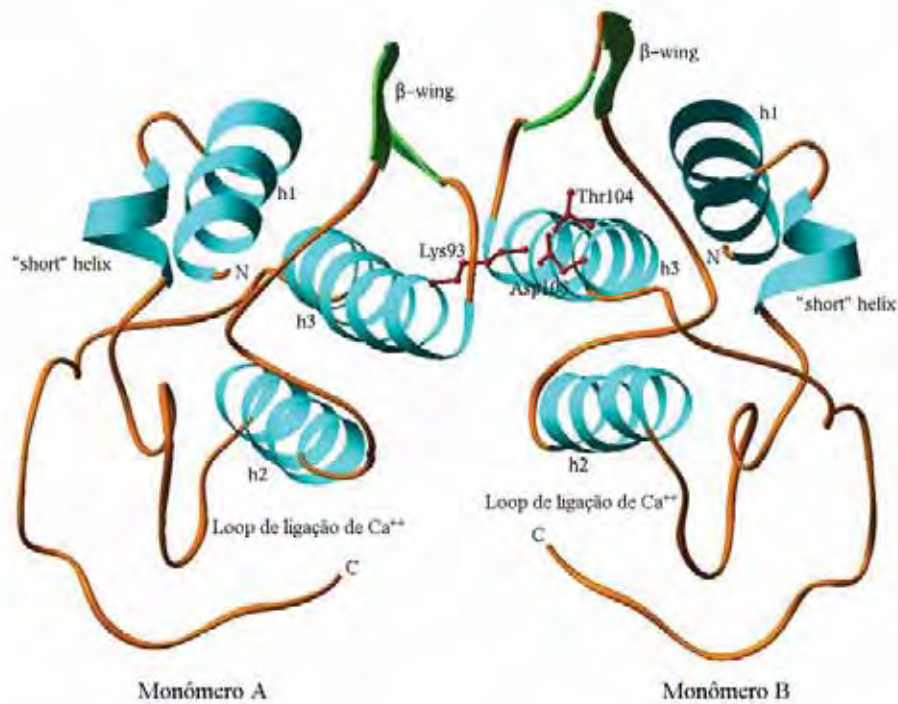


Figura 6 – Estrutura da BthA-I nativa. Os resíduos Thr104, Asp108 e Lys93 da interface dimérica são mostrados por meio de uma representação do tipo *ball-stick*. Figura gerada pelo programa RIBBONS (Carson, 1997).

4.1.2 Comparação estrutural entre as formas dimérica e monomérica da BthA-I nativa

Como anteriormente citado, de modo paralelo à execução deste estudo estrutural, o doutorando Mário T. Murakami, da equipe do Prof. Dr. Raghuvir K. Arni, elucidou as coordenadas tridimensionais de uma forma monomérica da BthA-I nativa (m-BthA-I), obtida sob uma condição distinta de cristalização (código PDB: 1umv) (Magro et al., 2004). A comparação estrutural realizada entre a m-BthA-I e a BthA-I dimérica (d-BthA-I) mostrou que os monômeros destas duas formas oligoméricas são essencialmente idênticos, já que as superposições entre os átomos C_{α} da m-BthA-I e dos monômeros que compõem a unidade assimétrica da d-BthA-I apresentaram os mesmos valores de *r.m.s.d.* (0,49 Å). Os valores médios de *B-factor* (calculados sem a adição das moléculas de solvente) dos dois modelos também são similares (25,6 Å² para a m-BthA-I e 18,6 Å² para a d-BthA-I).

Uma importante diferença entre os mapas de densidade eletrônica das formas monomérica e dimérica da BthA-I nativa diz respeito à presença de um pico proeminente detectado em uma posição central do sítio de ligação do íon Ca^{++} da m-BthA-I. De acordo com nossa hipótese, este pico é provavelmente devido à presença de um íon Na^{+} nesta posição, ao invés de um Ca^{++} , por quatro razões principais: (i) a m-BthA-I foi cristalizada na presença de íons Na^{+} ; (ii) o valor de *B-factor* do íon Na^{+} (38,1 Å²) é razoavelmente próximo ao do valor médio da estrutura (23,2 Å²) (caso

o íon Ca^{++} ocupasse essa posição, o valor de seu *B-factor* seria de $60,3 \text{ \AA}^2$); (iii) o íon Na^+ da m-BthA-I interage com o grupo carboxila da Tyr28 ($2,47 \text{ \AA}$) e com os átomos N da Gly32 ($2,88 \text{ \AA}$) e O δ 1 e O δ 2 do Asp49 ($2,6\text{\AA}$ e $2,51 \text{ \AA}$, respectivamente) (Figura 7), enquanto que o íon Ca^{++} presente em outras Asp49-PLA₂s já elucidadas interage com os grupos carboxilas de quatro diferentes resíduos e uma ou duas moléculas de água (Xu et al., 2003); e (iv) a distância entre o suposto íon Na^+ e a molécula de água mais próxima é de, aproximadamente, $4,0 \text{ \AA}$, superior, portanto, àquela da molécula de água participante da reação de catálise coordenada pelo Ca^{++} em outras Asp49-PLA₂s (Pan et al., 2001). Tal hipótese é reforçada pela existência de um íon Na^+ em posição similar na estrutura de uma PLA₂ ácida isolada do veneno de *Agkistrodon halys* Pallas modificada quimicamente por uma molécula de pBPB (Zhao et al., 1998). Esta proteína, assim como a m-BthA-I, foi também cristalizada em presença do íon Na^+ . Zhao et al. (1998) notaram que apesar do íon Na^+ interagir fortemente com três átomos de oxigênio dos grupos carbonila dos resíduos Tyr28, Gly30 e Gly32, suas interações com os átomos O δ 1 e O δ 2 do resíduo Asp49 eram mais longas que o usual. Provavelmente, as interações da molécula de pBPB com os resíduos Gly30 e Asp49 da PLA₂ ácida de *Agkistrodon halys* Pallas são responsáveis pelas diferenças estruturais existentes entre esta proteína e a forma monomérica da BthA-I nativa (m-BthA-I).

No caso da estrutura cristalográfica da d-BthA-I, não foram encontradas densidades eletrônicas compatíveis com a presença de íons nas proximidades dos sítios de ligação de Ca^{++} em qualquer de seus monômeros. Neste modelo cristalográfico foram encontradas somente moléculas de água em posições similares à do íon Na^+ da m-BthA-I. Os valores de *B-factor* destas moléculas ($33,9 \text{ \AA}^2$ e $43,5 \text{ \AA}^2$) são compatíveis com o *B-factor* médio das moléculas de água do modelo ($40,9 \text{ \AA}^2$).

Apesar da ausência do íon Na^+ na estrutura cristalográfica da d-BthA-I, as superposições entre os átomos C_α dos *loops* de ligação de Ca^{++} da m-BthA-I e dos monômeros A e B da forma dimérica da BthA-I nativa apresentaram, respectivamente, os valores de *r.m.s.d.* de apenas $0,26 \text{ \AA}$ e $0,46 \text{ \AA}$ (Figura 8). Estes valores mostram que os *loops* de ligação de Ca^{++} dos monômeros de ambas as formas oligoméricas da BthA-I nativa são muito semelhantes, apesar da ausência do íon Na^+ na estrutura cristalográfica da d-BthA-I. Estes resultados estão em concordância com a conclusão de Murakami et al. (2006) de que a ligação do íon Ca^{++} à BthA-I praticamente não ocasiona qualquer modificação estrutural nesta proteína e, possivelmente, nas demais Asp49-PLA₂s, mesmo levando-se em conta o fato de que os contatos do íon Na^+ na estrutura da m-BthA-I sejam ligeiramente diferentes daqueles do íon Ca^{++} em outras Asp49-PLA₂s (Xu et al., 2003).

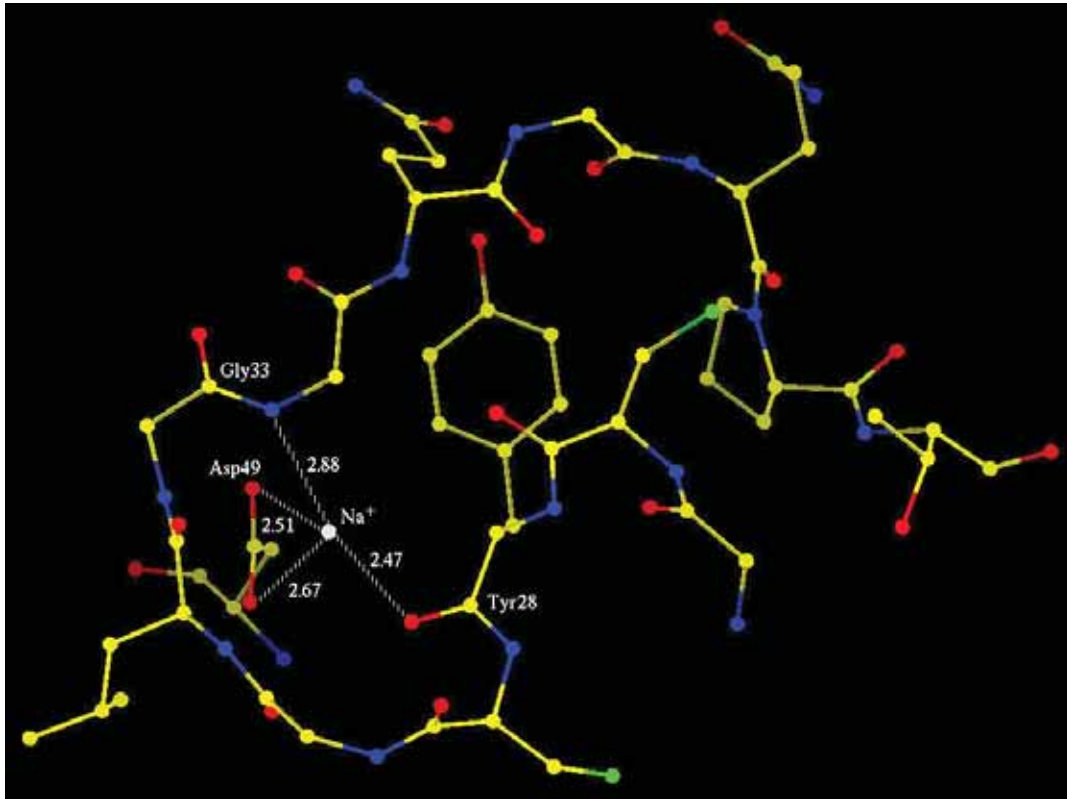


Figura 7 – Contatos do íon Na^+ localizado no *loop* de ligação de Ca^{++} da BthA-I monomérica (m-BthA-I). Figura gerada pelo programa O (Jones et al., 1990).

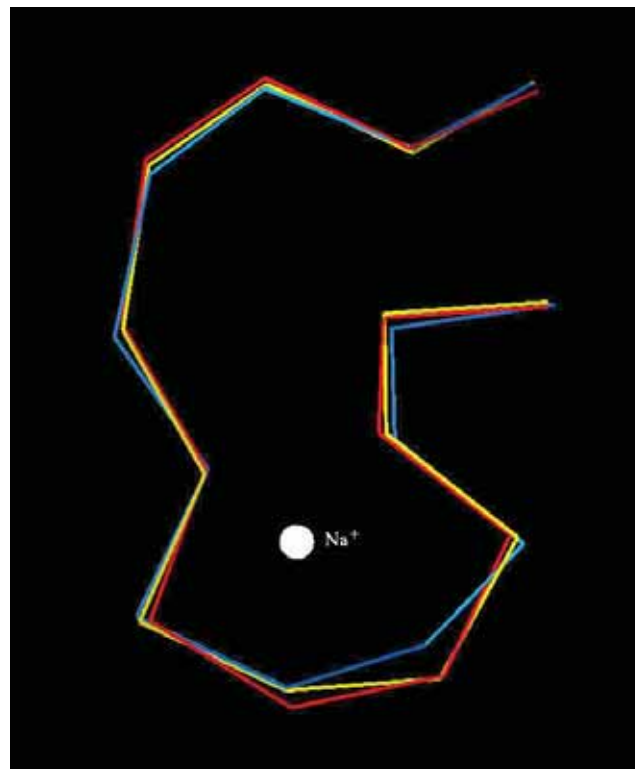


Figura 8 – Superposição dos átomos de C_α dos *loops* de ligação de Ca^{++} das formas dimérica e monomérica da BthA-I nativa. Os *loops* de ligação de Ca^{++} dos monômeros A e B da BthA-I nativa dimérica são mostrados, respectivamente, nas cores vermelha e azul, enquanto o da BthA-I nativa monomérica é apresentada na cor amarela. O íon Na^+ é representado como uma esfera branca. Figura gerada pelo programa O (Jones et al., 1990).

4.1.3 Comparação estrutural entre a BthA-I nativa e outras Asp49-PLA₂s

A Figura 9 mostra o alinhamento realizado entre a estrutura secundária da BthA-I nativa e os elementos de estrutura secundária de outras Asp49-PLA₂s de classe I ou IIA já determinadas estruturalmente que compõem os venenos de *Deinagkistrodon acutus* (Gu et al., 2002), *Daboia russeli pulchella* (Chandra et al., 2001), *Agkistrodon halys* Pallas (Zhao et al., 1998), *Agkistrodom piscivorus piscivorus* (Han et al., 1997), *Crotalus atrox* (Brunie et al., 1985) e *Naja naja sagittifera* (Jabeen et al., 2005). Apesar da identidade seqüencial entre a BthA-I e as Asp49-PLA₂s citadas variar de 71,5% (*A. p. piscivorus*) até 41,8% (*N. n. sagittifera*), a superposição realizada entre os átomos C_α dos monômeros destas estruturas mostrou o alto grau de similaridade conformacional existente entre elas (Figura 10). Como pode ser notado pela observação da Figura 10, as principais diferenças estruturais entre todas estas Asp49-PLA₂s encontram-se nos *loops* de ligação de Ca⁺⁺ e nas regiões de β -wing. A BthA-I apresenta uma pequena alteração estrutural destas regiões em comparação às demais Asp49-PLA₂s de classe IIA (com exceção da Asp49-PLA₂s de classe I da *N. n. sagittifera*).

	10	20	30	40	50	60	Identity (%)
B. taurus (1bp2)	ALWQFNGMIKCKIP	SPSEPLLD	FNNYGCYCG	LGSSGTFVDD	LDRCCQTHDNCYQ	AKKLD	41.6
B. jararacussu (1umv)	SLWQFGKMINYVM	-GESGLVQYLSY	GCYCG	LGSGQPTD	ADRCCFVHDCCYG	---	-
A. p. piscivorus (1vap)	NLFQFEKLIKMT	-GKSGMLWYSAY	GCYCG	WGGQGRPKD	ADRCCFVHDCCYG	---	71.5
D. acutus (1i1j1)	SLIQFETLIMKVV	-KKSGMFWYSAY	GCYCG	WGGHGRPQD	ADRCCFVHDCCYG	---	66.7
C. atrox (1pp2)	SLVQFETLIMKIA	-GRSGLLWYSAY	GCYCG	WGGHGLPQD	ADRCCFVHDCCYG	---	63.1
A. h. pallas (1jia)	HLLQFRKMIKMT	-GKEPVVSYAFY	GCYCG	SSGGRKPKD	ADRCCFVHDCCYE	---	62.8
B. pirajai (1gmz)	DLWQFGKMLKET	-GKLPPFYVYTY	GCYCG	VGGRRGPKD	ADRCCFVHDCCYG	---	59.5
D. r. pulchella (1fb2)	SLLQFGKMLEET	-GKLAIPSYSSY	GCYCG	WGGKTPKD	ADRCCFVHDCCYG	---	54.3
N. n. sagittifera (1mh2)	NTWQPKNMISCTV	PSR-SWWD	PADYGCYCG	RGSSGTPSD	LDRCCQTHDNCYNE	AEKISGC-VLVDNPR	41.8

	70	80	90	100	110	120	Identity (%)
B. taurus (1bp2)	TNNSYSCSNNEIT	CSS-ENN	ACEAFICNCD	RNAAICF	---	SKVPYNKE-HKNLDKKN	41.6
B. jararacussu (1umv)	IDSYTSKKNGDV	VCGG-DN	-PCKKQICECD	RVATTCFRD	---	NKDTYDIK-YWFGAKNCQEKSEPC	-
A. p. piscivorus (1vap)	MDIYTYSVNDGN	IVCGG-TN	-PCKKQICECD	RAAICFRD	---	NLKTYSKTYWKYPKKNCKEESSEPC	71.5
D. acutus (1i1j1)	MSYTYSEENGDI	VCGG-DD	-PCKREICECD	RVAACFRD	---	NLDTYNSDTYWRYPQDCESSEPC	66.7
C. atrox (1pp2)	TVSYTYSEENGEI	ICGG-DD	-PCGTQICECD	KAAACFRD	---	NIPSYDNK-YWLFPPKDCREEPEPC	63.1
A. h. pallas (1jia)	WDDYTYSWKNGT	IVCGG-DD	-PCKKEVCECD	KAAACFRD	---	NLKTYYKR-YMAYPDILCSSKSEKC	62.8
B. pirajai (1gmz)	TDRYSYSRKDG	TIVCGE-D	---	-PCRKEICECD	KAAAVCFRE	---	59.5
D. r. pulchella (1fb2)	SDRYKYKRVNGA	IVCEK-GT	-SCENRICECD	KAAACFRQ	---	NLNTYSKK-YMLYPDLCKGELKC-	54.3
N. n. sagittifera (1mh2)	FRYSYACTAGT	TLTCTGRNN	-ACAASVCD	CDRNAAICF	FAGAPYND	SNYNID-LQARCN	41.8

Key: red = helix, blue = strand, green = turn, black = coil.

Figura 9 – Alinhamento realizado com base nas estruturas secundárias de Asp49-PLA₂s isoladas de venenos de serpentes. As seqüências utilizadas foram as dos monômeros A da BthA-I nativa de *Bothrops jararacussu* e de *Agkistrodon piscivorus piscivorus*, *Deinagkistrodon acutus*, *Crotalus atrox*, *Agkistrodon halys* Pallas, *Daboia russeli pulchella* e *Naja naja sagittifera* (monômero B). Os resíduos das seqüências estão numerados de acordo com Renetseder et al. (1985). Os valores de identidade em relação à BthA-I são exibidos na coluna à direita. Alinhamento realizado através do programa FASTA (Pearson, 1990).

Em contraste, o *loop* de ligação de Ca^{++} da estrutura da piratoxina III (não mostrada na Figura 10), uma Asp49-PLA₂s do veneno de *Bothrops pirajai*, apresenta uma distorção estrutural significativa em comparação às regiões correspondentes de outras Asp49-PLA₂s devido a uma grande torção das cadeias principais dos resíduos Val30 e Gly31 associada à mudança dos ângulos diedrais do resíduo Cys29 (Rigden et al., 2003). De acordo com a hipótese dos autores, tal distorção do *loop* de ligação de Ca^{++} pode ser devida a uma conformação alternativa assumida pela piratoxina III quando em seu estado inativo (estado T). Com base nesta proposição, todas as Asp49-PLA₂s aqui analisadas estariam em suas conformações enzimaticamente ativas (estado R).

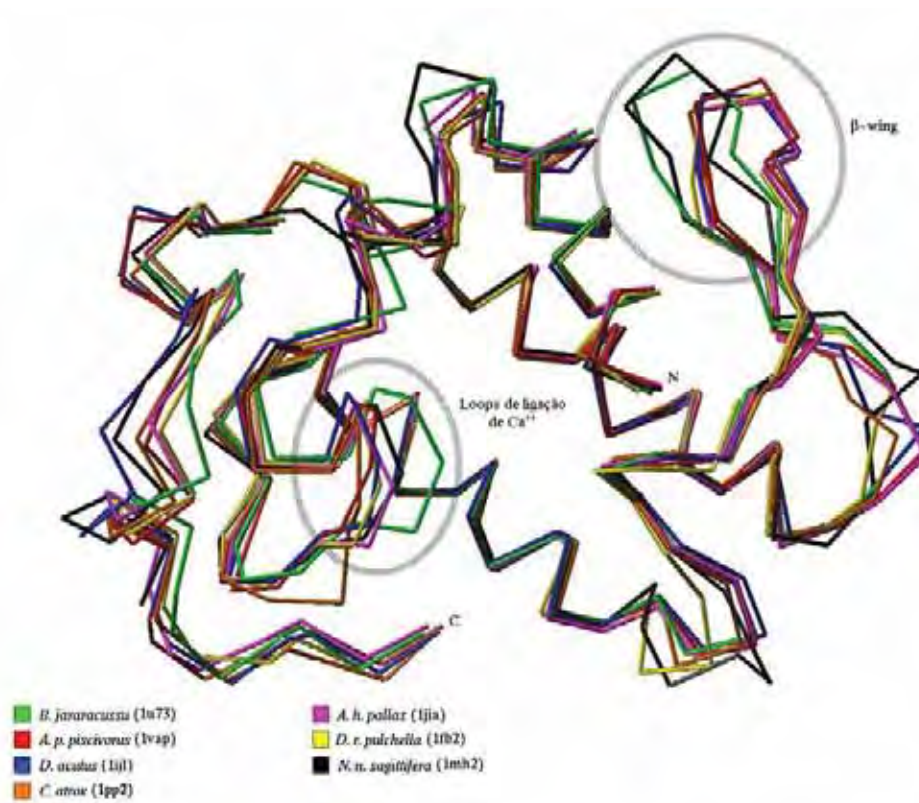


Figura 10 – Superposição realizada entre os C_α das hélices h1, h2 e h3 de Asp49-PLA₂s isoladas de venenos de serpentes. As seqüências utilizadas foram as dos monômeros A da BthA-I nativa de *Bothrops jararacussu* e de *Agkistrodon piscivorus piscivorus*, *Deinagkistrodon acutus*, *Crotalus atrox*, *Agkistrodon halys* Pallas, *Daboia russeli pulchella* e *Naja naja sagittifera* (monômero B). Figura gerada pelo programa O (Jones et al., 1990).

Como já demonstrado anteriormente, a conformação oligomérica de muitas estruturas já elucidadas de Asp49-PLA₂s é um importante dado a ser levado em consideração para a compreensão das atividades e funções destas proteínas (Snijder et al., 1999; Dekker, 2000; Oliveira et al., 2001; Pan et al., 2001; Sanchez et al., 2001; Magro et al., 2003). A comparação entre as estruturas de Asp49-PLA₂s de classe IIA disponíveis no *RCSB Protein Data Bank* e o modelo cristalográfico da d-BthA-I revelou que esta proteína possui uma nova conformação oligomérica,

onde o canal hidrofóbico de cada monômero está exposto ao solvente, permitindo um acesso direto aos seus respectivos sítios ativos. Na Figura 11 são mostrados alguns exemplos de conformações oligoméricas apresentadas por PLA₂s diméricas isoladas de venenos de serpentes.

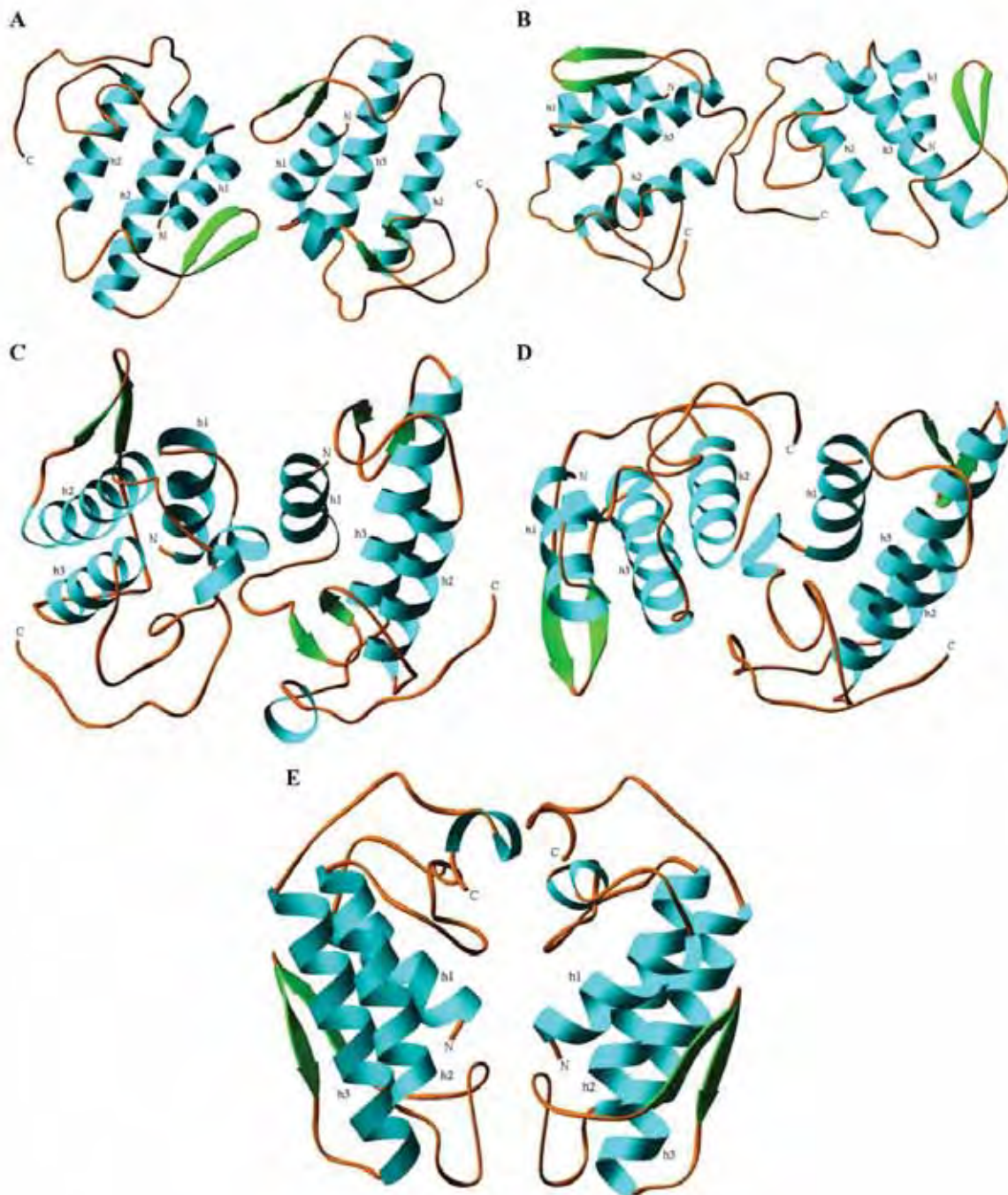


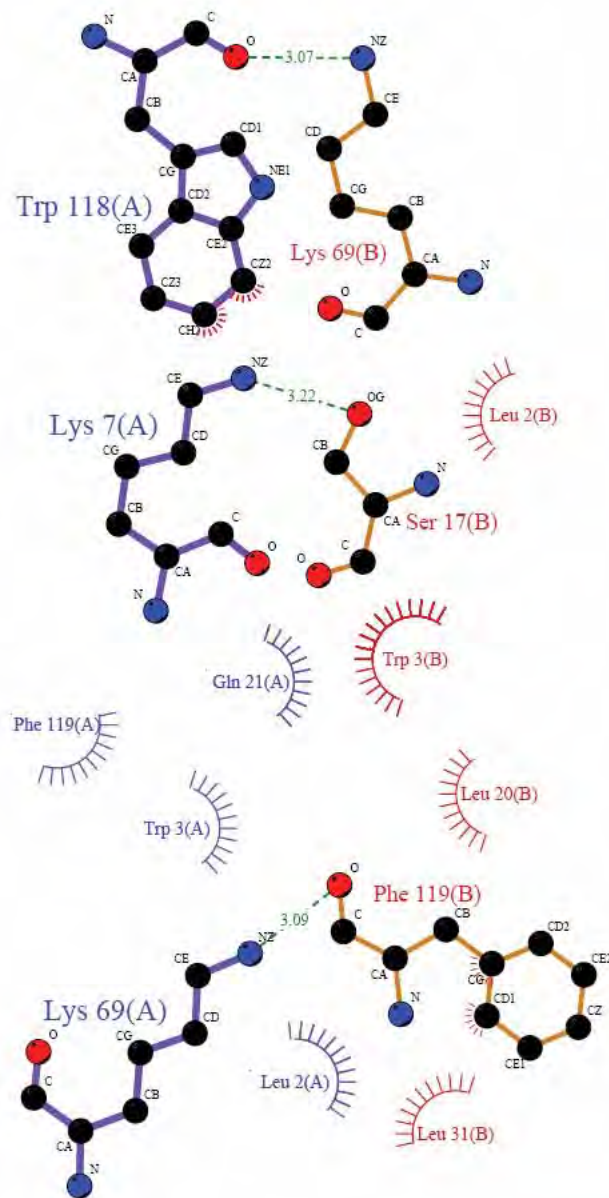
Figura 11 – Alguns exemplos de PLA₂s diméricas isoladas de venenos de serpentes. (A) *Bothrops neuwiedi pauloensis* (1pa0) (Magro et al., 2003); (B) *Deinagkistrodon acutus* (1ijl) (Gu et al., 2002); (C) *Agkistrodon halys* Pallas (1jia) (Han et al., 1997); (D) *Daboia russeli pulchella* (1fb2) (Chandra et al., 2001) e (E) *Naja naja sagittifera* (1mh2) (Jabeen et al., 2005). Os códigos de identificação destas proteínas no *RCSB Protein Data Bank* são mostrados entre parênteses. Figura gerada pelo programa RIBBONS (Carson, 1997).

As razões pelas quais a BthA-I nativa apresentou-se sob as formas dimérica e monomérica estão provavelmente relacionadas às condições físico-químicas de suas condições de cristalização. A análise destas condições fornece uma indicação potencialmente importante a respeito da possível conformação oligomérica assumida por esta Asp49-PLA₂s *in vivo*. O pH de cristalização da d-BthA-I foi de 3,5, enquanto que aquele onde os cristais da m-BthA-I foram obtidos foi de 4,6, sendo este último valor muito próximo ao pI da proteína (~ 5,0). Assim, é provável que o pH onde se formaram os cristais da m-BthA-I desfavoreça a formação de associações entre monômeros, devido ao equilíbrio de carga apresentado pelos mesmos em tal condição. Conseqüentemente, com base no fato de que o estado dimérico é a associação energeticamente mais favorável de muitas Asp49-PLA₂s, Lys49-PLA₂s (Oliveira et al., 2001; Magro et al., 2003) e fosfolipases de membrana (Snijder et al., 1999; Dekker, 2000), a existência de dímeros da BthA-I nativa em pH 3,5 parece indicar uma possível predominância desta forma oligomérica em condições distintas daquelas próximas do pI desta enzima. Portanto, é bastante provável que a forma dimérica da BthA-I seja aquela encontrada predominantemente *in vivo*. Contudo, a informação de que uma PLA₂ de *Crotalus atrox* apresenta-se sob as formas dimérica e monomérica quando se encontra, respectivamente, na ausência e presença de lipídios (Sanchez et al., 2001), mostra que estudos estruturais mais detalhados ainda devem ser realizados para determinar a exata base estrutural dos mecanismos bioquímicos das Asp49-PLA₂s.

4.2 Estudo estrutural experimental do complexo BthA-I/pBPB

4.2.1 Conformação oligomérica e qualidade estereoquímica do modelo cristalográfico do complexo BthA-I/pBPB

Assim como a d-BthA-I, o complexo BthA-I/pBPB apresenta-se sob uma forma dimérica na condição de cristalização determinada pelos ensaios experimentais. Contatos hidrofóbicos e três pontes intermoleculares de hidrogênio contribuem para a estabilização do dímero. Os resíduos envolvidos nestas interações estão localizados em ambas as regiões N-terminais (Leu2, Trp3 e Lys7) e C-terminais (Trp118 e Phe119), nas *short helices* (Leu20 e Gln21) e nos *loops* “pancreáticos” localizados entre as hélices h2 e as regiões *ble-wing* (Lys69) (Figura 12). Além destes contatos, o átomo de bromo da molécula de pBPB localizada no monômero A interage com o resíduo Phe119, presente na região C-terminal do monômero B.



Key

- | | | | |
|--|------------------------------|--|--------------------------------------------------------|
| | Residues of first surface | | Residues involved in hydrophobic contact(s) |
| | Residues of second surface | | Corresponding atoms involved in hydrophobic contact(s) |
| | Hydrogen bond and its length | | |

Figura 12 – Diagrama esquemático das interações presentes na interface dimérica do complexo BthA-I/pBPB. Os contatos polares são representados por linhas entrecortadas e as interações hidrofóbicas por segmentos de círculo com projeções radiais. Os resíduos do monômero A estão identificados em azul e as ligações entre seus átomos são mostradas como linhas púrpuras; já os resíduos do monômero B estão identificados em vermelho e as ligações entre seus átomos são mostradas em dourado. Os átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio são representados, respectivamente, como esferas negras, azuis e vermelhas. Esta figura foi gerada através do programa LIGPLOT (Wallace et al., 1995).

Os monômeros do complexo apresentam uma simetria não-cristalográfica (NCS), que pode ser verificada pela rotação aproximada de 180° de um eixo perpendicular à *short helix*, e são compostos pelos mesmos elementos estruturais comuns às demais Asp49-PLA₂s de classe II: uma α -hélice N-terminal (h1), uma *short helix*, um *loop* de ligação do íon Ca^{++} , duas α -hélices anti-paralelas (h2 e h3), duas fitas β anti-paralelas (β -wings) e um *loop* C-terminal (Figura 13). Os resíduos catalíticos His48, Tyr52, Tyr73 e Asp99, presentes nas Asp49-PLA₂s de classe II, encontram-se, da mesma forma, estruturalmente conservados em ambos os monômeros do complexo BthA-I/pBPB.

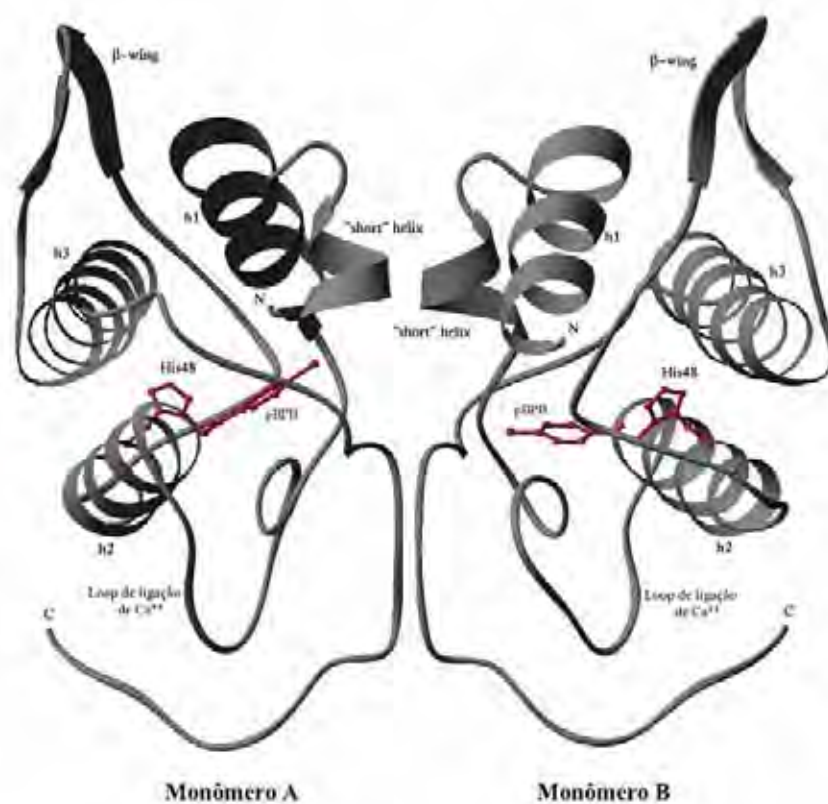


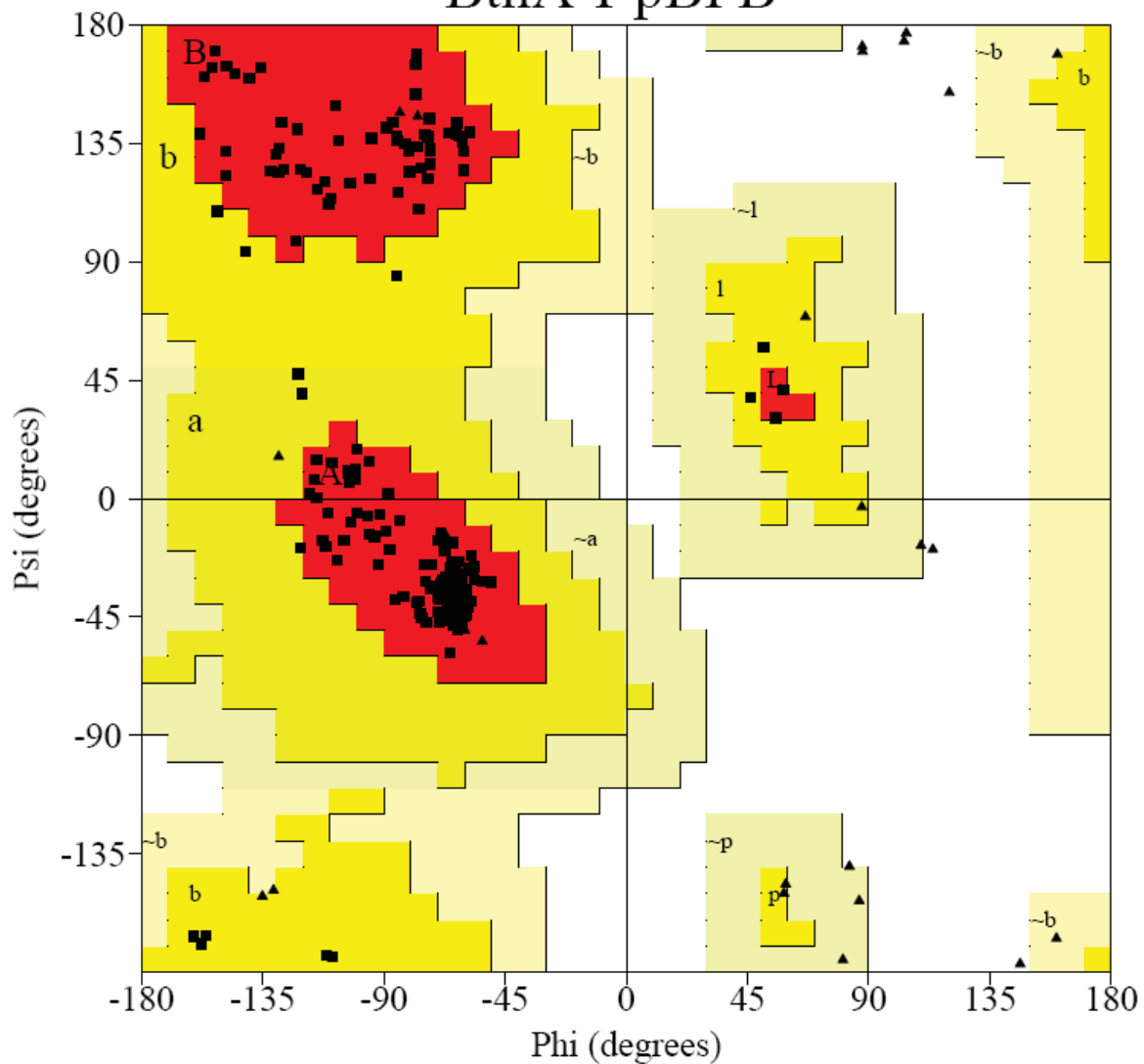
Figura 13 – Estrutura do complexo BthA-I/pBPB. As moléculas de pBPB ligadas aos resíduos His48 dos sítios catalíticos dos monômeros são mostrados por meio de uma representação do tipo *ball-stick*. Figura gerada pelo programa RIBBONS (Carson, 1997)

A qualidade estereoquímica do modelo final mostrou-se excelente, visto que a grande maioria dos resíduos de aminoácidos encontram-se nas regiões mais favoráveis do gráfico de Ramachandran (Figura 14) e o valor de *G-factor* calculado para a estrutura do complexo BthA-I/pBPB foi de -0,1 (Laskowski et al., 1993).

PROCHECK

Ramachandran Plot

BthA-I-pBPB



Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	191	93.6%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	13	6.4%
Residues in generously allowed regions [~a,~b,~l,~p]	0	0.0%
Residues in disallowed regions	0	0.0%

Number of non-glycine and non-proline residues	204	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	4	
Number of glycine residues (shown as triangles)	28	
Number of proline residues	8	

Total number of residues	244	

Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.

Figura 14 – Gráfico de Ramachandran do complexo BthA-I/pBPB. Gerado através do programa PROCHECK v.3.5.4 (Laskowski et al., 1993).

4.2.2 Disposição estrutural da molécula de pBPB no complexo

Como exemplificado pela observação da região do sítio catalítico do monômero A do complexo (Figura 15), a molécula de pBPB liga-se de modo covalente aos átomos N δ 1 dos resíduos His48 presentes em ambos os monômeros do complexo. O grupo fenacila do pBPB se estende ao longo do canal hidrofóbico de ligação de substrato da BthA-I, estabelecendo vários contatos hidrofóbicos nesta região (Figura 16). Da mesma forma, a análise da Figura 16 mostra que estas moléculas também realizam interações com os resíduos Gly30 e Cys45 em ambos os monômeros e possuem alguns contatos específicos: o pBPB do monômero A interage com duas moléculas de água e com o resíduo Phe119 localizado no monômero B, enquanto que o pBPB do monômero B interage com os resíduos Phe5 e Tyr22 localizados na mesma cadeia polipeptídica.

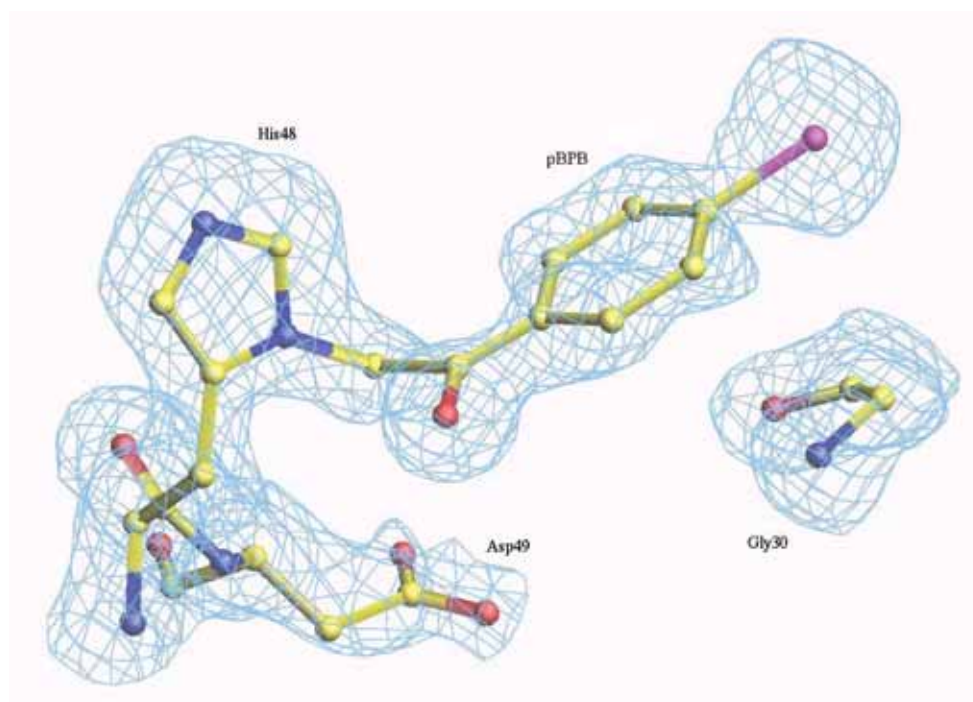


Figura 15 – *Omit map* $3|F_{obs}| - 2|F_{calc}|$ da região do sítio catalítico do monômero A do complexo BthA-I/pBPB exibindo a ligação covalente entre a molécula de pBPB e o resíduo His48 ($\sigma = 1,5$). Figura gerada pelo programa O (Jones et al., 1990).

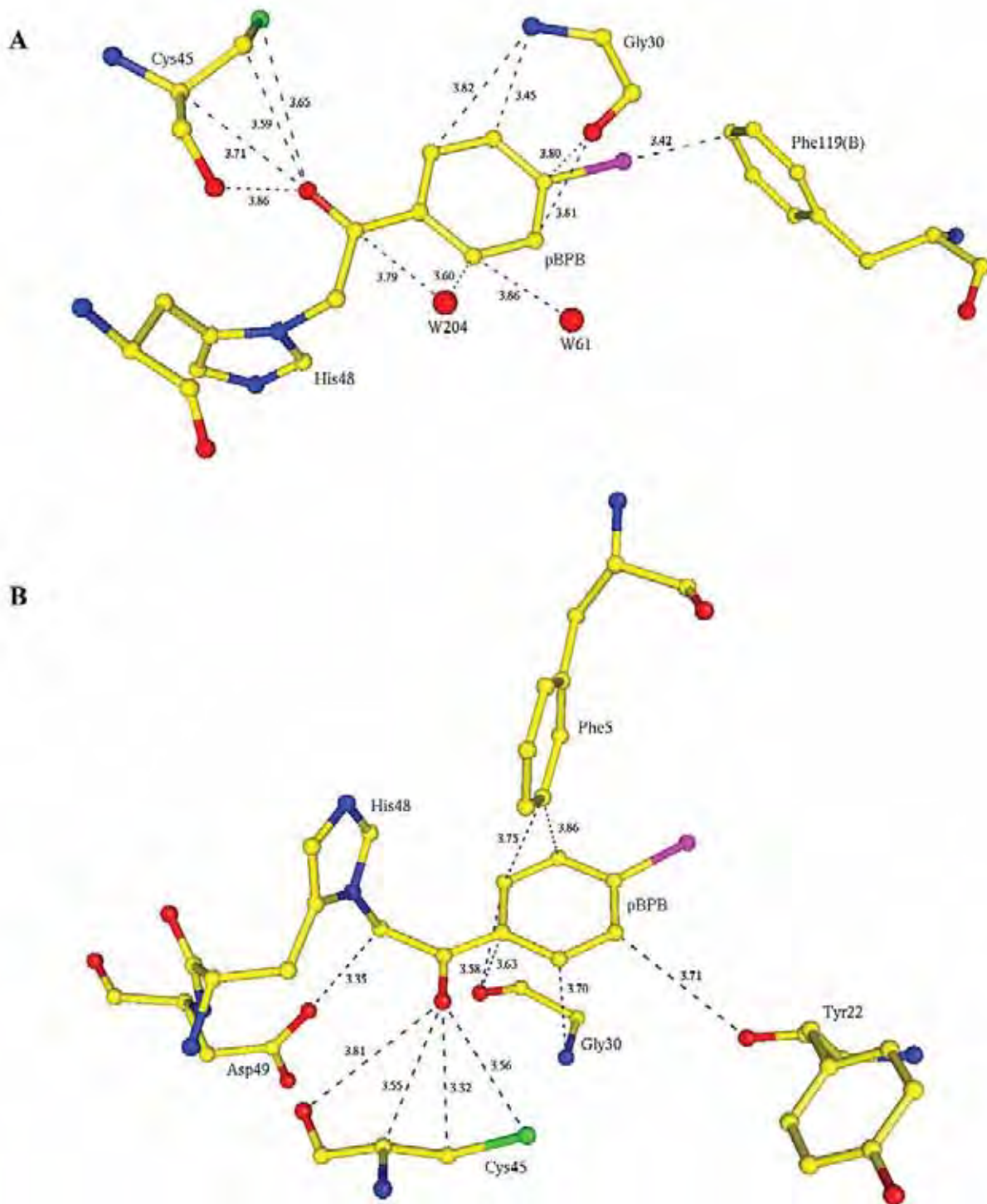


Figura 16 – Interações entre as moléculas de pBPB e os resíduos dos monômeros do complexo BthA-I/pBPB. (A) Contatos do pBPB no monômero A: resíduos Gly30, His48, Cys45 e Phe119 (monômero B) e duas moléculas de água (W61 e W204) (os átomos de oxigênio, carbono, nitrogênio, enxofre e bromo são representados, respectivamente, como esferas de cores vermelha, amarela, azul, verde e púrpura). (b) Contatos do pBPB no monômero B: resíduos Phe5, Tyr22, Gly30, His48, Asp49 e Cys45 (os átomos de oxigênio, carbono, nitrogênio, enxofre e bromo são representados como em A). As figuras foram geradas pelo programa RIBBONS (Carson, 1997).

4.2.3 Comparação estrutural entre a BthA-I nativa e o complexo BthA-I/pBPB

Para estabelecer a natureza das modificações estruturais induzidas pela ligação da molécula de pBPB à BthA-I nativa, foram realizadas superposições entre os átomos C_α dos monômeros da m-BthA-I, d-BthA-I e do complexo BthA-I/pBPB (Tabela 4). Estas superposições confirmaram a marcante influência do pBPB sobre a estrutura terciária destas proteínas, já que os valores de *r.m.s.d.* entre os átomos C_α das estruturas nativas e quimicamente modificadas pelo pBPB são significativamente maiores (em torno de 1,2 Å). A superposição entre os monômeros do complexo BthA-I/pBPB resultou em um valor de *r.m.s.d.* de 0,72 Å, similar, portanto, àquele obtido para a comparação realizada entre os monômeros da d-BthA-I (0,54 Å) e de outras PLA₂s diméricas (Magro et al., 2003). Estas superposições revelaram que a estrutura do complexo BthA-I/pBPB não apresenta a molécula de água catalítica presente na BthA-I nativa e que os anéis imidazólicos da BthA-I quimicamente modificada pelo inibidor apresentam um posicionamentos análogo ao observado na estrutura nativa (Figura 17). A disposição estrutural dos resíduos dos sítios catalíticos nas formas nativa e modificada da BthA-I também é similar, com exceção da Gly30 localizada no monômero A do complexo BthA-I/pBPB (Figura 17A). Adicionalmente, a superposição entre as três hélices principais (h1, h2 e h3) da m-BthA-I, d-BthA-I e do complexo BthA-I/pBPB indica que as diferenças estruturais mais marcantes entre as formas nativas e aquela quimicamente modificada pelo inibidor estão localizadas nos *loops* de ligação de Ca^{++} (resíduos 27 a 33) e nas regiões *d β -wing* (resíduos 75 a 84) e C-terminais (resíduos 119 a 133) (Figura 18). Tal resultado está em concordância com aqueles obtidos a partir da comparação da d-BthA-I nativa com outras Asp49-PLA₂s de classes I e II, que constatarem que estas são as regiões estruturalmente mais variáveis dentro deste grupo de proteínas.

Tabela 4 – Valores de *r.m.s.d.* (Å) das superposições realizadas entre os átomos C_α dos monômeros do complexo BthA-I/pBPB e das formas monomérica (m-BthA-I) e dimérica (d-BthA-I) da BthA-I nativa.

	BthA-I/pBPB		d-BthA-I		m-BthA-I
	Monômero A	Monômero B	Monômero A	Monômero B	
BthA-I/pBPB (Monômero A)	-	0,72	1,23	1,21	1,26
BthA-I/pBPB (Monômero B)	0,72	-	1,21	1,23	1,17
d-BthA-I (Monômero A)	1,23	1,21	-	0,54	0,49
d-BthA-I (Monômero B)	1,21	1,23	0,54	-	0,49
m-BthA-I	1,26	1,17	0,49	0,49	-

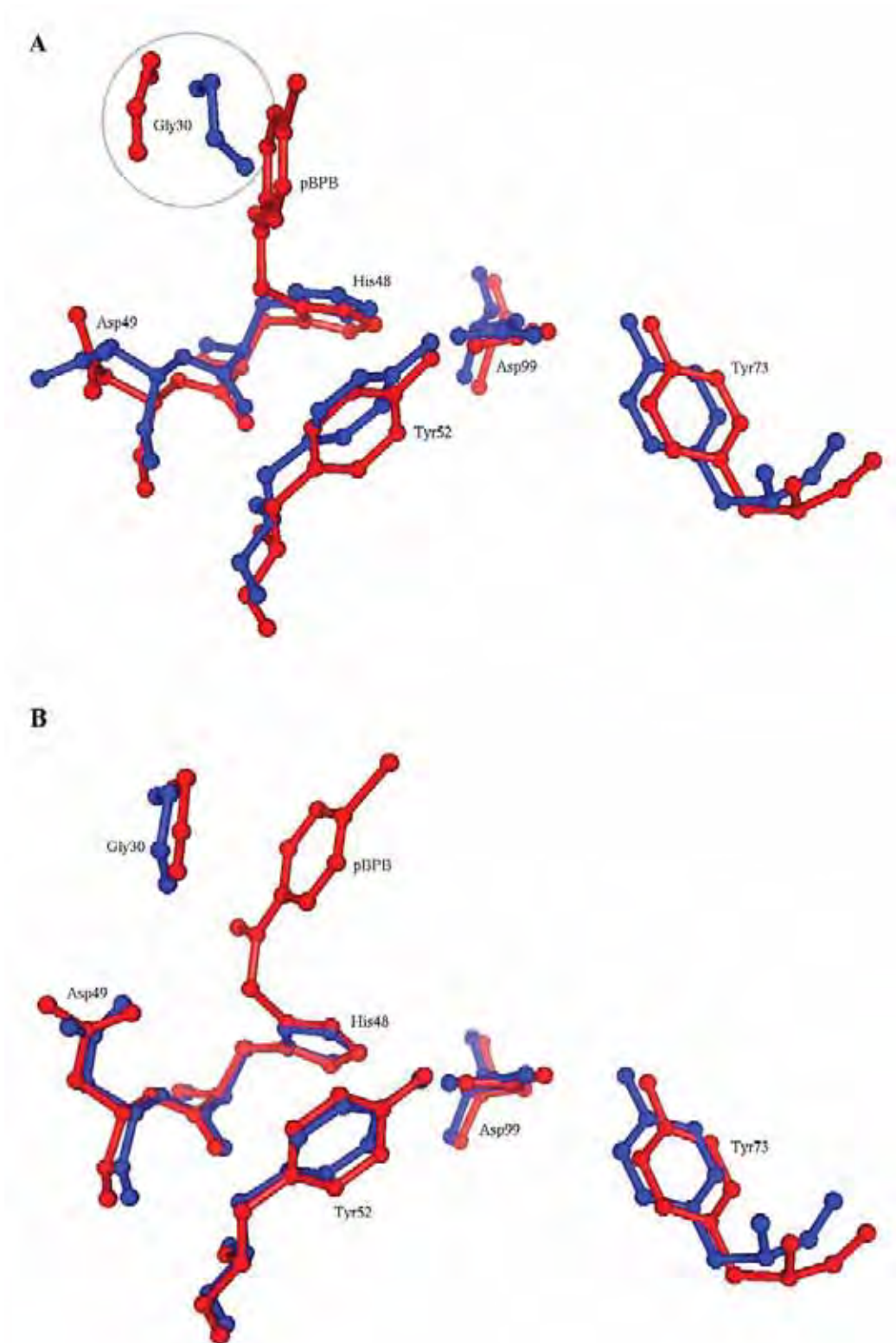


Figura 17 – Superposições realizadas entre os átomos C_{α} das hélices h1, h2 e h3 destas estruturas, mostrando a posição relativa dos resíduos componentes dos sítios ativos da forma dimérica da BthA-I nativa (d-BthA-I) e seus resíduos correspondentes no complexo BthA-I/pBPB. (A) Resíduos Gly30, His48, Asp49, Tyr52, Tyr73 e Asp99 dos monômeros A da BthA-I nativa dimérica (d-BthA-I) (em azul) e do complexo BthA-I/pBPB (em vermelho). (B) Resíduos Gly30, His48, Asp49, Tyr52, Tyr73 e Asp99 dos monômeros B da BthA-I nativa dimérica (d-BthA-I) (em azul) e do complexo BthA-I/pBPB (em vermelho). Figura elaborada por meio da utilização do programa PyMol (DeLano, 2002).

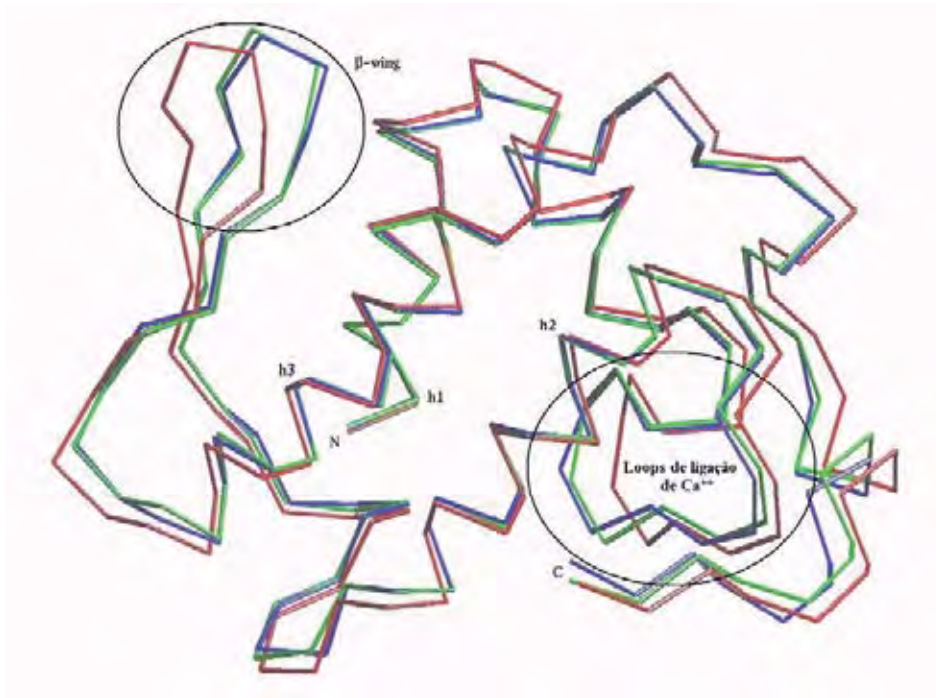


Figura 18 – Superposição entre os átomos C_{α} das hélices h1, h2 e h3 da forma monomérica da BthA-I nativa (m-BthA-I) (em verde) e dos monômeros A do complexo BthA-I/pBPB (em vermelho) e da forma dimérica da BthA-I nativa (d-BthA-I) (em azul). Figura gerada pelo programa O (Jones et al., 1990).

A comparação estrutural do complexo BthA-I/pBPB com as formas monomérica e dimérica da BthA-I nativa revelou que os resíduos Gly30 e Leu31 e Gly32 localizados nos *loops* de ligação de Ca^{++} do complexo dimérico são deslocados pela presença da molécula do inibidor, o que acaba por promover uma extensa modificação em toda a estrutura tridimensional destes *loops*. No monômero B do complexo os átomos da cadeia principal do resíduo Gly32 e dos átomos das cadeias principal e lateral da Leu31 são deslocados pelo pBPB, enquanto que no monômero A também ocorre uma alteração de posicionamento dos átomos da cadeia principal da Gly30. A mudança na conformação tridimensional dos *loops* de ligação de Ca^{++} causa, por sua vez, um deslocamento de até 2,6 Å dos resíduos 123 a 130 localizados nas porções C-terminais de cada monômero do complexo, apesar da presença de uma ponte dissulfeto formada entre a Cys50 e a Cys133, o que confere a estas regiões um alto grau de estabilidade estrutural. Da mesma forma, os resíduos Leu23 das regiões de *short helix* do complexo BthA-I/pBPB são deslocados pela presença da molécula de pBPB.

Para determinar as mudanças oligoméricas induzidas pela ligação das moléculas de pBPB, foi realizada uma superposição entre os átomos de C_{α} das hélices h1, h2 e h3 dos monômeros A da d-BthA-I e do complexo BthA-I/pBPB (Figura 19). Esta superposição mostrou a disposição relativa dos monômeros B das duas estruturas, revelando, assim, uma conformação oligomérica da BthA-I inibida pelo pBPB totalmente distinta da d-BthA-I e das demais PLA₂s de classe IIA disponíveis no

RCSB Protein Data Bank (PDB). O dímero da d-BthA-I, como citado anteriormente, é estabilizado por apenas algumas interações hidrofóbica (seis), uma ponte salina entre os átomos ϵN e $\text{O}\delta 2$ dos resíduos Lys93 e Asp108 e uma interação adicional entre os resíduos Lys93 e Thr104. O dímero do complexo BthA-I/pBPB, entretanto, é estabilizado por um grande número de interações hidrofóbicas (doze) e três pontes intermoleculares de hidrogênio (Figura 12). Como também já foi mencionado, a molécula de pBPB interage com a região C-terminal (Phe119) do monômero B do complexo (Figura 16A). Outra diferença entre a BthA-I nativa dimérica e o complexo BthA-I/pBPB está nos resíduos de aminoácidos presentes nas interfaces diméricas destas duas estruturas. No complexo, resíduos das regiões N-terminal e C-terminal, das *short helices* e dos *loops* “pancreáticos” estão presentes na interface dos dois monômeros, enquanto que na BthA-I dimérica a região de interface apresenta contatos apenas entre resíduos da região $\text{d}\beta$ -*wing* e da hélice h3. Além disso, a estrutura dimérica da BthA-I quimicamente modificada pelo pBPB é mais compacta do que aquela da d-BthA-I, como é demonstrado pelo cálculo dos valores de *buried surface* realizado com seus respectivos pares de monômeros: 1706 \AA^2 para o complexo BthA-I/pBPB e 1044 \AA^2 para a BthA-I nativa dimérica. Portanto, com base em todas estas informações (número de interações, partes das proteínas envolvidas nos contatos e cálculo dos valores de *buried surface*), é bastante provável que a estrutura oligomérica do complexo BthA-I/pBPB seja energeticamente mais estável do que a forma dimérica da BthA-I nativa.

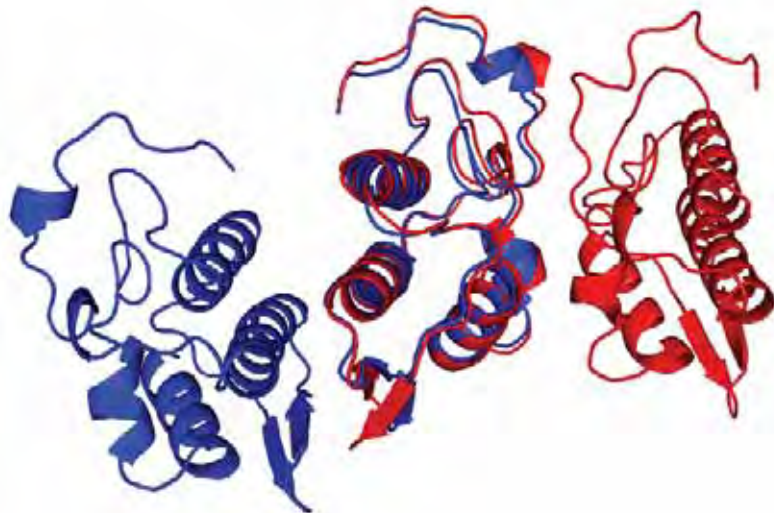


Figura 19 – Superposição entre os átomos C_{α} das hélices h1, h2 e h3 dos monômeros A do complexo BthA-I/pBPB (em vermelho) e da forma dimérica da BthA-I nativa (d-BthA-I) (em azul), mostrando a disposição relativa dos monômeros B destas estruturas. Os dímeros da BthA-I nativa e do complexo BthA-I/pBPB são representados, respectivamente, nas cores azul e vermelha. Figura elaborada por meio da utilização do programa PyMOL (DeLano, 2002).

Apesar das mudanças físico-químicas na condição de cristalização do complexo poderem ter alterado a frágil estabilização dimérica da BthA-I (o pH de cristalização do complexo BthA-I/pBPB foi de 8,5, enquanto o da d-BthA-I foi de 3,5), é razoável supor que a conformação oligomérica alternativa da proteína quimicamente modificada esteja relacionada às alterações estruturais induzidas pela ligação da molécula de pBPB. Também é provável que a modificação oligomérica do complexo seja devida ao deslocamento da região C-terminal da proteína e não à alteração estrutural da região de β -wing, cujo alto grau de flexibilidade foi verificado em outras PLA₂s de classe II (da Silva-Giotto et al., 1998; Magro et al., 2003). No caso específico do complexo BthA-I/pBPB o valor de *B-factor* médio das regiões de β -wing é 32,9 Å², notadamente superior, portanto, ao valor de *B-factor* médio da estrutura total, que é de 25,4 Å². Por outro lado, a ligação do pBPB não parece afetar diretamente a conformação da região de β -wing, visto que ela é protegida pelas hélices h2 e h3, as quais apresentam uma mobilidade relativamente pequena (os valores de *B-factor* médios destas hélices são de, respectivamente, 19,6 Å² e 21,3 Å²).

4.2.4 Comparação estrutural entre PLA₂s quimicamente modificadas pelo pBPB

A análise da estrutura da PLA₂ pancreática bovina quimicamente modificada pelo pBPB (Renetseder et al., 1985) revelou que os *loops* “pancreático” (resíduos 59 a 72) e de ligação de Ca⁺⁺ deste complexo apresentam modificações em relação à forma nativa da proteína. No entanto, o modelo cristalográfico do complexo formado entre a PLA₂ ácida de *Agkistrodon halys* Pallas e o pBPB mostra uma grande similaridade com a estrutura cristalina nativa correspondente (o valor de *r.m.s.d.* entre os átomos C_α de ambas as estruturas é de 0,243 Å) (Zhao et al., 1998). Assim, a comparação das estruturas cristalográficas conhecidas de PLA₂s modificadas quimicamente pelo pBPB mostra resultados aparentemente paradoxais: uma apresenta modificações induzidas pela molécula do inibidor, enquanto a outra mantém sua estrutura nativa praticamente inalterada. Numa análise mais superficial, estas conclusões poderiam ser inicialmente atribuídas ao fato de que as proteínas citadas pertencem a diferentes espécies e classes de PLA₂s, porém, uma observação mais atenta sugere que estas diferenças podem ser devidas à presença do íon Na⁺ no *loop* de ligação de Ca⁺⁺ da PLA₂ ácida de *Agkistrodon halys* Pallas.

A comparação estrutural entre o complexo BthA-I/pBPB e a d-BthA-I indicou que três porções da proteína nativa são significativamente alteradas pela presença do pBPB: os *loops* de ligação de Ca⁺⁺ e as regiões de β -wing e C-terminais. Já a análise estrutural realizada entre três PLA₂s modificadas quimicamente pelo pBPB mostrou que mudanças conformacionais somente ocorrem no complexo BthA-I/pBPB e na PLA₂ bovina pancreática modificada pelo pBPB, cujos *loops* de ligação de Ca⁺⁺ não apresentam o íon Na⁺. Estudos realizados anteriormente sugerem que

cátions divalentes como o Ca^{++} protegem PLA_2s bovinas contra a inativação causada pelo pBPB e que o Ca^{++} não se liga a PLA_2s previamente modificadas por este inibidor (Volwerk et al., 1974). De modo similar, Zhang et al. (1994) demonstraram que o íon Ca^{++} impede que o pBPB se ligue à PLA_2 ácida de *Agkistrodon halys* Pallas. Aparentemente, o pBPB desloca uma molécula de água que deveria participar da coordenação do Ca^{++} , impedindo, desta forma, que o íon possa interagir com seu sítio de ligação (Renetseder et al., 1988; Zhao et al., 1998). Com base nesta hipótese, é possível que o inverso também ocorra, ou seja, a presença do íon Ca^{++} e da molécula de água responsável por sua coordenação poderiam possivelmente dificultar o estabelecimento de uma ligação covalente entre o pBPB e o resíduo His48 das PLA_2s .

Assim, o íon Na^+ presente no *loop* de ligação de Ca^{++} da PLA_2 ácida de *Agkistrodon halys* Pallas, cuja coordenação não prescinde de qualquer molécula adicional de solvente, pode atuar como uma espécie de âncora, impedindo eventuais alterações estruturais provocadas pelo deslocamento do *loop* em questão. Zhao et al. (1998) mencionaram também que a presença do Na^+ pode estar relacionada à relativa estabilidade conformacional da estrutura deste complexo. Conseqüentemente, sugerimos que a ligação do pBPB às PLA_2s desprovidas de íons Na^+ efetivamente induz modificações estruturais, particularmente em seus *loops* de ligação de Ca^{++} , o que leva à supressão da atividade catalítica destas proteínas.

4.2.5 Inibição das atividades farmacológicas da BthA-I pelo pBPB

Asp49- PLA_2s de venenos de serpentes são proteínas extremamente interessantes justamente pelo fato de apresentarem um grande número de efeitos farmacológicos não relacionados ao mecanismo catalítico típico destas enzimas. Kini & Evans (1989) propuseram que estas proteínas possuem sítios com atividades farmacológicas específicas em diferentes partes de suas estruturas. No entanto, em termos de informação estrutural, pouco é conhecido a respeito da precisa localização destes sítios, apesar do acúmulo de algumas informações adquiridas nos últimos anos: o efeito anticoagulante de algumas Asp49- PLA_2s foi associado a dois pares de lisinas presentes em seus *loops* “pancreáticos”, entre os resíduos 54 e 77 (Kini & Evans, 1989; Carredano et al., 1998); quatro lisinas localizadas nas posições 54, 56, 67 e 69 podem estar associadas à atividade anticoagulante apresentada pela toxina RVV-VD de *Vipera russelli russelli* (Carredano et al., 1998); as atividades miotóxica e de lise de membranas independente de Ca^{++} vêm sendo associadas à região C-terminal das Lys49- PLA_2s (Chioato et al., 2002; Ward et al., 2002). Neste último caso, experimentos de mutações sítio-dirigidas demonstraram que estas atividades são independentes e determinadas por *motifs* ligeiramente sobrepostos, localizados na região C-terminal (Chioato et al., 2002). Conforme estes últimos autores e outros trabalhos estruturais similares (Lee

et al., 2001; Magro et al., 2003), o resíduo Lys122 possui um papel essencial nos mecanismos bioquímicos relacionados às atividades citadas. Por outro lado, nenhuma informação estrutural referente ao efeito hipotensivo das Asp49-PLA₂s é conhecido e muito pouco é sabido a respeito dos mecanismos que possibilitam que estas proteínas inibam a agregação de plaquetas. Wang et al. (1996) sugeriram que um *cluster* de resíduos aromáticos formado pelos resíduos Phe20, Trp21 (*short helix*), Phe113 e Trp119 (região C-terminal) pode ser responsável pela atividade de inibição da agregação plaquetária apresentada pela PLA₂ ácida de *Agkistrodon halys* Pallas. Entretanto, estes resíduos aromáticos não são totalmente conservados em algumas PLA₂s que apresentam esta atividade.

Como já demonstrado, a BthA-I mostra uma clara alteração oligomérica após a ligação do pBPB. Enquanto a proteína nativa aparece sob a forma monomérica ou estabelece uma frágil associação dimérica, o complexo BthA-I/pBPB parece ser uma estrutura dimérica mais estável. Além do mais, esta “nova” forma oligomérica apresenta um maior número de resíduos “enterrados” sob a interface dimérica, entre os quais incluem-se alguns pertencentes a regiões-chave relacionadas a certas propriedades farmacológicas das Asp49-PLA₂s: o *loop* C-terminal, a região de *short helix* e o resíduo Lys69, pertencente aos *loops* pancreáticos de PLA₂s de classe I e associado à atividade anticoagulante apresentada por PLA₂s de classe II Carredano et al. (1998). Como mostrado na Figura 12, o resíduo Lys69 de cada monômero do complexo BthA-I/pBPB encontra-se na interface dimérica do modelo, estabelecendo pontes de hidrogênio com resíduos da região C-terminal da cadeia polipeptídica oposta. Conseqüentemente, sugerimos que a ligação do pBPB pode indiretamente inibir a atividade anticoagulante e, possivelmente, outras propriedades farmacológicas das Asp49-PLA₂s, tais como o efeito hipotensivo e a capacidade de induzir a agregação de plaquetas, através da alteração da conformação oligomérica destas moléculas. Esta hipótese pode ser comprovada através da execução de novos estudos estruturais e experimentos que envolvam a realização de mutações sítio-dirigidas. Tais estudos lançariam novas luzes sobre os mecanismos farmacológicos da BthA-I e de outras PLA₂s, e poderiam ser de extrema utilidade para o *design* de novas drogas que atuassem sobre os mais diversos processos patológicos mediados por esta classe de proteínas.

4.3 Estudos teóricos realizados com o domínio catalítico da BjussuMP-I

4.3.1 Análise filogenética do domínio catalítico da BjussuMP-I

A análise filogenética do domínio catalítico da BjussuMP-I foi dividida em duas partes: i) o estudo das origens evolutivas das SVMs, e ii) a busca por possíveis relações existentes entre as toxinas selecionadas nos bancos de dados.

Inicialmente, uma árvore filogenética foi gerada para determinar as origens evolutivas entre as SVMs e as metaloproteases celulares de outros organismos, utilizando-se as seqüências selecionadas nos bancos de dados do NCBI e do Pfam. Como esperado, as seqüências encontradas no Pfam foram identificadas como domínios do tipo Reprolisina. Estes tipos de domínios catalíticos estão presentes em animais, fungos e no *Bacillus licheniformis* (cepa dsm 13) (UniProt/TrEMBL|Q65DR9), uma bactéria encontrada no solo e utilizada em aplicações biotecnológicas. A presença desta seqüência no *Bacillus licheniformis* pode ser explicada pela ocorrência de uma transmissão genética horizontal entre uma espécie desconhecida de fungo ou animal (mais provavelmente um fungo de solo) e esta bactéria. Portanto, com base nesta hipótese, o primeiro domínio do tipo Reprolisina surgiu no último ancestral comum aos reinos Metazoa e Fungi.

Devido ao baixo grau de identidade com as demais, as seqüências encontradas em fungos e no *Bacillus licheniformis* não foram incluídas na análise filogenética do domínio catalítico da BjussuMP-I. Assim, a seqüência homóloga de *Caenorhabditis elegans* foi definida como raiz da primeira árvore filogenética (Figura 20). Este gene ancestral das metaloproteases está relacionado à morfogênese gonadal e adesão celular em *Caenorhabditis elegans* (Podbilewicz, 1996; Kubota et al., 2004). A análise do ramo principal desta árvore filogenética mostra uma inequívoca relação entre as SVMs e outras proteínas similares identificadas em espécies distintas (Drer-1, Xlae-1, Ggal-1, Mmus-1, Mmus-4, Hsap-4 e Hsap-5). Desta forma, apesar de todas as metaloproteases selecionadas pertencerem à família das metaloproteases, algumas moléculas de *Xenopus laevis*, *Danio rerio*, *Gallus gallus*, *Mus musculus* e *Homo sapiens* são claramente mais relacionadas às SVMs do que outras. Com base nesta informação, foi possível classificar as seqüências em quatro grupos distintos (SVMs de viperídeos, SVMs de elapídeos, proto-SVMs e moléculas não relacionadas às SVMs), de acordo com suas filogenias e fenótipos (Figura 20). As seqüências Drer-1, Xlae-1, Ggal-1, Mmus-1, Mmus-4, Hsap-4 e Hsap-5 foram classificadas como proto-SVMs devido à relação filogenética existente entre elas e as SVMs, já que todas estas seqüências encontram-se em um ramo monofilético. A observação da árvore filogenética também mostra que a história evolutiva das proto-SVMs iniciou-se através da duplicação de um gene primitivo ocorrida

A segunda parte deste estudo filogenético foi executada através da comparação exclusiva das seqüências dos domínios catalíticos de todas as SVMPs selecionadas nos bancos de dados do NCBI e do UniProt (Figura 21). Como observado na segunda árvore filogenética (Figura 21), estas metaloproteases foram arranjadas em diferentes ramos, de acordo com suas capacidades de induzirem ou não o aparecimento de hemorragias (resultados similares foram obtidos por Ramos & Selistre-de-Araújo, 2004). Pela análise desta árvore também é possível concluir-se que as primeiras SVMPs apresentavam atividade hemorrágica, em virtude elevado número de seqüências de toxinas com tal propriedade encontradas nos bancos de dados. Aparentemente, algumas destas toxinas perderam a capacidade de induzir hemorragias durante o processo de evolução molecular das SVMPs. As razões para a ausência desta atividade em algumas moléculas deste grupo não são claras e podem estar relacionadas a novas funções específicas desempenhadas pelas SVMPs não-hemorrágicas. De maneira adicional, uma análise mais detalhada das árvores filogenéticas mostra que existe uma separação bem definida entre as metaloproteases provenientes dos venenos de espécies da família Viperidae e aquelas encontradas em outros grupos de ofídios. As seqüências de *Atractaspis microlepidota* (Amic-1 e Amic-2) (família Atractaspididae), e aquelas de *Naja kaouthia* (Nkao), *Naja naja* (Nnaj) e *Naja mossambica mossambica* (Nmos) (família Elapidae) foram agrupadas em um ramo separado da primeira família citada. Esta separação filogenética sugere que as SVMPs componentes dos venenos de serpentes das famílias Viperidae, Elapidae e Atractaspididae podem apresentar funções bioquímicas distintas e/ou diferentes graus de atividade farmacológica. A marcante pressão evolutiva envolvida na evolução molecular de toxinas de veneno contribui para o fortalecimento desta hipótese. Também é importante enfatizar que a segunda parte deste estudo filogenético foi realizada apenas com as seqüências dos domínios catalíticos das SVMPs selecionadas. Assim, os outros domínios presentes em muitas SVMPs podem apresentar variações ainda mais significantes no tocante a outras propriedades bioquímicas e farmacológicas relacionadas a estas proteínas.

Por fim, algumas SVMPs e outras moléculas similares encontradas em diferentes organismos apresentam uma relação evolutiva bastante próxima. Tais conexões tornam estas toxinas excelentes modelos para a investigação de mecanismos de adesão, sinalização e fusão celular e funções reprodutivas tipicamente relacionadas a diferentes metaloproteases envolvidas em um grande número de vias metabólicas de muitas espécies, entre as quais incluem-se os humanos e outros mamíferos.

aminoácidos do modelo encontram-se nas regiões estereoquimicamente mais favoráveis. Além disso, o gráfico calculado pelo programa ProSa2003 (Sippl, 2003) revela que todos os resíduos apresentam um potencial energético negativo, confirmando, portanto, a elevada estabilidade estrutural do modelo (Figura 24).

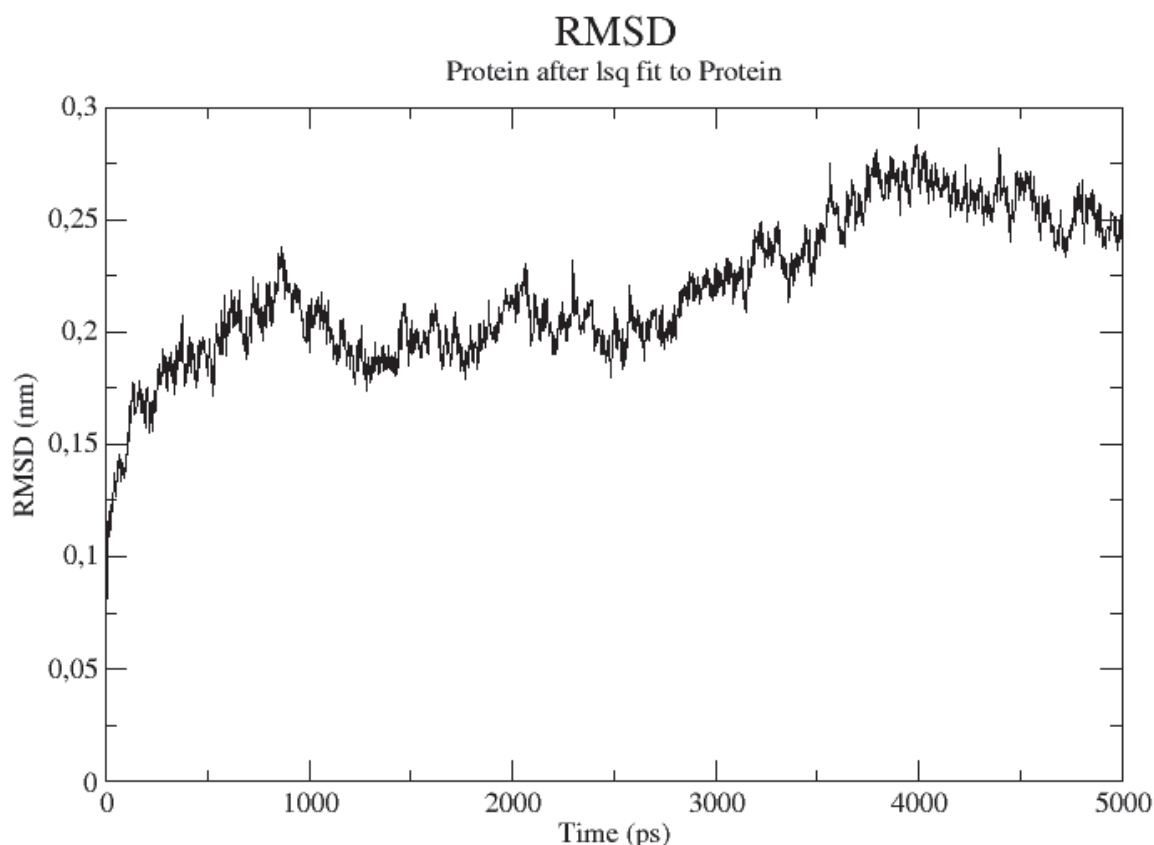


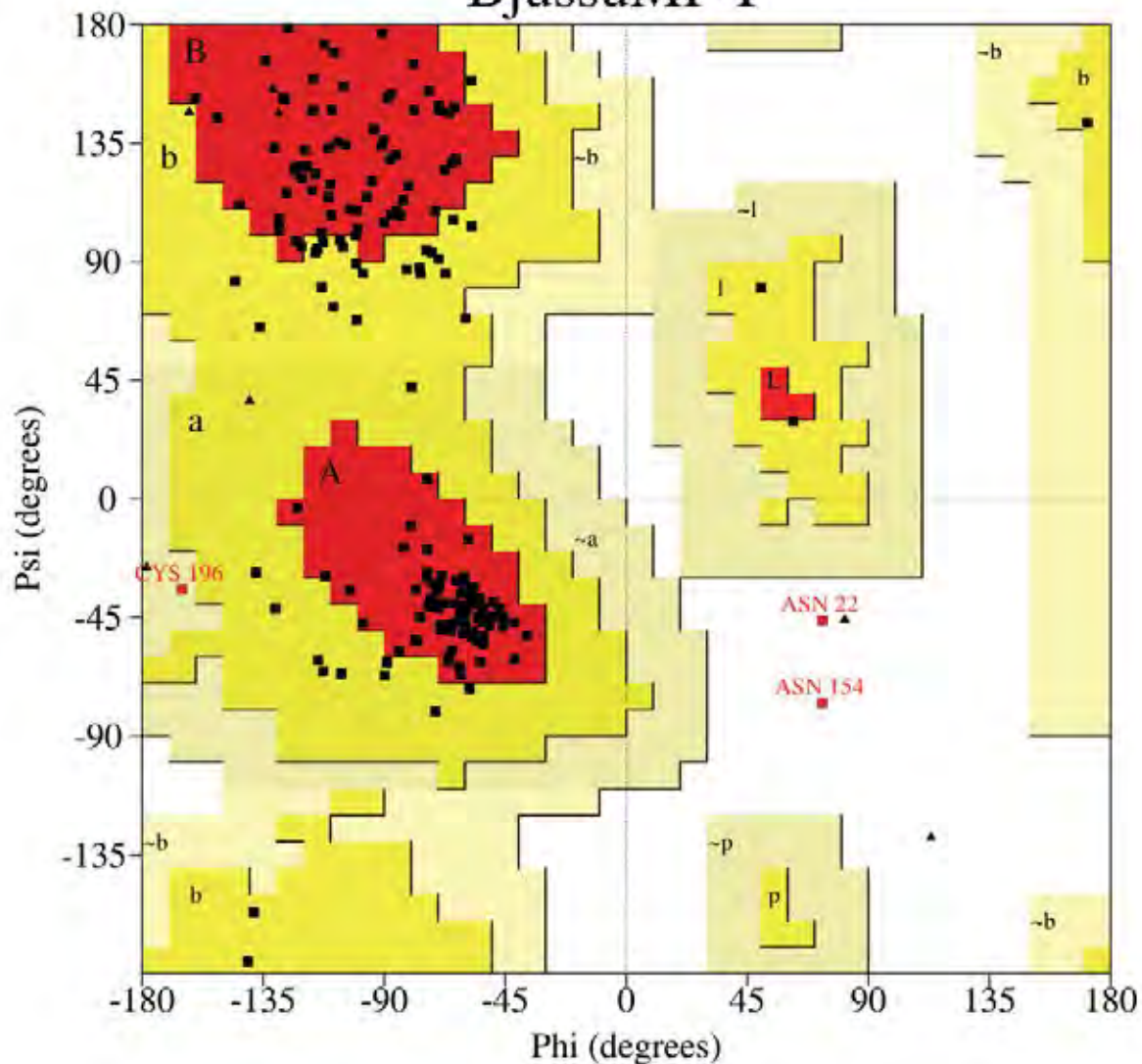
Figura 22 – R.M.S.D. do domínio catalítico da BjussuMP-I durante a simulação de dinâmica molecular. A estabilização estrutural ocorreu em aproximadamente 1500 ps. Figura gerada pelo programa GROMACS v.3.3.1 (Lindahl et al., 2001).

A estrutura tridimensional do modelo final, por sua vez, é bastante similar àquelas de outros domínios catalíticos de SVMPs já descritos (Zhu et al., 1999; Huang et al., 2002; Watanabe et al., 2003), apresentando uma forma elipsoidal e dois sub-domínios. O sub-domínio maior é constituído pelos primeiros 152 resíduos e apresenta quatro α -hélices (h1, h2, h3 e h4) e seis fitas β (β 1, β 2, β 3, β 4, β 5 e β 6), enquanto os últimos 98 resíduos pertencem ao sub-domínio menor, que é formado por uma α -hélice e diversos *loops* (Figura 25). Os resíduos de histidina catalíticos deste modelo também apresentam uma boa disposição estrutural: os anéis imidazólicos da His141 e da His145 da hélice h4 e da His151 pertencente ao *Met-turn*, um *motif* conservado nas peptidases dependentes de zinco (Stöcker et al., 1995), mantêm-se em uma posição favorável à coordenação do íon Zn^{++} necessário à reação de catálise (Figura 26).

PROCHECK

Ramachandran Plot

BjussuMP-I



Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	140	77.3%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	38	21.0%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	1	0.6%
Residues in disallowed regions	2	1.1%

Number of non-glycine and non-proline residues	181	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	3	
Number of glycine residues (shown as triangles)	10	
Number of proline residues	7	

Total number of residues	201	

Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.

Figura 23 – Gráfico de Ramachandran do modelo teórico final do domínio catalítico da BjussuMP-I. Gerado através do programa PROCHECK v.3.5.4 (Laskowski et al., 1993).

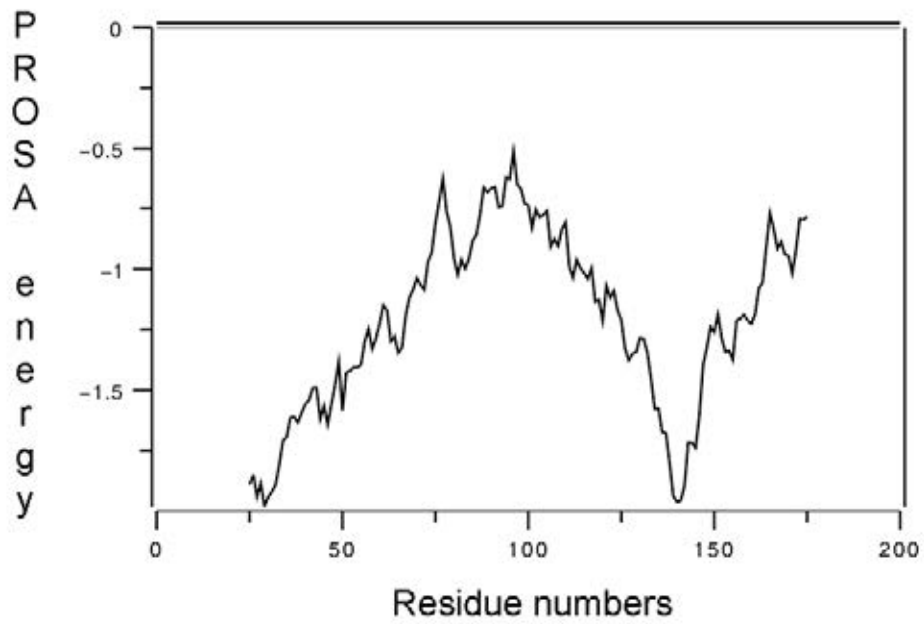


Figura 24 – Gráfico de energia potencial dos resíduos do modelo teórico final do domínio catalítico da BjussuMP-I. Gerado pelo programa ProSa2003 (Sippl, 1993).

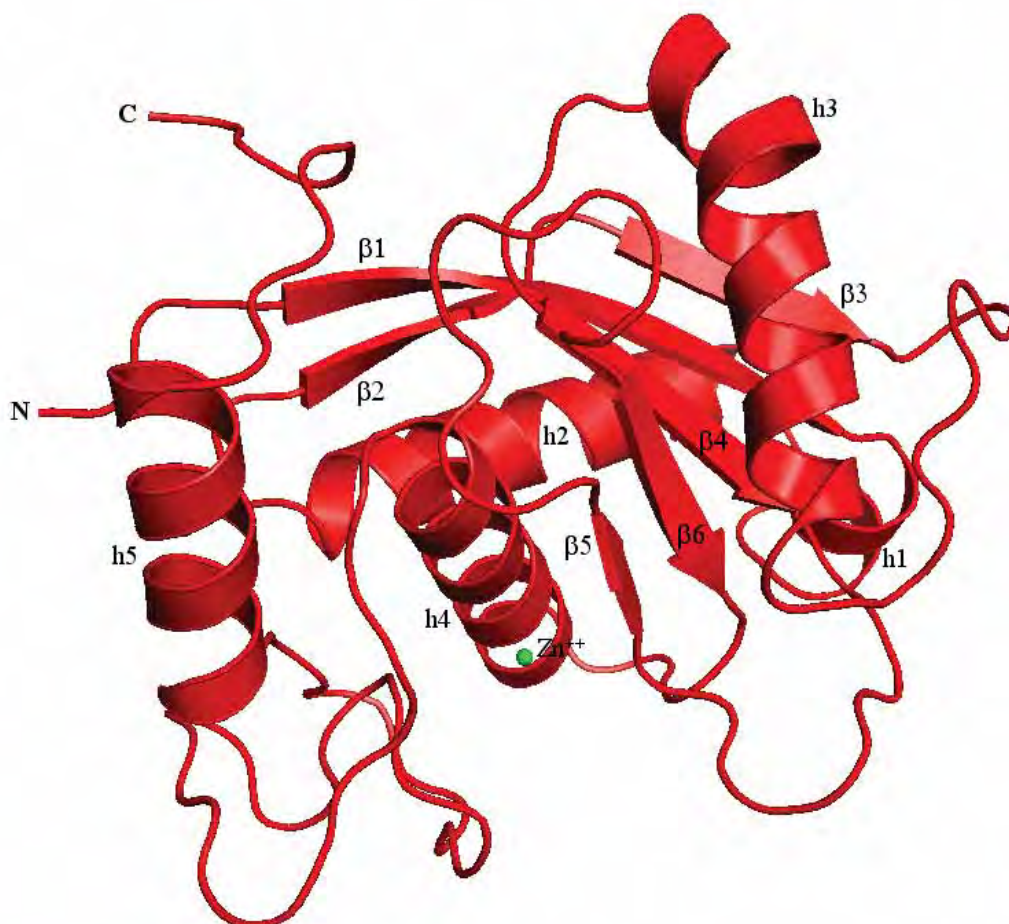


Figura 25 – Estrutura terciária e secundária do modelo teórico final do domínio catalítico da BjussuMP-I. O íon Zn^{++} é representado como uma esfera verde. Figura gerada pelo programa PyMOL (DeLano, 2002).

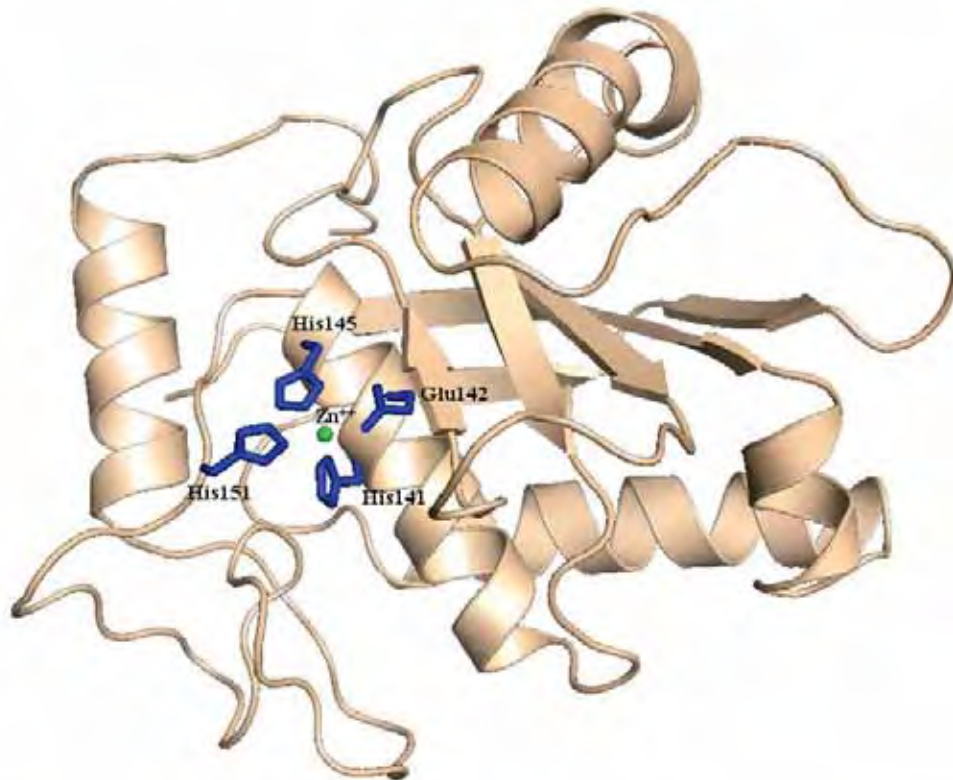


Figura 26 – Modelo teórico final do domínio catalítico da BjussuMP-I mostrando a disposição das cadeias laterais dos resíduos de histidina responsáveis pela reação de catálise. As cadeias laterais dos resíduos de histidina são mostradas em azul e o íon Zn^{++} é representado como uma esfera verde. Figura gerada pelo programa PyMOL (DeLano, 2002).

Relações estruturais-funcionais de algumas metaloproteases de classe P-I vêm sendo identificadas em trabalhos recentes (Watanabe et al., 2003; Ramos & Selistre-de-Araújo, 2004). Estes estudos indicam que a diferenciação entre metaloproteases P-I hemorrágicas e não-hemorrágicas pode ser deduzida com base em comparações estruturais. Assim, nós realizamos uma comparação estrutural entre o domínio catalítico teórico da BjussuMP-I, uma metaloprotease de classe P-III, e as demais seqüências selecionadas nos bancos de dados citados com vistas à obtenção de novas informações a respeito da evolução destas moléculas e de suas atividades bioquímicas. O programa Chimera (Pettersen et al., 2004) foi utilizado para gerar alinhamentos múltiplos de todas as seqüências selecionadas, revelando a posição dos resíduos conservados com base na estrutura tridimensional teórica final do domínio catalítico da BjussuMP-I. A análise do alinhamento das seqüências de todos os domínios catalíticos revelou que alguns poucos resíduos de superfície foram conservados durante a evolução das metaloproteases, ao contrário do que ocorreu com os resíduos internos destas moléculas, que permaneceram praticamente inalterados (Figura 27).

As seqüências componentes de cada um dos grupos determinados a partir dos resultados obtidos pelo estudo filogenético também foram alinhadas exclusivamente entre si. Desta forma, de modo análogo à comparação anterior, os modelos teóricos tridimensionais de uma seqüência de cada conjunto foram utilizados pelo programa Chimera para determinar a posição relativa dos resíduos conservados em cada alinhamento grupo-específico. Assim, o modelo tridimensional teórico do domínio catalítico da BjussuMP-I foi escolhido para a identificação do posicionamento estrutural dos resíduos conservados das SVMPs de viperídeos. Já a mesma análise comparativa realizada somente entre SVMPs de elapídeos, proto-SVMPs e moléculas não relacionadas às SVMPs foram baseadas, respectivamente, nos modelos de *threading* da mocarragina 1 de *Naja mossambica mossambica* (Nmos), de uma proteína hipotética (Xlae-1) e da ADAM 13 (Xlae-2), sendo estas duas últimas seqüências provenientes de *Xenopus laevis*. Uma característica comum aos domínios catalíticos utilizados nestes alinhamentos que emergiu desta comparação foi a manutenção, durante o processo evolutivo, de extensas áreas hidrofóbicas nas superfícies destas moléculas (dados não mostrados). A conservação de tais superfícies hidrofóbicas sugere que esta arquitetura bioquímica foi um fator importante no processo que culminou na transformação de metaloproteases primitivas em toxinas. É provável, portanto, que as porções apolares dos substratos destas metaloproteases mais antigas guardem uma similaridade significativa com os substratos das SVMPs, particularmente no caso daquelas que apresentam atividade hemorrágica. No entanto, o achado mais interessante advindo da comparação citada diz respeito ao fato de que um conjunto de resíduos de superfície conservados foi encontrado em cada um dos quatro grupos (Tabela 5).

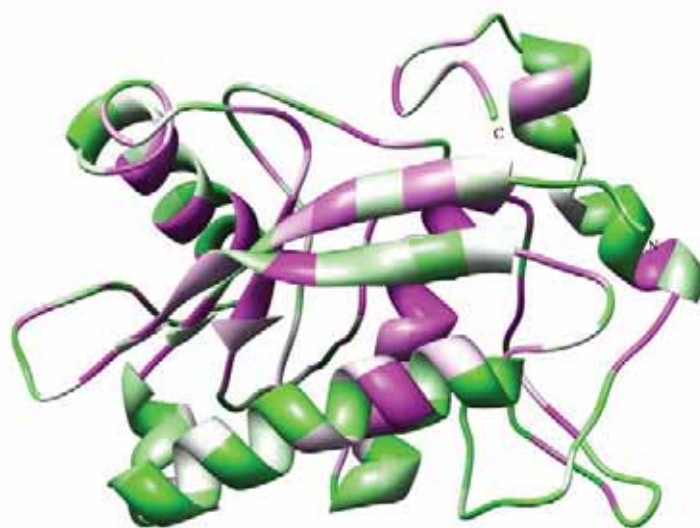


Figura 27 – Representação do tipo ribbons do modelo teórico final do domínio catalítico da BjussuMP-I mostrando o grau de conservação entre os resíduos de todas as seqüências selecionadas nos bancos de dados. As regiões comparativamente mais conservadas são mostradas em magenta e as menos conservadas em verde. Figura gerada pelo programa Chimera (Pettersen et al., 2004).

Tabela 5 – Resíduos de superfície conservados em cada grupo de metaloproteases. Resultados obtidos pelo programa Chimera (Pettersen et al., 2004).

	SVMPs de viperídeos	SVMPs de elapídeos	Proto-SVMPs	Moléculas não relacionadas às SVMPs
Resíduos de superfície conservados	14	56	13	14
Resíduos de superfície conservados positivamente carregados	2	8	5	1
Resíduos de superfície conservados negativamente carregados	-	5	2	2

Contudo, uma análise mais detalhada destes conjuntos de aminoácidos conservados revela que a diferença estrutural mais marcante entre os domínios catalíticos das metaloproteases estudadas está relacionada ao tipo e número dos resíduos de superfície eletricamente carregados presentes em cada um dos grupos elaborados com base nas relações filogenéticas de todas as seqüências selecionadas nos bancos de dados (Figura 28). Este fato fornece uma forte evidência de que estes resíduos de superfície carregados podem desempenhar um papel-chave nas atividades bioquímicas específicas executadas pelas metaloproteases classificadas dentro de cada grupo.

Outra pista para a explicação dos motivos pelos quais os domínios catalíticos das SVMPs e das proto-SVMPs apresentam atividades biológicas diferentes está nas posições 15 e 21 destas proteínas. Nos domínios catalíticos das SVMPs de viperídeos, estas posições são ocupadas por resíduos positivamente carregados (Arg15 ou His15 e Lys20), enquanto que nas proto-SVMPs apenas resíduos não-carregados ocupam tais posições (Ala15 e Phe20). As seqüências de elapídeos também apresentam uma clara predominância de resíduos positivamente carregados nestas mesmas posições. Conseqüentemente, estes resíduos positivamente carregados podem ser essenciais para as funções bioquímicas realizadas pelas SVMPs. Experimentos de mutagênese sítio-específicos que realizem a substituição dos resíduos de superfície conservados destas proteínas por outros tipos de aminoácidos com características bioquímicas distintas podem ajudar a confirmar estas suposições.

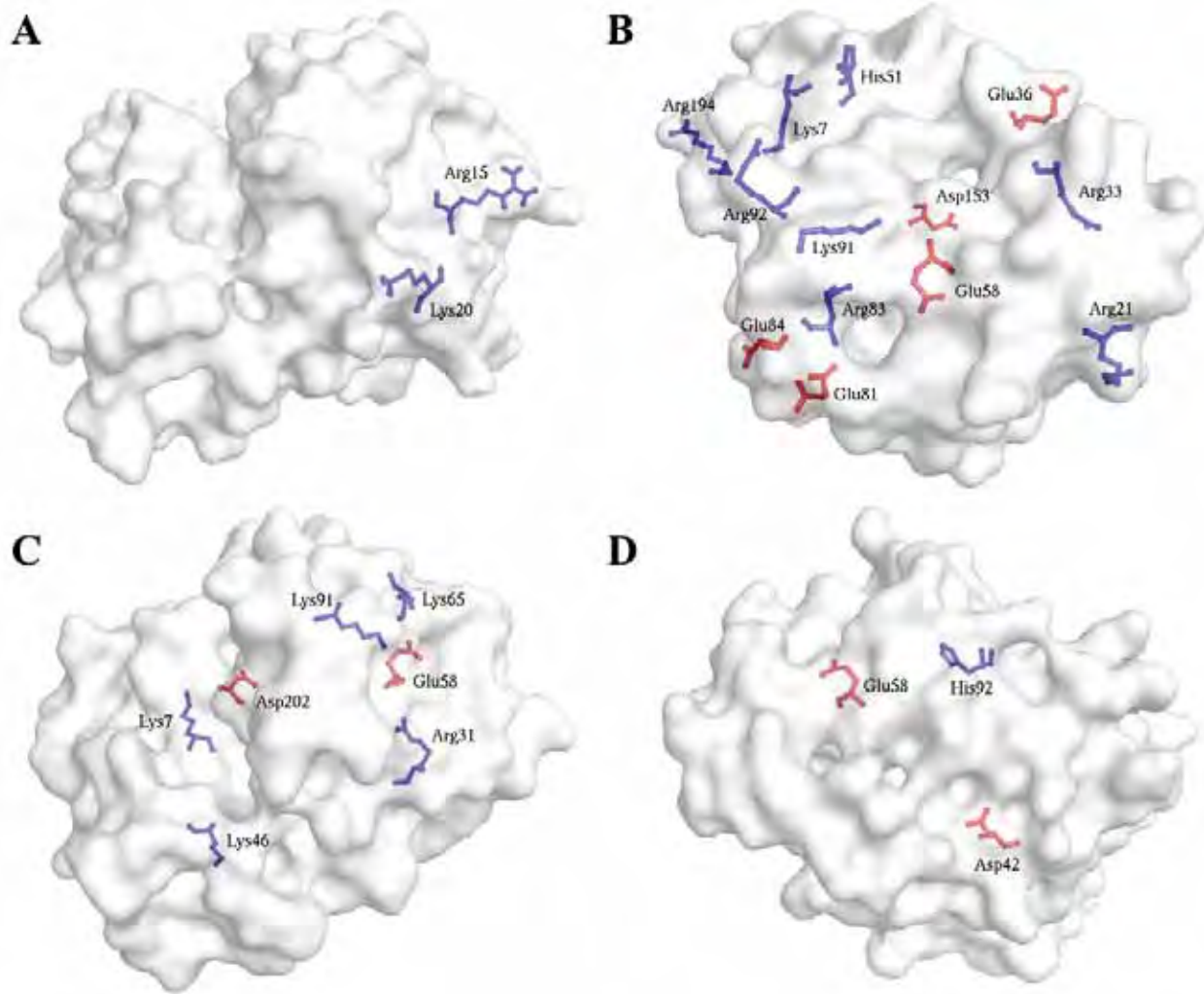


Figura 28 – Resíduos de superfície eletricamente carregados conservados nos domínios catalíticos das metaloproteases. As representações de superfície molecular identificadas como A, B, C e D correspondem, respectivamente, ao modelo final teórico do domínio catalítico da BjussuMP-I e aos modelos de *threading* dos domínios catalíticos da mocarragina 1 de *Naja mossambica mossambica* (Nmos) e de duas seqüências de *Xenopus laevis* – uma proteína hipotética (Xlae-1) (proto-SVMPs) e a ADAM 13 (Xlae-2) (moléculas não relacionadas às SVMPs). Estas estruturas foram utilizadas para a identificação do provável posicionamento dos resíduos de superfície conservados nas seqüências filogeneticamente classificadas como SVMPs de viperídeos (modelo final teórico do domínio catalítico da BjussuMP-I), SVMPs de elapídeos (mocarragina 1 *Naja mossambica mossambica*), proto-SVMPs (proteína hipotética de *Xenopus laevis*) e moléculas não relacionadas às SVMPs (ADAM 13 de *Xenopus laevis*). Os resíduos positivamente e negativamente carregados são mostrados, respectivamente, em azul e vermelho. Esta análise estrutural foi realizada através do programa Chimera (Pettersen et al., 2004) e as representações de superfície molecular dos modelos e dos resíduos conservados foram geradas por intermédio do programa PyMOL (DeLano, 2002).

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados expostos anteriormente, foi possível concluir que:

- 1) A BthA-I nativa provavelmente seja dimérica em condições físico-químicas com valores de pH próximos ao do fisiológico.
- 2) A ligação do inibidor pBPB promove alterações terciárias e quaternárias na estrutura da BthA-I nativa e, provavelmente, inibe a atividade anticoagulante e outros efeitos farmacológicos desta proteína através da modificação dos resíduos de aminoácidos presentes em sua interface dimérica.
- 3) A análise das árvores filogenéticas geradas com as seqüências dos domínios catalíticos das SVMPs comparadas neste trabalho permitiu que estas proteínas fossem divididas em quatro grupos distintos (SVMPs de viperídeos, SVMPs de elapídeos, proto-SVMPs e moléculas não relacionadas às SVMPs), de acordo com suas filogenias e fenótipos.
- 4) A análise filogenética também mostrou que, no início da história evolutiva das SVMPs, havia um claro predomínio de toxinas hemorrágicas, sendo que o surgimento de variantes não-hemorrágicas ocorreu provavelmente devido à adaptação destas moléculas a novas funções.
- 5) A comparação dos modelos estruturais teóricos das SVMPs revelou que estas moléculas são caracterizadas pela presença de grandes áreas hidrofóbicas em suas superfícies e que as seqüências componentes dos quatro grupos determinados pela análise filogenética apresentam conjuntos de resíduos eletricamente carregados conservados em suas superfícies, alguns deles encontrados exclusivamente dentro de cada um dos grupos relacionados (SVMPs de viperídeos, SVMPs de elapídeos, proto-SVMPs e moléculas não relacionadas às SVMPs). Portanto, tais resíduos são provavelmente importantes para a interação das proteínas de cada grupo com seus respectivos substratos.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Como mencionado anteriormente, outro ponto interessante a respeito das PLA₂s é o fato destas moléculas atuarem na síntese de eicosanóides, mediando, desta forma, o estabelecimento dos processos inflamatórios (Needleman et al., 1986). Entre as substâncias naturais que comprovadamente apresentam a capacidade de inibir o processo inflamatório está o α -tocoferol (vitamina E), o qual promove a supressão da atividade das PLA₂s e a interrupção do ciclo da cicloxigenase (Pentland et al., 1992; Traber & Packer, 1995). Recentemente, Chandra et al. (2002) cristalizaram uma PLA₂ ácida do veneno de *Daboia russeli pulchella* ligada a uma molécula de α -tocoferol e demonstraram que o inibidor em questão liga-se ao sítio ativo de um dos monômeros da proteína, promovendo alterações estruturais na mesma. No Apêndice A, são apresentados alguns resultados preliminares por nós obtidos a partir do estudo do complexo BthA-I/ α -tocoferol. Assim, a continuação do estudo estrutural deste complexo e a realização de novos trabalhos com outras PLA₂s nativas e ligadas a inibidores devem ser realizados no futuro por nossa equipe, com o intuito de confirmar os resultados e hipóteses aqui apresentados e discutidos e esclarecer outras questões ainda não respondidas a respeito desta família de moléculas. Entre os novos trabalhos iniciados recentemente pela nossa equipe incluem-se experimentos de espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS) realizados com a BthA-I nativa sob diversas condições distintas de pH. O processamento inicial dos dados de espalhamento das amostras já foi finalizado, o que torna possível que dentro de pouco tempo possamos confrontar os dados relativos à conformação quaternária do modelo cristalográfico da d-BthA-I com aqueles referentes à disposição oligomérica da proteína em solução. A comparação destes dados pode ser de extrema utilidade para a confirmação das teorias propostas neste trabalho ou para uma eventual nova interpretação dos dados obtidos.

Da mesma forma, a realização de novos trabalhos teóricos com outras toxinas botrópicas e moléculas inibidoras que vêm sendo estudadas, identificadas, purificadas e sintetizadas por nossa rede de colaboradores é de suma importância para a rápida aquisição de valiosas informações estruturais, uma vez que a realização de experimentos de cristalização e co-cristalização com todas estas proteínas nativas e complexos pode demandar um período de tempo bastante longo. Estes dados, associados a outros de cunho experimental poderão ser de grande valia para a identificação, caracterização e desenvolvimento (*drug design*) de compostos com grande potencial de uso biotecnológico e farmacológico. Neste último caso, tais produtos contribuiriam para o controle de vários sintomas associados a casos de envenenamento ofídico e de uma miríade de processos patológicos (coagulopatias, doenças inflamatórias degenerativas e auto-imunes, mal de Alzheimer, esquizofrenia e asma, entre outras) cujas etiologias estão relacionadas a moléculas pertencentes aos

mesmos grupos de proteínas onde se encontram classificadas muitas das toxinas botrópicas que estão sendo identificadas e estudadas por nossa equipe de trabalho.

7. REFERÊNCIAS*

AHMED, N.K. et al. Biological and thrombolytic properties of fibrolase – a new fibrinolytic protease from snake venom. **Haemostasis**, v.20, p.334-340, 1990.

ANDREINI, C. et al. Comparative analysis of the ADAM and ADAMTS families. **J. Prot. Res.**, v.4, p.881-888, 2005.

ANDRIÃO-ESCARSO, S.H. et al. Myotoxic phospholipases A_2 in *Bothrops* snake venoms: effects of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**, v.82, p.755-763, 2000.

ANDRIÃO-ESCARSO, S.H. et al. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A_2 from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochem. Pharmacol.**, v.64, p.723-732, 2002.

BAZAN, N.G., COLANGELO, V., LUKIW, W.J. Prostaglandins and other lipid mediators in Alzheimer's disease. Review. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, v.68-69, p.197-210, 2002.

BERENDSEN, J.P.M. et al. Interaction models for water in relation to protein hydration. In: PULLMAN, B. (Ed.). **Intermolecular forces**. D. Reidel Publishing Company: Dordrecht, 1981, p.331-342.

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.

BJARNASON, J.B., FOX, J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacol. Ther.**, v.62, p.325-372, 1994.

BRAUD, S., BON, C., WISNER, A. Snake venoms proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, v.82, p.851-859, 2000.

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

BRÜNGER, A.T. **X-PLOR version 3.1: a system for cristallography and NMR**. New Haven: Yale Press University, 1992.

BRÜNGER, A.T. et al. Crystallography & NMR system (CNS): a new software system for macromolecular structure determination. **Acta Crystallogr.**, v.D54, p.905-921, 1998.

BRUNIE, S. et al. The refined crystal structure of dimeric phospholipase A2 at 2.5 Å. Access to a shielded catalytic center. **J. Biol. Chem.**, v.260, p.9742–9749, 1985.

CARREDANO, E. et al. The three-dimensional structures of two toxins from snake venom throw light on the anticoagulant and neurotoxic sites of phospholipase A2. Review. **Toxicon**, v.36, p.75-92, 1998.

CARSON, M. Ribbons, **Methods Enzymol.**, v.277, p.493-505, 1997.

CHANDRA, V. et al. Regulation of catalytic function by molecular association: structure of phospholipase A2 from *Daboia russelli pulchella* (DPLA2) at 1.9 Å resolution. **Acta Crystallogr.**, v.D57, p.1793-1798, 2001.

CHANDRA, V. et al. First structural evidence of a specific inhibition of phospholipase A2 by alpha-tocopherol (vitamin E) and its implications in inflammation: crystal structure of the complex formed between phospholipase A2 and alpha-tocopherol at 1.8 Å resolution. **J Mol Biol.**, v.320, p.215-22, 2002.

CHIOATO, L. et al. 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.

CHOTHIA, C, LESK, A.M. The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. **EMBO J.**, v.5, p.823-826, 1986.

DEKKER, N. Outer-membrane phospholipase A: known structure, unknown biological function. **Mol. Microbiol.**, v.35, p.711–717, 2000.

DeLANO, W.L. **The PyMOL molecular graphics system**. DeLano Scientific: San Carlos, 2002.

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

FOX, J.W., SERRANO, S.M. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, v.45, p.969-985. 2005.

FRANCISCHETTI, I.M.B. et al. *Bothrops* sp. snake venoms: comparison of some biochemical and physicochemical properties and interference in platelet functions. **Comp. Biochem. Phys.**, v.119, p.21-29, 1998.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Manual de Diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Ministério da Saúde-Brasil. 112 pp.

GOMIS-RÜTH, F.X. Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. **Mol. Biotechnol.**, v.24, p.157-202, 2003.

GONG, W. et al. Crystal structures of acutolysin A, a three-disulfide hemorrhagic zinc metalloproteinase from the snake venom of *Agkistrodon acutus*. **J. Mol. Biol.**, v.283, p.657-668, 1998.

GU, L. et al. Structure of an acidic phospholipase A₂ from the venom of *Deinagkistrodon acutus*. **Acta Crystallogr.**, v.D58, p.104-110, 2002.

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

GUTIÉRREZ, J.M., LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: KINI, R.M. (Ed). **Venom phospholipase A₂ enzymes: structure, function and mechanism**. Chichester: Wiley, 1997. p.321-352.

GUTIÉRREZ, J.M., RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v.82, p.841-850, 2000.

HAN, S.K. et al. Structural aspects of interfacial adsorption. A crystallographic and site-directed mutagenesis study of the phospholipase A2 from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*. **J. Biol. Chem.**, v.272, p.3573-3582, 1997.

HITE, L.A. et al. cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.308, p.182-191, 1994.

HOLM, L., SANDER, C. Protein structure comparison by alignment of distance matrices. **J. Mol. Biol.**, v.233, p.123-138, 1993.

HOLM, L., SANDER, C. Dali: a network tool for protein structure comparison. **Trends Biochem. Sci.**, v.20, p.478-480, 1995.

HUANG, K.F. et al. The 1.35 Å structure of cadmium-substituted TM-3, a snake-venom metalloproteinase from Taiwan habu: elucidation of a TNF-converting enzyme-like active-site structure with a distorted octahedral geometry of cadmium. **Acta Crystallogr.**, v.D58, p.1118-1128, 2002.

JABEEN, T. et al. Crystal structure of a novel phospholipase A2 from *Naja naja sagittifera* with a strong anticoagulant activity. **Toxicon**, v.46, p.865-875, 2005.

JANCARIK, J., KIM, S.H. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. **J. Appl. Cryst.**, v.24, p.409-411, 1991.

JIA, L.G. et al. Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins. **Toxicon**, v.34, p.1269-1272, 1996.

JONES, T.A., BERGDOLL, M., KJELDGAARD, M. Crystallographic and Modeling Methods in Molecular Design. In: BUGG, C.E., EALICK, S.E. (Eds.). **O: a macromolecule modeling environment**. New York: Springer-Verlag, 1990. p.189-195.

KAMIGUTI, A.S. et al. Insights into mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v.34, p.627-642, 1996.

KAWANO, J. et al. Vascular endothelial cell injury induced by *Bothrops jararaca* venom; non-significance of hemorrhagic metalloproteinase. **Toxicon**, v.40, p.1553-1562, 2002.

KINI, R.M. Phospholipase A₂: a complex multifunctional protein puzzle. In: KINI, R.M. (Ed.). **Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism**. Chichester: Wiley, 1997. p.1-28.

KINI, R.M. Structure–function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A₂ enzymes from snake venoms. **Toxicon**, v.45, p.1147-1161, 2005.

KINI, R.M., EVANS, H.J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipase A₂. **Toxicon**, v.27, p.613-635, 1989.

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

KUBOTA, Y., KUROKI, R., NISHIWAKI, K. A fibulin-1 homolog interacts with an ADAM protease that controls cell migration in *C. elegans*. **Curr. Biol.**, v.14, p.2011-2018, 2004.

KUMAR, S., et al. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. **Bioinformatics**, v.17, p.1244-1245, 2001.

LASKOWSKI, R.A., MACARTHUR, M.W., MOSS, D.S., THORNTON, J.M. Procheck: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **J. Appl. Cryst.**, v.26, p.283-291, 1993.

LEE, W.H. et al. Structural basis for low catalytic activity in Lys49- phospholipase A₂ – A hypothesis: the crystal structure of piratoxin II complexed to fatty acid. **Biochemistry**, v.40, p.28-36, 2001.

LINDAHL, E., HESS, B., VAN DER SPOEL, R. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. **J. Mol. Mod.**, v.7, p.306-317, 2001.

MacPHERSON, A. **Preparation and analysis of protein crystals**. New york: Wiley, 1982.

MAGRO, A.J. et al. Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A(2): quaternary structure and inhibition mechanism insights. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.311, p.713-720, 2003.

MAGRO, A.J. et al. Crystal structure of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A2 in the monomeric and dimeric states: insights into its oligomeric state. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.323, p.24-31, 2004.

MARKLAND, F.S. Fibrinase, an active thrombolytic enzyme in arterial and venous thrombosis model systems. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.391, p.427-438, 1996.

MARTI-RENOM, M.A. et al. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.**, v.29, p.291-325, 2000.

MATSUI, T., FUJIMURA, Y., TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1477, p.146-156, 2000.

MAZZI, M.V. et al. A new hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom: isolation and biochemical characterization. **Toxicon**, v.44, p.215-223, 2004.

MAZZI, M.V. et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of BjuMP-I: a RGD-P-III class hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom. **J. Mol. Graph. Model.**, v.26, p.69-85, 2006.

MURAKAMI, M.T. et al. Insights into metal ion binding in phospholipases A2: ultra high-resolution crystal structures of an acidic phospholipase A2 in the Ca²⁺ free and bound states. **Biochimie**, v.88, p.543-549, 2006.

NAVAZA, J. AMoRe: an automated package for molecular replacement. **Acta Crystallogr.**, v.A50, p.157-163, 1994.

NEEDLEMAN, P., TURK, J., JAKSCHIK, B.A., MORRISON, A.R., LEFKOWITH, J.B. Arachidonic acid metabolism. **Ann. Rev. Biochem.**, v.55, p.69-102, 1986.

NOPONEN, M. et al. Elevated PLA2 activity in schizophrenics and other psychiatric patients. **Biol. Psychiatry.**, v.34, p.641-649, 1993.

OKUDA, D., MORITA, T. Purification and characterization of a new RGD/KGD-containing dimeric disintegrin, piscivostatin, from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*: the unique effect of piscivostatin on platelet aggregation. **J. Biochem.**, v.130, p.407-415, 2001.

OLIVEIRA, A.H. et al. A pH-induced dissociation of the dimeric form of a lysine 49-phospholipase A2 abolishes Ca²⁺-independent membrane damaging activity. **Biochemistry**, v.40, p.6912-6920, 2001.

OOSTENBRINK, C. et al. 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. **Methods Enzymol.**, v.276, p.307-326, 1997.

OUYANG, C., TENG, C.M., HUANG, T.F. Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. **Toxicon**, v.30, p.945-966, 1992.

OWNBY, C.L. Structure, function, and biophysical aspects of the myototoxins from snake venoms. **J. Toxicol. Toxin. Rev.**, v.17, p.1003-1009, 1998.

PAINE, M.J. et al. Purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. Insights into the disintegrin gene family. **J. Biol. Chem.**, v.267, p.22869-22876, 1992.

PAN, Y.H. et al. Five coplanar anion binding sites on one face of phospholipase A2: relationship to interface binding. **Biochemistry**, v.40, p.609-617, 2001.

PEARSON, W.R. Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. **Methods Enzymol.**, v.183, p.63-98, 1990.

PENTLAND, A.P., MORRISON, A.R., JACOBS, S.C., HRUZA, L.L., HEBERT, J.S., PACKER, L. Tocopherol analogs suppress arachidonic acid metabolism *via* phospholipase inhibition. **J. Biol. Chem.**, v.267, p.15578-15584, 1992.

PETTERSEN, E.F. et al. UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. **J. Comput. Chem.**, v.25, p.1605-1612, 2004.

PODBILEWICZ, B. ADM-1, a protein with metalloprotease- and disintegrin-like domains, is expressed in syncytial organs, sperm, and sheath cells of sensory organs in *Caenorhabditis elegans*. **Mol Biol Cell.**, v.7, p.1877-1893, 1996.

RAHMAN, S. et al. Differential recognition of snake venom proteins expressing specific Arg-Gly-Asp (RGD) sequence motifs by wild-type and variant integrin α IIb β 3: further evidence for distinct sites of RGD ligand recognition exhibiting negative allosterity. **Biochem. J.**, v.345, p.701-709, 2000.

RAMOS, O.H.P., CARMONA, A.K., SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S. Expression, refolding, and *in vitro* activation of a recombinant snake venom prometalloprotease. **Protein Expr. Purif.**, v.28, p.34-41, 2003.

RAMOS, O.H.P., SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S. Comparative analysis of the catalytic domain of hemorrhagic and non-hemorrhagic snake venom metalloproteases using bioinformatic tools. **Toxicon**, v.44, p.529-538, 2004.

RAMOS, O.H.P., SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S. Snake venom metalloproteases – structure and function of catalytic and disintegrin domains. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.**, v.142, p.328-346, 2006.

RENETSEDER, R. et al. A comparison of the crystal structures of phospholipase A2 from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. **J. Biol. Chem.**, v.260, p.11627-11636, 1985.

RIGDEN, D.J. et al. The structure of the D49 phospholipase A2 piratoxin III from *Bothrops pirajai* reveals unprecedented structural displacement of the calcium-binding loop: possible relationship to cooperative substrate binding. **Acta Crystallogr.**, v.D59, p.255-262, 2003.

ROBERTO, P.G. et al. Cloning and identification of a complete cDNA coding for a bactericidal and antitumoral acidic phospholipase A2 from *Bothrops jararacussu* venom. **Protein J.**, v.23, p.273-285, 2004a.

ROBERTO, P.G. et al. Cloning and expression of an acidic platelet aggregation inhibitor phospholipase A2 cDNA from *Bothrops jararacussu* venom gland. **Protein Expr. Purif.**, v.37, p.02-108, 2004b.

RODRIGUES, V.M., SOARES, A.M., GUERRA-SÁ, R. Structural and functional characterization of neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.381, p.213-224, 2000.

RODRIGUES, V.M. et al. Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venom: biochemical characterization and biological activity. **Comp. Bioch. Physiol.**, v.121A, p.215-222, 1998.

ROSENBERG, P. Phospholipases. In: Shier, W.T., Mebs, D. (Eds.). **Handbook of Toxinology**. New York: Marcel Dekker, 1990. p.67-277.

ROSS, B.M. et al. Increased phospholipid breakdown in schizophrenia. Evidence for the involvement of a calcium-independent phospholipase A2. **Arch. Gen. Psychiatry**, v.54, p.487-494, 1997.

ROSS, B.M. et al. Elevated activity of phospholipid biosynthetic enzymes in substantia nigra of patients with Parkinson's disease. **Neuroscience**, v.102, p.899-904, 2001.

SANCHEZ, S.A. et al. Solution and interface aggregation states of *Crotalus atrox* venom phospholipase A2 by two-photon excitation fluorescence correlation spectroscopy. **Biochemistry**, v.40, p.6903-6911, 2001.

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

SCOTT, D.L. et al. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A₂. **Science**, v.250, p.1541-1546, 1990.

SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S., SOUZA, D.H.F., OWNBY, C.L. Analysis of a cDNA sequence encoding a novel member of the snake venom metalloproteinase, disintegrin-like, cysteine-rich (MDC) protein family from *Agkistrodon contortrix laticinctus*. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1342, p.109-115, 1997.

da SILVA-GIOTTO, M.T. et al. Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: conformational changes in bothropstoxin I, a dimeric Lys49-phospholipase A₂ homologue. **Prot. Struc. Func. Gen.**, v.30, p.442-54, 1998.

SIX, D.A., DENNIS, E.A. The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1488, p.1-9, 2000.

SHI, J., BLUNDELL, T.L., MIZUGUCHI, K. FUGUE: sequence-structure homology recognition using environment-specific substitution tables and structure-dependent gap penalties. **J. Mol. Biol.**, v.310, p.243-257, 2001.

SNIJDER, H.J. et al. Structural evidence for dimerization-regulated activation of an integral membrane phospholipase. **Nature**, v.401, p.717-721, 1999.

SOARES, A.M. et al. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.378, p.201-209, 2000.

SIPPL, M.J. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Proteins**, v.17, p.355-362, 1993.

SOARES, A.M. et al. Alkylation of myotoxic phospholipases A₂ in *Bothrops moojeni* venom: a promising approach to an enhanced antivenom production. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.C36, p.258-270, 2004.

SÖDING, J., BIEGERT, A., LUPAS, A.N. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. **Nucl. Acids Res.**, v.33, p.244-248, 2005.

STÖCKER, W., BODE, W. Structural features of a superfamily of zincendopeptidases: the metzincins. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v.5, p.383-390, 1995

STÖCKER, W. et al. The metzincins-topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. **Protein Sci.**, v.4, p.823-840, 1995.

TAKEDA, A.A.S. et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of an acidic phospholipase A(2) complexed with p-bromophenacyl bromide and alpha-tocopherol inhibitors at 1.9- and 1.45-Å resolution. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1699, p.281-284. 2004.

THOMPSON, J.D. et al. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucl. Acids Res.**, v.24, p.4876-4882, 1997.

TOOMBS, C.F. Alfimeprase: pharmacology of a novel fibrinolytic metalloproteinase for thrombolysis. **Haemostasis**, v.31, p.141-147, 2001.

TRABER, M.G, PACKER, L. Vitamin E: beyond antioxidant function. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.62, p.1501-9, 1995.

VOLWERK, J.J., PIETERSON, W.A., DE HAAS, G.H. Phospholipase A₂ and its zymogen from porcine pancreas. VI. Histidine at the active site of phospholipase A₂. **Biochemistry**, v.13, p.1446-1454, 1974.

VALENTIN, E., LAMBEAU, G. What can venom phospholipase A₂ tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipase A₂? **Biochimie**, v.82, p.815-31, 2000.

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, 1995.

WANG, X. et al. Crystal structure of an acidic phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon halys* Pallas at 2.0 Å resolution. **J. Mol. Biol.**, v.255, p.669-676, 1996.

WARD, R.J. et al. Active-site mutagenesis of a Lys49-phospholipase A₂: biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis. **Biochem. J.**, v.362, p.89-96, 2002.

WATANABE, L. et al. Amino acid sequence and crystal structure of BaP1, a metalloproteinase from *Bothrops asper* snake venom that exerts multiple tissue-damaging activities. **Protein Sci.**, v.12, p.2273-2281, 2003.

WHITE, J. Snake venoms and coagulopathy. **Toxicon**, v.45, p.951-967, 2005.

XU, S. et al. Structures of cadmium-binding acidic phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon halys* Pallas at 1.9Å resolution. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.300, p.271-277, 2003.

YAHALOM, D. et al. Identification of the principal binding site for RGD-containing ligands in the alpha(V)beta(3) integrin: a photoaffinity crosslinking study. **Biochemistry**, v.41, p.8321-8331, 2002.

ZHANG, X., et al. Effect of calcium ion on the structure and function of phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon halys* Pallas. **Chin. Biochem. J.**, v.10, p.330-334. 1994.

ZHAO, H. et al. Structure of a snake venom phospholipase A₂ modified by p-bromo-phenacyl-bromide. **Toxicon**, v.36, p.875-886, 1998.

ZHOU, Q., SMITH, J.B., GROSSMAN, M.H. Molecular cloning and expression of catrocollastatin, a snake-venom protein from *Crotalus atrox* (western diamondback rattlesnake) which inhibits platelet adhesion to collagen. **Biochem. J.**, v.307, p.411-417, 1995.

ZHU, X., TENG, M., NIU, L. Structure of acutolysin-C, a haemorrhagic toxin from the venom of *Agkistrodon acutus*, providing further evidence for the mechanism of the pH-dependent proteolytic reaction of zinc metalloproteinases. **Acta Crystallogr.**, v.D55, p.1834-1841, 1999.

APÊNDICE A

Resultados preliminares do estudo estrutural do complexo BthA-I/ α -tocoferol

Cristalização do complexo BthA-I/ α -tocoferol

Os cristais do complexo BthA-I/ α -tocoferol foram obtidos pelo emprego da técnica de *sitting drop* (MacPherson, 1982), utilizando-se a mesma condição de cristalização da d-BthA-I. Inicialmente 2,0 μ l de solução de proteína com uma concentração de 12,0 mg/mL foram depositados sobre 2,0 μ l de uma solução viscosa de α -tocoferol e incubados por 20 minutos a uma temperatura aproximada de 22,0 °C. Em seguida, uma gota de 2,0 μ l contendo 0,2 M de sulfato de amônio e 28,0 % de polietilenoglicol 4000 foi adicionada e misturada à solução da proteína. Os melhores cristais apresentaram as dimensões aproximadas de 0,7 x 0,3 x 0,2 mm (Figura 29), após um período de incubação que variou entre 14 e 21 dias, sob uma temperatura de 291 K.

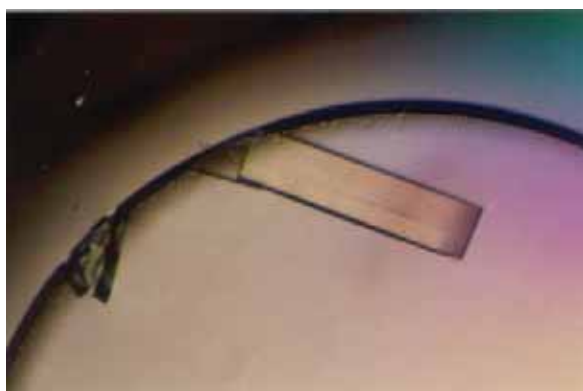


Figura 29 – Cristal do complexo BthA-I/ α -tocoferol.

Experimentos de difração de raios-X, processamento das imagens e elucidação estrutural do complexo BthA-I/ α -tocoferol

Os experimentos de difração de raios-X com o complexo BthA-I/ α -tocoferol foram realizados com dois cristais distintos nas instalações do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) (Campinas/SP) com o emprego de radiação síncrotron ($\lambda = 1,38\text{\AA}$) e de uma placa de detecção de imagens MAR CCD (MAR research[®]). Ambos os cristais foram acondicionados em *loops* de *nylon* e congelados sob um fluxo de nitrogênio com temperatura de 100 K. As imagens obtidas foram subsequentemente processadas através dos programas DENZO e SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1997). Os cálculos realizados durante o processamento das imagens obtidas

indicaram que um dos cristais apresentava uma simetria do tipo C_2 e que sua unidade assimétrica era constituída por um monômero (m-BthA-I/ α -tocoferol), enquanto que o outro apresentava uma simetria do tipo $P2_1$ e um dímero em sua unidade assimétrica (d-BthA-I/ α -tocoferol) (Figuras 30A e 30B). Os dados referentes aos experimentos de difração de raios X e ao processamento das imagens são mostrados na Tabela 6.

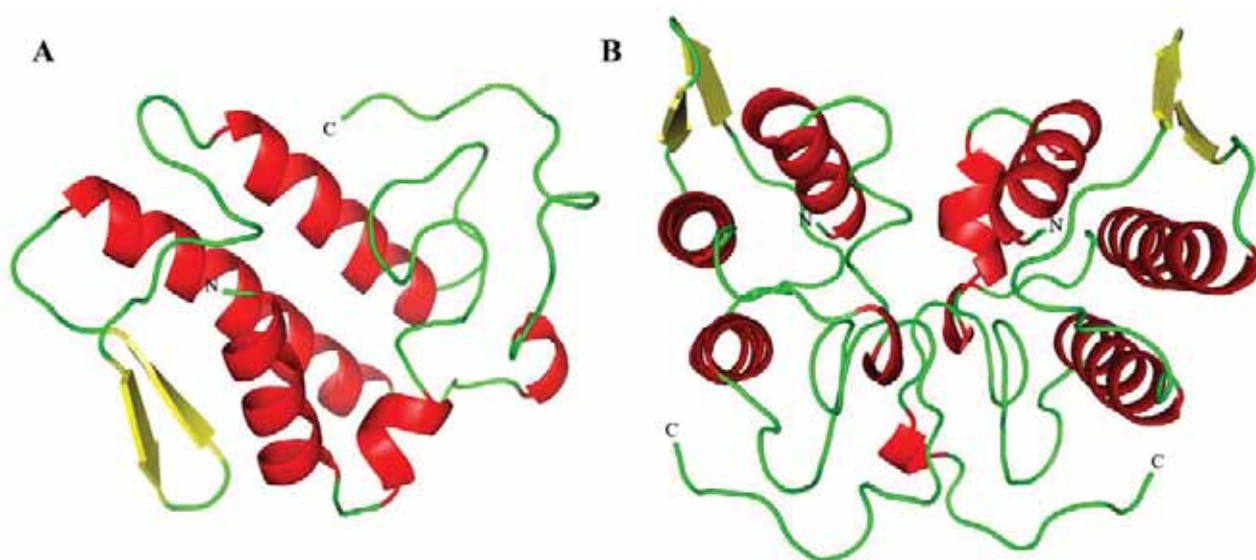


Figura 30 – Estruturas das formas monomérica e dimérica do complexo BthA-I/ α -tocoferol. Em (A) está representado o complexo monomérico (m-BthA-I/ α -tocoferol), e em (B) o complexo dimérico (d-BthA-I/ α -tocoferol).

As estruturas cristalinas dos complexos m-BthA-I/ α -tocoferol e d-BthA-I/ α -tocoferol foram determinadas através do método da substituição molecular realizada pelo programa AMoRe (Navaza, 1994), utilizando-se as coordenadas da BthA-I nativa dimérica (código PDB: 1u73) (Magro et al., 2004) como modelo. Entretanto, após os trabalhos iniciais de modelagem/refinamento não foram identificadas densidades eletrônicas suficientemente compatíveis com a presença do α -tocoferol nos sítios catalíticos das moléculas que compunham os cristais, o que indica o baixo grau de ocupação destes sítios pelo inibidor nas formas monomérica e dimérica do complexo. Possivelmente, o tempo e a temperatura de incubação utilizados, que podem ter dificultado a solubilização do inibidor, e determinadas propriedades químicas da emulsão de α -tocoferol (como, por exemplo, o grau de pureza) estejam relacionadas à falha na formação do complexo.

Assim, com vistas à obtenção de um grau maior de ocupância do sítio catalítico da proteína pelas moléculas de α -tocoferol, outros experimentos de cristalização devem ser realizados em novas condições de temperatura. De forma adicional, compostos de pureza superior (o grau de pureza da emulsão utilizada até o momento nos experimentos de cristalização é da ordem de 95 %)

e outros tipos de apresentação do composto inibitório, como o acetato de α -tocoferol, também podem ser utilizados em novos experimentos de cristalização.

Tabela 6 – Dados dos experimentos de difração de raios X e processamento das imagens das formas cristalinas monomérica e dimérica (m-BthA-I/ α -tocoferol e d-BthA-I/ α -tocoferol) do complexo BthA-I/ α -tocoferol.

	m-BthA-I/α-tocoferol	d-BthA-I/α-tocoferol
Cela unitária (Å)	a=54,5; b=47,2; c=47,1; β =100,4	a=35,8; b=67,6; c=52,8 β =104,9
Grupo espacial	C2	P2 ₁
Resolução (Å)	30,0-1,45 (1,52-1,45) ^a	18,39-1,5 (1,59-1,50) ^a
Reflexões únicas	20645 (2482) ^a	33620 (2522) ^a
Completeza (%)	98,5 (95,4) ^a	86,3 (85,7) ^a
R_{merge}^b (%)	5,5 (14,2) ^a	5,8 (18,5) ^a
Sigma cutoff (I) (processamento de dados)^c	-3	-3
I/σ (I)	17,1 (7,0) ^a	15 (4,0) ^a
Redundância	7,1 (3,6) ^a	2,8 (2,8) ^a
Coefficiente de Matthews (V_m) (Å³/Da)	2,17	2,25
Nº de moléculas na unidade assimétrica	1	2
Conteúdo de solvente (%)	41,3	43,2

^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 Processamento dos dados realizado com os programas DENZO e SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1997).



Crystal structure of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A₂ in the monomeric and dimeric states: insights into its oligomeric state[☆]

Angelo J. Magro^{a,1}, Mário T. Murakami^{b,1}, Silvana Marcussi^c, Andreimar M. Soares^c, Raghuvir K. Arni^b, Marcos R.M. Fontes^{a,*}

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

^b Departamento de Física, IBILCE, UNESP, São José do Preto-SP, Brazil

^c Unidade de Biotecnologia, UNAERP, Ribeirão Preto-SP, Brazil

Received 4 August 2004

Available online 21 August 2004

Abstract

Phospholipases A₂ belong to the superfamily of proteins which hydrolyzes the *sn*-2 acyl groups of membrane phospholipids to release arachidonic acid and lysophospholipids. An acidic phospholipase A₂ isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom presents a high catalytic, platelet aggregation inhibition and hypotensive activities. This protein was crystallized in two oligomeric states: monomeric and dimeric. The crystal structures were solved at 1.79 and 1.90 Å resolution, respectively, for the two states. It was identified a Na⁺ ion at the center of Ca²⁺-binding site of the monomeric form. A novel dimeric conformation with the active sites exposed to the solvent was observed. Conformational states of the molecule may be due to the physicochemical conditions used in the crystallization experiments. We suggest dimeric state is one found in vivo.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: X-ray crystallography; Acidic phospholipase A₂; *Bothrops jararacussu* venom; Platelet aggregation and hypotensive effects; Crystal structure; Oligomeric state; Dimeric phospholipase A₂

Phospholipases A₂ (PLA₂, EC 3.1.1.4) belong to the superfamily of proteins which hydrolyzes the *sn*-2 acyl groups of membrane phospholipids to release arachidonic acid and lysophospholipids. The superfamily of PLA₂s is divided into 11 classes [1], of which five (I, II, III, V, and X) are abundant in a variety of biological fluids, particularly pancreatic secretions, inflammatory

exudates, and reptile and arthropod venoms [2]. PLA₂s are the major components of snake venoms, being those of group IIA predominant in *Bothrops* venoms. In addition to their primary catalytic role, snake venoms PLA₂s show other important toxic/pharmacological effects including myonecrosis, neurotoxicity, cardiotoxicity, and hemolytic, hemorrhagic, hypotensive, anticoagulant, platelet aggregation inhibition, and edema-inducing activities [3–5]. Some of these activities correlate with the enzymatic activity and others are completely independent [6,7].

PLA₂s are also one of the enzymes involved in the production of eicosanoids. These molecules have physiological effects at very low concentrations; however, the increasing of their concentration can lead to the state of

[☆] Abbreviations: PLA₂, phospholipase A₂; BthA-I, acidic phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* venom; m-BthA-I, monomeric acidic phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* venom; d-BthA-I, dimeric acidic phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* venom.

* Corresponding author. Fax: +55 14 38153744.

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

¹ These authors contributed equally to this work.

inflammation [8]. Then, the study of specific PLA₂s inhibitors can be important in the production of structure-based anti-inflammatory agents.

A group of myotoxic Phospholipases A₂ homologues present in the venoms of some species of *Agkistrodon*, *Bothrops*, and *Trimeresurus* (family Viperidae) is characterized by a Lys to Asp substitution of residue 49 [9,10]. The coordination of the Ca²⁺ ion in the PLA₂ calcium-binding loop includes an Asp at position 49 which plays a crucial role in the stabilization of the tetrahedral transition state intermediate in catalytically active phospholipases A₂ [11]. Therefore, the Asp49 to Lys substitution drastically affects the calcium-binding ability of these Lys49-PLA₂ homologues and, as a consequence, they present a very limited catalytic activity.

Many basic Lys49-PLA₂s have been purified from *Bothrops* snake venoms and structurally and functionally characterized [12–18]. However, little is known about the bothropic Asp49-PLA₂s [19–21]. Two basic myotoxic phospholipases A₂, the bothropstoxin-I (Lys49-BthTX-I—catalytic inactive) and II (Asp49-

BthTX-II—low catalytic activity), have been isolated from *Bothrops jararacussu* venom and characterized [15,18,22,23]. BthA-I is three to four times more active catalytically than BthTX-II and other basic Asp49 PLA₂ from *Bothrops* venoms, however, it is not myotoxic, cytotoxic or lethal. Although it showed no toxic activity, it was able to induce time-independent edema. In addition, BthA-I caused a hypotensive response in rats and inhibited platelet aggregation [24]. Catalytic, desintegrin, and pharmacological activities were abolished by chemical modification with *p*-bromophenacyl bromide, which covalently binds to His48 of the catalytic site [24]. In order to better understand the structure–function relationship of these bothropic proteins, the cDNA sequence cloning, functional expression crystallization, and X-ray diffraction data of BthA-I-PLA₂ were recently described [24–26].

In this paper, we described the high resolution crystal structures of BthA-I-PLA₂ in two oligomeric states: monomeric and dimeric.

Table 1
X-ray data collection and refinement statistics

	d-BthA-I	m-BthA-I
Unit cell (Å)	$a = 33.19$ $b = 63.14$ $c = 47.40$ $\beta = 102.3$	$a = 39.98$ $b = 53.99$ $c = 90.46$
Space group	P2 ₁	C222 ₁
Resolution (Å)	29.7–1.9 (2.02–1.9) ^a	30.0–1.79 (1.84–1.79) ^a
Unique reflections	14,151 (2084) ^a	9034 (507) ^a
Completeness (%)	93.3 (87.7) ^a	94.3 (80.1) ^a
R_{merge}^b (%)	4.5 (29.3) ^a	4.6 (15.3) ^a
$I/\sigma(I)$	20.1 (5.0) ^a	22.1 (6.0) ^a
Redundancy	3.5 (3.4) ^a	5.7(1.2) ^a
R_{Cryst}^c (%)	19.0 (23.8) ^a	18.6 (24.6) ^a
R_{free}^d (%)	24.7 (28.5) ^a	25.5 (33.8) ^a
Number of non-hydrogen atoms:		
Protein	1900	949
Water	381	144
Mean <i>B</i> factor (Å ²) ^e		
Overall	27.8	23.2
Main chain atoms	34.6	17.4
Side chain atoms	35.6	19.4
Water molecules	49.0	27.9
Na ⁺ ion	38.1	—
R.m.s deviations from ideal values ^e		
Bond lengths (Å)	0.005	0.018
Bond angles (°)	1.3	1.9
Ramachandran plot ^f (%)		
Residues in most favored region	90.7	92.2
Residues in additional allowed region	9.3	7.8
Residues in generously/disallowed regions	0.0	0.0
Coordinate error (Å) ^e		
Luzzati plot (cross-validated Luzzati plot)	0.20 (0.28)	0.18 (0.38)
SIGMAA (cross-validated SIGMAA)	0.22 (0.22)	0.11 (0.11)

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

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

^c $R_{\text{Cryst}} = \sum_{hkl} (||\text{Fobs}_{hkl}|| - |\text{Fcalc}_{hkl}|) / |\text{Fobs}_{hkl}|$, where $|\text{Fobs}_{hkl}|$ and $|\text{Fcalc}_{hkl}|$ 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 process.

^e Calculated with the program CNS [30].

^f Calculated with the program PROCHECK [34].

Materials and methods

Isolation, cDNA cloning, and sequencing. BthA-I-PLA₂ was isolated from *B. jararacussu* snake venom by ion-exchange chromatography on CM-Sepharose followed by reverse phase chromatography on a RP-HPLC C-18 column [24]. The amino acid sequence of BthA-I-PLA₂ was deduced from the cDNA sequence and deposited in GenBank (AY145836) [25,26].

Crystallization and data collection. BthA-I-PLA₂ was crystallized in two different conditions: 0.2 M ammonium sulfate and 22% (w/v) polyethylene glycol 6000 (d-BthA-I) [24]; and 0.1 M sodium acetate (pH 4.6) and 28% polyethylene glycol 4000 (m-BthA-I). Lyophilized sample of BthA-I-PLA₂ was dissolved in ultra-pure water at a concentration of 10 and 12 mg/mL, respectively, for crystals of m-BthA-I and d-BthA-I. The crystals were flash-frozen (15% glycerol for m-BthA-I) and diffraction data were collected at a wavelength of 1.38 Å (at 100 K) using a Synchrotron Radiation Source (LNLS, Campinas, Brazil). Diffraction intensities were measured using a MAR 345 imaging-plate detector and were reduced and processed using the HKL suite [27]. The data sets are 94.3% and 93.3% complete at 1.79 and 1.9 Å resolution with $R_{\text{merge}} = 4.6\%$ and 4.5% for m-BthA-I and d-BthA-I, respectively. The m-BthA-I crystals belong to the space group C222₁ and for m-BthA-I to the space group P2₁. Data processing statistics are presented in Table 1.

Structure determination and refinement. The crystal structures of m-BthA-I and d-BthA-I were solved by the Molecular Replacement Method using the program AMoRe [28] and the coordinates of the Lys49-PLA₂ from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* (PDB code 1VAP) [29]. The model choice was based on the best results of correlation and R factor from the AMoRe program. After a cycle of simulated annealing refinement using the CNS program [30], the electron densities were inspected and the amino acid sequence as obtained from the cDNA of BthA-I [25,26] was inserted for both m-BthA-I and d-BthA-I. The modeling process was always performed by manually rebuilding with the "O" program [31]. Electron density maps calculated with coefficients $3|F_{\text{obs}}| - 2|F_{\text{calc}}|$ and simulated annealing omit maps calculated with analogous coefficients were generally used. The model was improved, as judged by the free R factor [32], through rounds of crystallographic refinement (positional and restrained individual B factor refinement, with an overall anisotropic temperature factor and bulk solvent correction) using the CNS program [30], and manual rebuilding with the "O" program [31]. Solvent molecules were added and refined also with the program CNS [30]. In the last stages of refinement of m-BthA-I the program REFMAC 5.0 was used [33].

The refinement converged to R and free R factors of 18.3% and 24.3%; 19.0% and 24.7%, respectively, for m-BthA-I and d-BthA-I (see Table 1 for explanation of R factors). The final models comprise 950 protein atoms and 144 water molecules for m-BthA-I, and 1900 protein atoms and 381 water molecules for d-BthA-I. The refinement statistics are shown in Table 1. For molecular comparisons of the Lys49-PLA₂ structures, the "O" program [31] was used with only the C α coordinates. The quality of the model was checked with the PROCHECK program [34]. The coordinates have been deposited in the RCSB Protein Data Bank with ID code 1UMV and 1U73, respectively, for m-BthA-I and d-BthA-I.

Results

The structures showed overall stereochemistry better than expected for an average structure at the same resolution, where no residue was found in the disallowed or generously allowed regions of Ramachandran plot, and with the overall Procheck G factor of 0.4 and -0.1 for d-BthA-I and m-BthA-I, respectively [34].

The m-BthA-I and d-BthA-I monomers are very similar to other class IIA PLA₂ structures. As is usual for other proteins of this class, there are seven disulfide bridges and the main secondary structural elements are conserved. The structure is composed of: (i) N-terminal α -helix 1, (ii) Ca²⁺-binding loop, (iii) two anti-parallel α -helices 2 and 3, (iv) short two-stranded anti-parallel β -sheet (β -wing), and (v) C-terminal loop (Fig. 1A).

The monomers of m-BthA-I and d-BthA-I are essentially identical, where the r.m.s. deviation of C α atoms is 0.49 Å for both superposition of d-BthA-I monomer A and m-BthA-I, and d-BthA-I monomer B and m-BthA-I. The average B factors for m-BthA-I and d-BthA-I are 25.6 and 18.6 Å², respectively (calculated without solvent molecules).

In the active site for both structures, there is just a water molecule bound to His48 and Lys49 residues.

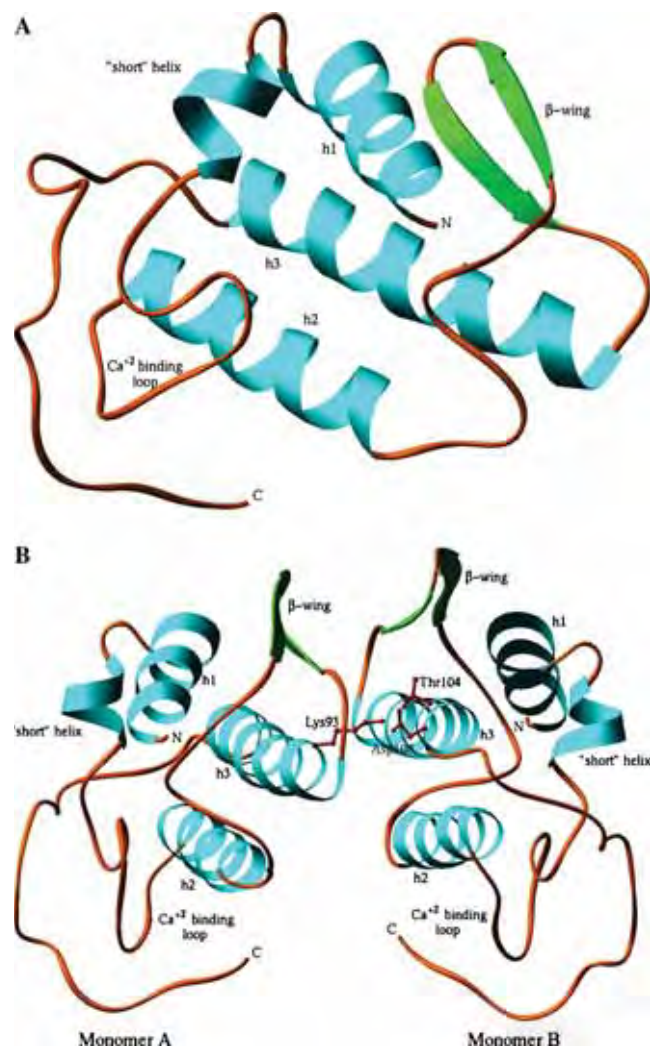


Fig. 1. Structures of (A) m-BthA-I and (B) d-BthA-I are shown as a ribbon diagram [35]. The residues Thr104, Asp108, and Lys93 of interface of monomers of d-BthA-I are shown in a ball-stick representation.

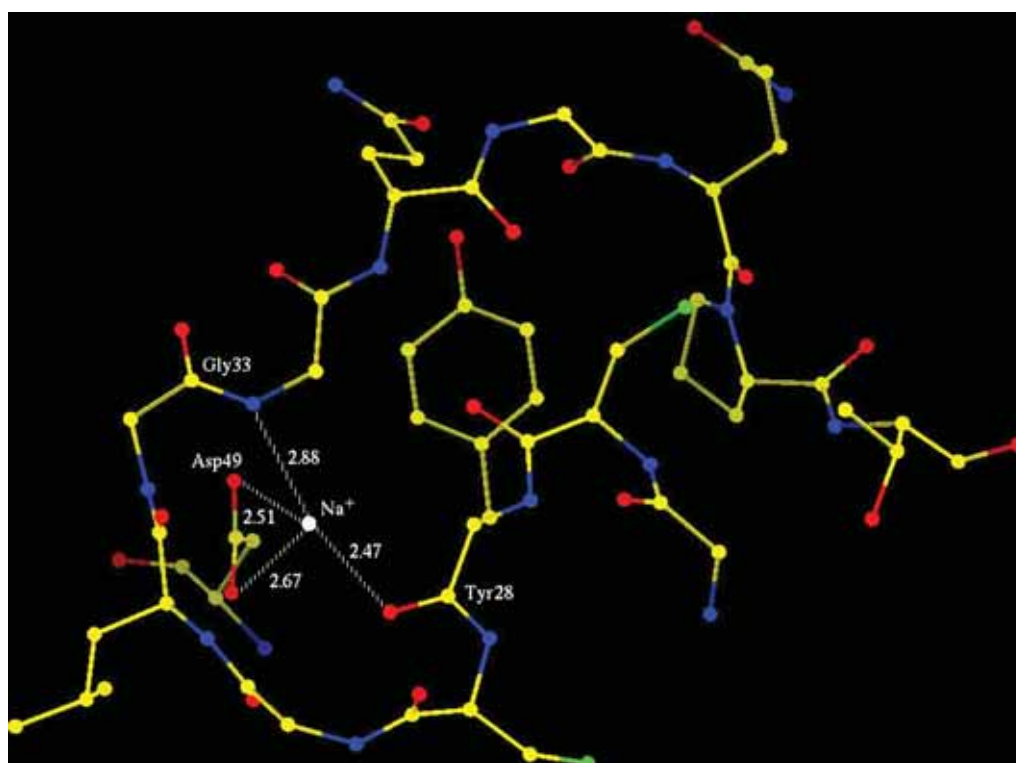


Fig. 2. Ca^{2+} -binding loop interactions with Na^+ ion in the m-BthA-I structure [31].

The electron density map for m-BthA-I structure shows a single prominent peak at the center of Ca^{2+} -binding site, which was identified as Na^+ ion rather than Ca^{2+} ion for three main reasons. (i) The protein was crystallized in the presence of sodium acetate. (ii) The B factor of Na^+ is 38.1 \AA^2 , which is reasonably close to the value of the average B factor (23.2 \AA^2). If the position was occupied by Ca^{2+} ion, its B factor would be 60.3 \AA^2 . (iii) All PLA_2S solved to this time with the presence of Ca^{2+} present this ion coordinated by carboxyl group of residues 28, 30, 32, and Asp49 and two (or one) water molecules [36]. However, the Na^+ ion of m-BthA-I just interacts with the Tyr28 carboxyl group (2.47 \AA), Gly32 N (2.88 \AA), and Asp49 O δ 1 and O δ 2 (2.67 and 2.51 \AA , respectively) (Fig. 2). Additionally, the distance between the closest water molecule and the Na^+ ion is about 4 \AA , which makes impossible the essential role of a water molecule presence in the catalytic mechanism [37].

No strong densities were found at the center of Ca^{2+} -binding loops of d-BthA-I monomers. However, water molecules were found in both sites of d-BthA-I in the similar position to the Na^+ ion of m-BthA-I (B factors are 33.9 and 43.5 \AA^2 which are comparable with the average value of 40.9 \AA^2 for water molecules). Despite the lack of Na^+ ion in the d-BthA-I, the conformations of Ca^{2+} -binding loops are similar with m-BthA-I molecule (superposition between the m-BthA-I

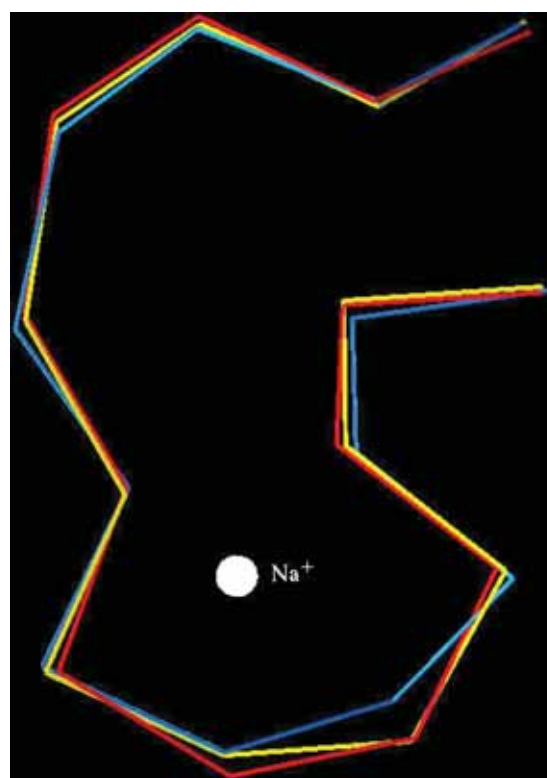


Fig. 3. Superposition of C^α atoms of Ca^{2+} -binding loop of each one monomer of d-BthA-I (red, monomer A; blue, monomer B) and m-BthA-I. Na^+ ion is shown like a white sphere [31]. (For interpretation of the references to color, the reader is referred to the web version of this paper.)

loop and d-BthA-I monomers A and B loops resulted in C^α atom r.m.s. deviation of 0.26 and 0.46 Å, respectively (Fig. 3).

The monomers of d-BthA-I are related by twofold axis perpendicular to h3 α -helix (Fig. 1B). Hydrophobic contacts, one intermolecular hydrogen bond, and one

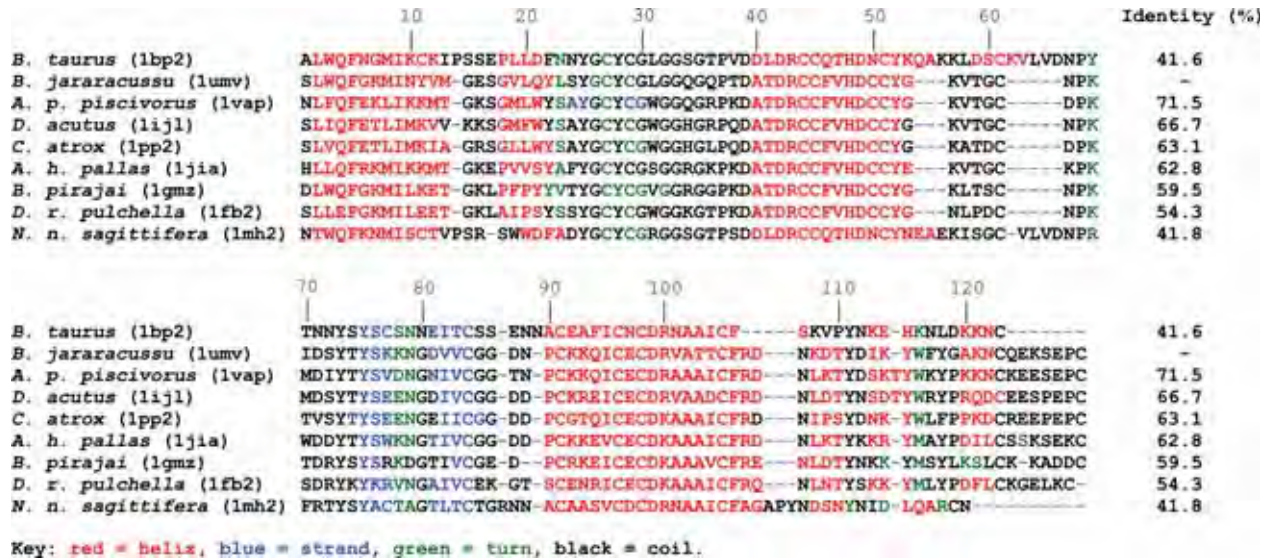


Fig. 4. Amino acid sequence alignments of Asp49-PLA₂s monomers A from *B. jararacussu* (1u73), *A. p. piscivorus* (1vap) [29], *D. acutus* (1ij1) [39], *C. atrox* (1pp2) [40], *A. h. pallas* (1jia) [41], *D. r. pulchella* (1fb2) [42], and *N. n. sagittifera* (1mh2—monomer B) [43]. The sequences have been numbered according to Renetseder et al. [44]. Identity values related to BthA-I are shown at the right column. Produced by the FASTA program [45]. PDB ID codes are shown in parentheses.

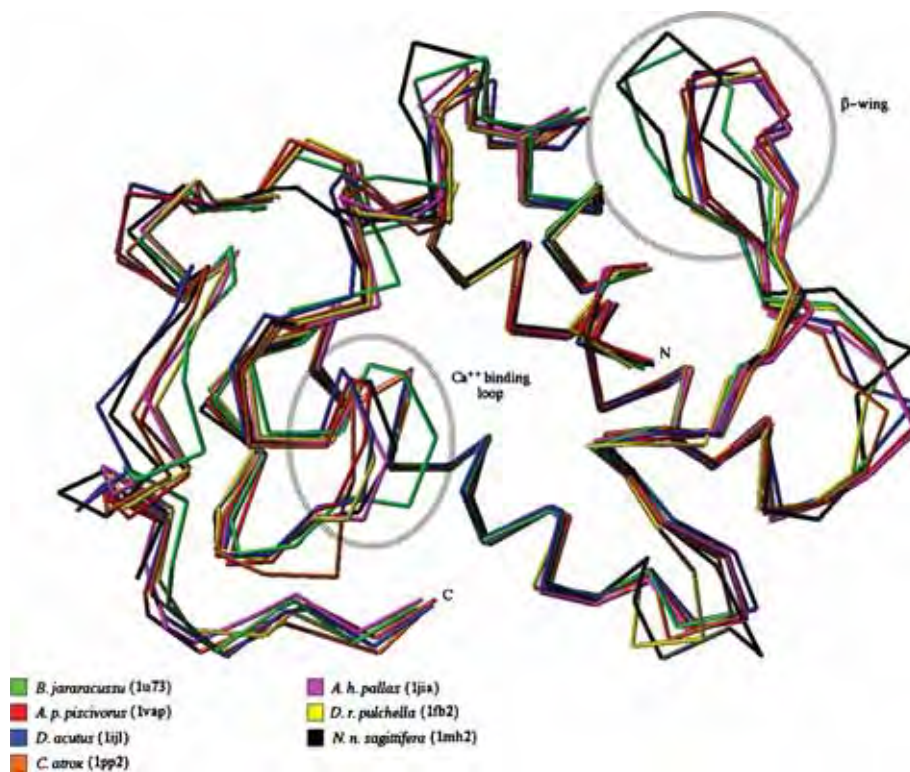


Fig. 5. Superposition of monomers A Asp49-PLA₂s from *B. jararacussu* (1u73), *A. p. piscivorus* (1vap) [29], *D. acutus* (1ij1) [39], *C. atrox* (1pp2) [40], *A. h. pallas* (1jia) [41], *D. r. pulchella* (1fb2) [42], and *N. n. sagittifera* (1mh2—monomer B) [43]—performed using only C^α atoms from h1, h2, and h3 α -helices [31]. Asp49-PLA₂ from the *N. n. sagittifera* venom belongs to group I while the others to the group IIA. Drawn using RIBBONS [35]. PDB ID codes are shown in parentheses.

salt-bridge contribute to the stabilization of the dimer. All contacts involve the residues of h3 α -helix, including the salt bridge between the N ϵ atom of Lys83 (monomer A) and O δ 2 of Glu98 (monomer B) (2.56 Å).

Discussion

It was identified to be a Na⁺ ion rather of a Ca²⁺ ion for m-BthA-I at the center of Ca²⁺-binding site. Similar fact was observed in the acidic PLA₂ structure from

Agkistrodon halys pallas complexed with *p*-bromo-phenacyl (BPB) [38], which was crystallized in the presence of Na⁺ ions. Zhao et al. [38] noted the strong interaction of Na⁺ ion with three carbonyl oxygen atoms of residues Tyr28, Gly 30, and Gly32 while for Asp49 O δ 1 and O δ 2 these interactions are longer than usual. In the case of m-BthA-I, Na⁺ ion interacts with Tyr28 carboxyl, Gly32 N, and Asp49 O δ 1 and O δ 2. These differences are likely to be due to the *p*-bromo-phenacyl group interacting with Gly30 and Asp49 in the PLA₂ structure from *A. h. pallas* complexed with BPB [38].

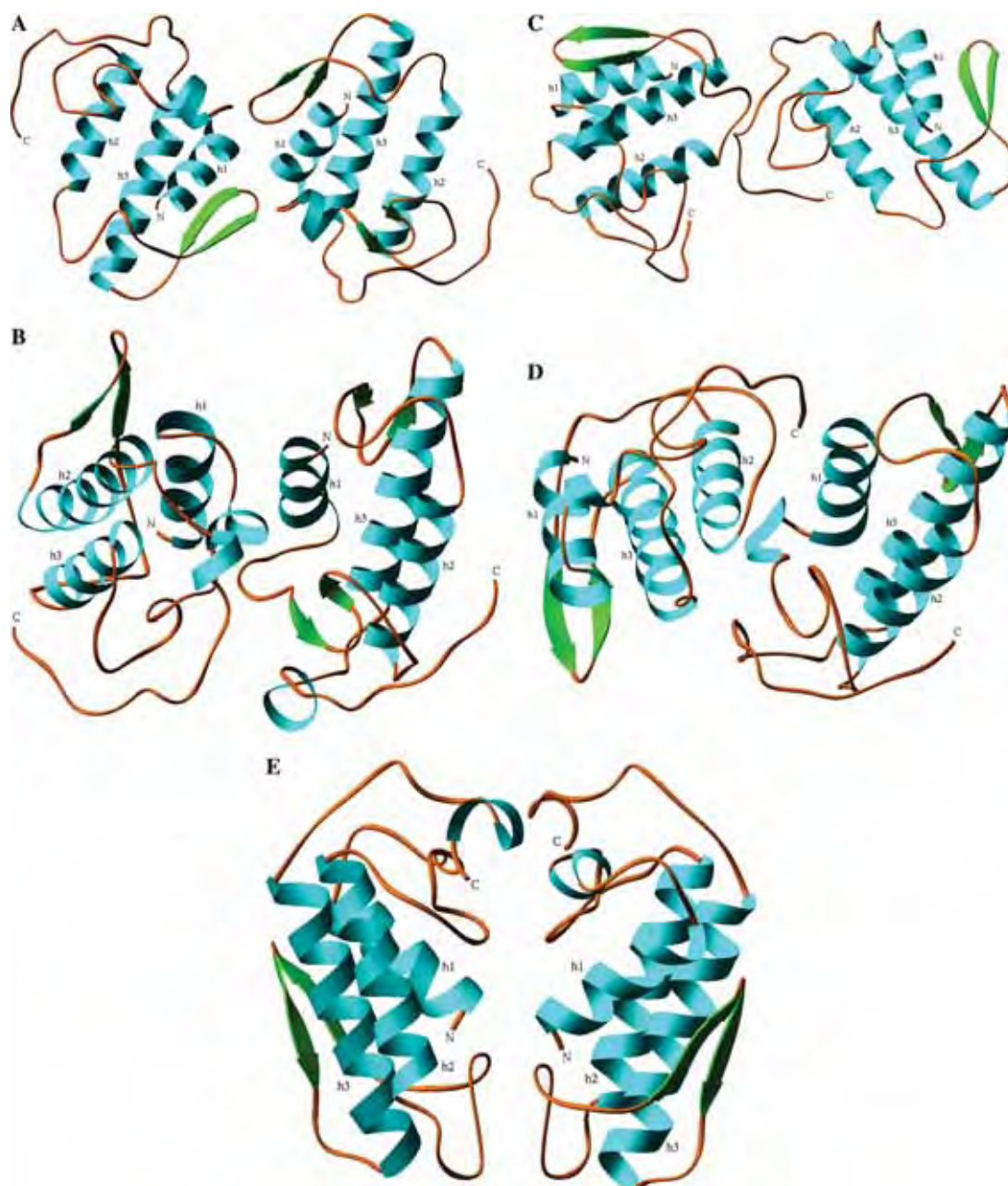


Fig. 6. Structure of dimeric PLA₂s: (A) *Bothrops neuwiedi pauloensis* (1pa0) [12]; (B) *Deinagkistrodon acutus* (1ijl) [39]; (C) *Agkistrodon halys pallas* (1jia) [41]; (D) *Daboia russeli pulchella* (1fb2) [42]; and (E) *Naja naja sagittifera* (1mh2) [43]. Drawn using RIBBONS [35]. PDB ID codes are shown in parentheses.

The d-BthA-I structure shows the lack of Ca^{2+} or Na^+ ions at the Ca^{2+} -binding loops, however, a water molecule was found in similar position for both monomers. The Ca^{2+} -binding loops do not show important structural differences by occupation of this site by water or Na^+ ion (Fig. 3).

Fig. 4 shows the alignment of the class I or IIA Asp49-PLA₂s from different species (*B. jararacussu*, *A. p. piscivorus* [29], *Deinagkistrodon acutus* [39], *Crotalus atrox* [40], *A. h. pallas* [41], *Daboia russeli pulchella* [42], and *Naja naja sagittifera* [43]) produced using only the secondary structure residues. The sequence identity related to BthA-I varies from 71.5% (*A. p. piscivorus*) to 41.8% (*N. n. sagittifera*). In contrast, the C $^{\alpha}$ atom's superposition of secondary structure elements between monomers (Fig. 5) shows conformations to be very similar. As seen in Fig. 5, the main structural differences are in the Ca^{2+} -binding loop and β -wing regions. BthA-I presents these regions as slightly altered compared to other class IIA PLA₂ (all structures of Fig. 5, except the class I Asp49-PLA₂ from the *N. n. sagittifera*). In contrast, in the Asp49-PLA₂ piratoxin III structure [18], Ca^{2+} -binding loop presents high structural distortion when compared with other PLA₂s due to an extreme diversion taken by the main chain of residues 30–31 associated with a change in the backbone dihedral angles of Cys29. The authors support this distortion may be due to an alternative conformation of enzyme (T-state). In that case, the structures of BthA-I and other PLA₂s presented here should be in the R-state conformation.

The oligomeric state is an important issue for many of phospholipase A₂ structures solved [12,37,46–49]. A comparison of d-BthA-I with all class IIA PLA₂ structures available at the RCSB Protein Data Bank reveals this structure adopts a novel oligomeric conformation whereas the active site of both monomers can be reached by a hydrophobic channel exposed to the solvent. Fig. 6 shows some examples of oligomeric conformations of PLA₂s.

BthA-I was crystallized in two conformational states: monomeric and dimeric. This is likely to be due to the physicochemical conditions used in the crystallization experiments. The crystals of m-BthA-I were grown at pH 4.6 and those of d-BthA-I were grown at pH 3.5. Then, the m-BthA-I molecules are in the condition very close to their $pI \sim 5.0$ [24], whereas the molecules are in charge equilibrium leading to their dissociation. Consequently, we suggest dimeric state of BthA-I could be that found predominately in vivo.

It has been shown dimeric is the most favorable or active state for Lys49-PLA₂ [12,46] and for outer membrane phospholipases (OMPLA) [47,48]. However, *C. atrox* PLA₂ is dimeric in the absence of lipids and monomeric when interacting with lipids [49]. Then, clearly, deep structural studies must be done to better understanding of oligomeric mechanism Asp49-PLA₂s.

Acknowledgments

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

References

- [1] D.A. Six, E.A. Dennis, The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization, *Biochim. Biophys. Acta* 1488 (2000) 1–19.
- [2] P. Rosenberg, in: W. Shier, D. Mebs (Eds.), *Handbook of Toxicology*, Marcel Dekker, New York, 1990, pp. 67–277.
- [3] J.M. Gutiérrez, B. Lomonte, Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms, in: R.M. Kini (Ed.), *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism*, Wiley, Chichester, 1997, pp. 321–352.
- [4] C.L. Ownby, Structure, function and biophysical aspects of the myotoxins from snake venoms, *J. Toxicol. Toxin Rev.* 17 (1998) 1003–1009.
- [5] E. Valentin, G. Lambeau, What can venom phospholipase A₂ tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipase A₂, *Biochimie* 82 (2000) 815–831.
- [6] R.M. Kini, H.J. Evans, A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂, *Toxicon* 27 (1989) 613–635.
- [7] A.M. Soares, J.R. Giglio, Chemical modifications on phospholipases A₂ from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. Review, *Toxicon* 42 (2004) 855–868.
- [8] P. Needleman, J. Turk, B.A. Jakschik, A.R. Morrison, J.B. Lefkowitz, Arachidonic acid metabolism, *Annu. Rev. Biochem.* 55 (1986) 69–102.
- [9] B. Francis, J.M. Gutierrez, B. Lomonte, I.I. Kaiser, Myotoxin II from *Bothrops asper* (terciopelo) venom in a lysine-49 phospholipase A₂, *Arch. Biochem. Biophys.* 284 (1991) 352–359.
- [10] C.L. Ownby, H.S. Selistre de Araújo, S.P. White, J.E. Fletcher, Lysine 49 phospholipases A₂ proteins. Review, *Toxicon* 37 (1999) 411–445.
- [11] D.L. Scott, A. Achari, J.C. Vidal, P.B. Sigler, Crystallographic and biochemical studies of the (inactive) Lys49 phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 22645–22657.
- [12] A.J. Magro, A.M. Soares, J.R. Giglio, M.R.M. Fontes, Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A₂: quaternary structure and inhibition mechanism insights, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311 (2003) 713–720.
- [13] A.M. Soares, M.R. Fontes, J.R. Giglio, Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms: structure–function relationship, *Curr. Org. Chem.* 8 (2004) in press.
- [14] W.F. de Azevedo Jr., R.J. Ward, F.R. Lombardi, J.R. Giglio, A.M. Soares, M.R.M. Fontes, R.K. Arni, Crystal structure of myotoxin-II: a myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Bothrops moojeni* venom, *Protein Pept. Lett.* 4 (1997) 329–334.
- [15] M.T. da Silva-Giotto, R.C. Garrat, G. Oliva, Y.P. Mascarenhas, J.R. Giglio, A.C.O. Cintra, W.F. de Azevedo Jr., R.K. Arni, R.J. Ward, Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: conformational changes in bothropstoxin I, a

- dimeric Lys49-phospholipase A₂ homologue, *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 30 (1998) 442–454.
- [16] W.H. Lee, M.T. da Silva-Giotta, S. Marangoni, M.H. Toyama, I. Polikarpov, R.C. Garratt, Structural basis for low catalytic activity in Lys49-phospholipase A₂—a hypothesis: the crystal structure of piratoxin II complexed to fatty acid, *Biochemistry* 40 (2001) 28–36.
- [17] R.K. Arni, M.R.M. Fontes, C. Barberato, J.M. Gutiérrez, C. Diaz-Oreiro, R.J. Ward, Crystal structure of myotoxin II, a monomeric Lys49-phospholipase homologue isolated from the venom of *Cerrophidion (Bothrops) godmani*, *Arch. Biochem. Biophys.* 366 (1999) 177–182.
- [18] 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.
- [19] D.J. Rigden, L.W. Hwa, S. Marangoni, M.H. Toyama, I. Polikarpov, The structure of the D49 phospholipase A₂ piratoxin III from *Bothrops pirajai* reveals unprecedented structural displacement of the calcium-binding loop: possible relationship to cooperative substrate binding, *Acta Crystallogr. D* 59 (2003) 255–262.
- [20] J.J. Daniele, I.D. Bianco, G.D. Fidelio, Kinetic and pharmacological characterization of phospholipases A₂ from *Bothrops neuwiedii* venom, *Arch. Biochem. Biophys.* 318 (1995) 65–70.
- [21] S.M.T. Serrano, A.P. Reichl, R. Mentele, E.A. Auerswald, M.L. Santoro, C.A.M. Sampaio, A.C.M. Camargo, M.T. Assakura, A novel phospholipase A₂, BJ-PLA₂, from the venom of the snake *Bothrops jararaca*: purification, primary structure analysis, and its characterization as a platelet-aggregation-inhibiting factor, *Arch. Biochem. Biophys.* 367 (1999) 26–32.
- [22] M.I. Homs-Brandeburgo, L.S. Queiroz, H. Santo-Neto, L. Rodrigues-Simioni, J.R. Giglio, Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin, *Toxicon* 26 (1988) 615–627.
- [23] M.F. Pereira, J.C. Novello, A.C.O. Cintra, J.R. Giglio, E.C.T. Landucci, B. Oliveira, S. Marangoni, The amino acid sequence of bothropstoxin-II, an Asp-49 myotoxin from *Bothrops jararacussu* (jararacucu) venom with low phospholipase A₂ activity, *J. Protein Chem.* 17 (1998) 381–386.
- [24] S.H. Andrião-Escarso, A.M. Soares, M.R.M. Fontes, A.L. Fuly, F.M.A. Corrêa, J.C. Rosa, L.J. Greene, J.R. Giglio, Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* snake venom, *Biochem. Pharmacol.* 64 (2002) 723–732.
- [25] P.G. Roberto, S. Kashima, S. Marcussi, J.O. Pereira, S. Astolfi-Filho, A. Nomizo, J.R. Giglio, M.R.M. Fontes, A.M. Soares, S.C. França, Cloning and identification of a complete cDNA coding for a bactericidal and antitumoral acidic phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* venom, *Protein J.* 23 (2004) 273–285.
- [26] P.G. Roberto, S. Kashima, A.M. Soares, L. Chioato, V.M. Faça, A.L. Fuly, S. Astolfi-Filho, J.O. Pereira, S.C. França, Cloning and expression of an acidic platelet aggregation inhibitor phospholipase A₂ cDNA from *Bothrops jararacussu* venom gland, *Protein Expr. Purif.* 37 (2004) 102–108.
- [27] Z. Otwinowski, W. Minor, Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode, *Methods Enzymol.* 276 (1997) 307–326.
- [28] J. Navaza, AMoRe: an automated package for molecular replacement, *Acta Crystallogr. A* 50 (1994) 157–163.
- [29] S.K. Han, E.T. Yoon, D.L. Scott, P.B. Sigler, W. Cho, Structural aspects of interfacial adsorption. A crystallographic and site-directed mutagenesis study of the phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 3573–3582.
- [30] A.T. Brünger, P.D. Adams, G.M. Clore, W.L. DeLano, P. Gros, R.W. Grosse-Kunstleve, J.S. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N.S. Pannu, R.J. Read, L.M. Rice, T. Simonson, G.L. Warren, Crystallography and NMR system (CNS): a new software system for macromolecular structure determination, *Acta Crystallogr. D* 54 (1998) 905–921.
- [31] 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.
- [32] A.T. Brünger, X-PLOR Version 3.1: A System for Crystallography and NMR, Yale University Press, New Haven, 1992.
- [33] Collaborative Computing Project No. 4 (CCP4), The CCP4 suite: programs for protein crystallography, *Acta Crystallogr. D* 50 (1994) 760–763.
- [34] R.A. Laskowski, M.W. MacArthur, D.S. Moss, J.M. Thornton, Procheck: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Crystallogr.* 26 (1993) 283–291.
- [35] M. Carson, Ribbons, *Methods Enzymol.* 277 (1997) 493–505.
- [36] S. Xu, L. Gu, T. Jiang, Y. Zhou, Z. Lin, Structures of cadmium-binding acidic phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon halys* Pallas at 1.9 Å resolution, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300 (2003) 271–277.
- [37] Y.H. Pan, T.M. Epstein, M.K. Jain, B.J. Bahnsen, Five coplanar anion binding sites on one face of phospholipase A₂: relationship to interface binding, *Biochemistry* 40 (2001) 609–617.
- [38] H. Zhao, T. Liang, W. Xiaoqiang, Z. Yuancong, L. Zhengjiong, Structure of a snake venom phospholipase A₂ modified by *p*-bromo-phenacyl-bromide, *Toxicon* 36 (1998) 875–886.
- [39] L. Gu, H. Zhang, S. Song, Y. Zhou, Z. Lin, Structure of an acidic phospholipase A₂ from the venom of *Deinagkistrodon acutus*, *Acta Crystallogr. D* 58 (2002) 104–110.
- [40] S. Brunie, J. Bolin, D. Gewirth, P.B. Sigler, The refined crystal structure of dimeric phospholipase A₂ at 2.5 Å. Access to a shielded catalytic center, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 9742–9749.
- [41] V. Chandra, P. Kaur, J. Jasti, C. Betzel, T.P. Singh, Regulation of catalytic function by molecular association: structure of phospholipase A₂ from *Daboia russelli pulchella* (DPLA₂) at 1.9 Å resolution, *Acta Crystallogr. D* 57 (2001) 1793–1798.
- [42] K. Zhao, S. Song, Z. Lin, Y. Zhou, Structure of a basic phospholipase A₂ from *Agkistrodon halys* Pallas at 2.13 Å resolution, *Acta Crystallogr. D* 510 (1998) 510–521.
- [43] T. Jabeen, A.K. Varma, M. Paramasivam, N. Singh, R.K. Singh, S. Sharma, A. Srinivasan, T.P. Singh, Crystal structure of a zinc containing dimer of phospholipase A₂ from the venom of Indian cobra (*Naja naja saggittifera*), to be published.
- [44] R. Renetseder, S. Brunie, B.W. Dijkstra, J. Drenth, P.B. Sigler, A comparison of the crystal structures of phospholipases A₂ from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 11627–11636.
- [45] W.R. Pearson, Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA, *Methods Enzymol.* 183 (1990) 63–98.
- [46] A.H. de Oliveira, J.R. Giglio, S.H. Andrião-Escarso, A.S. Ito, R.J. Ward, A pH-induced dissociation of the dimeric form of a lysine 49-phospholipase A₂ abolishes Ca²⁺-independent membrane damaging activity, *Biochemistry* 40 (2001) 6912–6920.
- [47] N. Dekker, Outer-membrane phospholipase A: known structure, unknown biological function, *Mol. Microbiol.* 35 (2000) 711–717.
- [48] H.J. Snijder, I. Ubarretxena-Belandia, M. Blaauw, K.H. Kalk, H.M. Verheij, M.R. Egmond, N. Dekker, B.W. Dijkstra, Structural evidence for dimerization-regulated activation of an integral membrane phospholipase, *Nature* 401 (1999) 717–721.
- [49] S.A. Sanchez, Y. Chen, J.D. Muller, E. Gratton, T.L. Hazlett, Solution and interface aggregation states of *Crotalus atrox* venom phospholipase A₂ by two-photon excitation fluorescence correlation spectroscopy, *Biochemistry* 40 (2001) 6903–6911.

Angelo J. Magro,^a Agnes A. S. Takeda,^a Andreimar M. Soares^b and Marcos R. M. Fontes^{a*}

^aDepartamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, UNESP, Distrito de Rubião Jr s/n, Caixa Postal 510, 18618-000 Botucatu-SP, Brazil, and ^bDepartamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, FCFRP, USP, Av. do Café s/n, 14040-903 Ribeirão Preto-SP, Brazil

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

Structure of BthA-I complexed with *p*-bromophenacyl bromide: possible correlations with lack of pharmacological activity

The crystal structure of an acidic phospholipase A₂ isolated from *Bothrops jararacussu* venom (BthA-I) chemically modified with *p*-bromophenacyl bromide (BPB) has been determined at 1.85 Å resolution. The catalytic, platelet-aggregation inhibition, anticoagulant and hypotensive activities of BthA-I are abolished by ligand binding. Electron-density maps permitted unambiguous identification of inhibitor covalently bound to His48 in the substrate-binding cleft. The BthA-I–BPB complex contains three structural regions that are modified after inhibitor binding: the Ca²⁺-binding loop, β-wing and C-terminal regions. Comparison of BthA-I–BPB with two other BPB-inhibited PLA₂ structures suggests that in the absence of Na⁺ ions at the Ca²⁺-binding loop, this loop and other regions of the PLA₂s undergo structural changes. The BthA-I–BPB structure reveals a novel oligomeric conformation. This conformation is more energetically and conformationally stable than the native structure and the abolition of pharmacological activities by the ligand may be related to the oligomeric structural changes. A residue of the ‘pancreatic’ loop (Lys69), which is usually attributed as providing the anticoagulant effect, is in the dimeric interface of BthA-I–BPB, leading to a new hypothesis regarding the abolition of this activity by BPB.

Received 14 June 2005
Accepted 16 September 2005

PDB Reference: BthA-I–BPB complex, 1z76, r1z76sf.

1. Introduction

Phospholipases A₂ (PLA₂s; EC 3.1.1.4) are small (~14 kDa), stable and ubiquitous enzymes. These molecules, which are present in biological fluids and cells, hydrolyze the *sn*-2 acyl groups of membrane phospholipids (*sn*-3 glycerophospholipids) to release fatty acids and lysophospholipids (van Deenen & de Haas, 1963). PLA₂s belong to a superfamily divided into 11 classes (Six & Dennis, 2000), five of which (I, II, III, V and X) are abundant in pancreatic secretions, inflammatory exudates and reptile and arthropod venoms (Rosenberg, 1990). In the genus *Bothrops*, PLA₂s from group IIB are the main components of the venoms produced by species classified into this animal group. In addition to their primary catalytic role, snake-venom PLA₂s show other important toxic/pharmacological effects including myonecrosis, neurotoxicity, cardiotoxicity and haemolytic, haemorrhagic, hypotensive, anticoagulant, platelet-aggregation inhibition and oedema-inducing activities (Gutiérrez & Lomonte, 1997; Ownby, 1998; Valentin & Lambeau, 2000). Some of these activities are correlated with the enzymatic activity, but others are completely independent (Kini & Evans, 1989; Soares & Giglio, 2003). It has been suggested that some specific sites in these molecules have biochemical properties that are responsible for the pharmacological and toxic actions, which

include anticoagulant and platelet-inhibition activities (Kini & Evans, 1989).

Several structural studies of PLA₂s complexed with inhibitors have recently been performed and have revealed correlations between their tertiary and quaternary structures and their biological effects (Watanabe *et al.*, 2005; Georgieva *et al.*, 2004; Chandra *et al.*, 2001). The crystal structure of bovine PLA₂ complexed with BPB (*p*-bromophenacyl bromide), a known inhibitor of the catalytic activity of PLA₂s, demonstrated that this enzyme was structurally modified by the ligand (Renetseder *et al.*, 1988). In contrast, Zhao *et al.* (1998) noted that the structure of an acidic PLA₂ from *Agkistrodon halys* Pallas (currently known as *Gloydius halys*) venom remained remarkably similar to the native structure after chemical modification by BPB.

Many non-catalytic (or with very low catalytic activity) homologous PLA₂s (Lys49-PLA₂s) have been purified from *Bothrops* snake venoms and have been structurally and functionally characterized (Watanabe *et al.*, 2005; Soares *et al.*, 2004; Magro *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2001; Arni *et al.*, 1999; da Silva-Giotto *et al.*, 1998; de Azevedo *et al.*, 1997). However, little is known about the bothropic catalytic PLA₂s (Asp49-PLA₂s) (Rigden *et al.*, 2003; Serrano *et al.*, 1999; Pereira *et al.*, 1998; Daniele *et al.*, 1995; Homsí-Brandeburgo *et al.*, 1988). BthA-I (an acidic PLA₂ isolated from *B. jararacussu* venom) is three to four times more active catalytically than BthTX-II (bothropstoxin-II from *B. jararacussu*) and other basic Asp49-PLA₂s from *Bothrops* venoms, but it is not myotoxic, cytotoxic or lethal (Andrião-Escarso *et al.*, 2002). Other activities demonstrated by this enzyme are time-independent oedema induction, hypotensive response in rats and platelet-aggregation inhibition (Andrião-Escarso *et al.*, 2002). These pharmacological effects as well as the catalytic and disintegrin activities were abolished by BPB, which covalently binds to residue His48 in the catalytic site (Andrião-Escarso *et al.*, 2002). Recently, we observed that BthA-I demonstrates anticoagulant activity, which is also abolished by BPB (data not shown). cDNA sequence cloning, functional expression, crystallization and X-ray diffraction data of BthA-I have also been described (Roberto, Kashima, Marcussi *et al.*, 2004; Roberto, Kashima, Soares *et al.*, 2004; Andrião-Escarso *et al.*, 2002). The crystal structure of native BthA-I has been recently described in two conformational states: monomeric (m-BthA-I) and dimeric (d-BthA-I) (Magro *et al.*, 2004).

In order to unambiguously define the structural basis of the BPB–Asp49-PLA₂ interaction, we present here the high-resolution structure of BthA-I chemically modified by BPB.

2. Material and methods

2.1. Isolation, cDNA cloning, sequencing and chemical modification

BthA-I was isolated from *B. jararacussu* snake venom by ion-exchange chromatography on CM-Sepharose followed by reverse-phase chromatography on an RP-HPLC C-18 column (Andrião-Escarso *et al.*, 2002). The amino-acid sequence of

Table 1

X-ray data-collection and refinement statistics.

Values in parentheses are for the highest resolution shell.

Unit-cell parameters (Å, °)	$a = 41.0, b = 83.2,$ $c = 45.6, \beta = 112.7$
Space group	$P2_1$
Resolution (Å)	40.0–1.85 (1.95–1.85)
Unique reflections	22730 (3390)
Completeness (%)	94.4 (91.2)
$R_{\text{merge}}^{\dagger}$ (%)	6.0 (37.1)
$I/\sigma(I)$	25.8 (3.5)
Redundancy	11.3 (5.6)
$R_{\text{cryst}}^{\ddagger}$ (%)	20.2 (28.9)
R_{free}^{\S} (%)	25.1 (30.6)
No. of non-H atoms	
Protein	1900
Water	290
Mean B factor $^{\parallel}$ (Å ²)	25.6
R.m.s. deviations from ideal values	
Bond lengths (Å)	0.034
Bond angles (°)	2.1
Ramachandran plot †† (%)	
Residues in most favoured region (%)	93.5
Residues in additional allowed region (%)	6.5
Residues in generously/disallowed regions (%)	0.0
Coordinate error $^{\parallel}$ (Å)	
Luzzati plot [cross-validated Luzzati plot]	0.22 [0.28]
σ_A [cross-validated σ_A]	0.12 [0.15]

$^{\dagger} R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} [(\sum_i (I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle)) / \sum_{hkl,i} I_{hkl,i}]$, where $I_{hkl,i}$ is the intensity of an individual measurement of the reflection with Miller indices h, k and l and $\langle I_{hkl} \rangle$ is the mean intensity of that reflection. Calculated for $I > -3\sigma(I)$. $^{\ddagger} R_{\text{cryst}} = \sum_{hkl} ||F_{hkl}^{\text{obs}}| - |F_{hkl}^{\text{calc}}|| / |F_{hkl}^{\text{obs}}|$, where $|F_{hkl}^{\text{obs}}|$ and $|F_{hkl}^{\text{calc}}|$ are the observed and calculated structure-factor amplitudes. $^{\S} R_{\text{free}}$ is equivalent to R_{cryst} but calculated with reflections (5%) omitted from the refinement process. $^{\parallel}$ Calculated with the program *CNS* (Brünger *et al.*, 1998). †† Calculated with the program *PROCHECK* (Laskowski *et al.*, 1993).

BthA-I was deduced from the cDNA sequence and deposited in GenBank (AY145836) (Roberto, Kashima, Marcussi *et al.*, 2004; Roberto, Kashima, Soares *et al.*, 2004). Modification of His48 with *p*-bromophenacyl bromide (BPB) was carried out as described previously (Andrião-Escarso *et al.*, 2002). *p*-Bromophenacyl bromide was purchased from Sigma Chemical Co.

2.2. Crystallization and X-ray data collection

Lyophilized samples of BthA-I–BPB were dissolved in ultrapure water at a concentration of 10 mg ml^{−1}. A sparse-matrix method (Jancarik & Kim, 1991) was utilized to perform initial screening of the crystallization conditions because crystallization experiments using the original conditions for native BthA-I were unsuccessful. Crystals of BthA-I–BPB were obtained by the conventional hanging-drop vapour-diffusion method (MacPherson, 1982) in which the protein solution was equilibrated against a reservoir solution containing 0.2 *M* magnesium chloride, 32% (w/v) polyethylene glycol 4000 and 0.1 *M* Tris–HCl pH 8.5 as described previously (Takeda *et al.*, 2004). The best crystals measured approximately 0.4 × 0.3 × 0.2 mm after 10–14 d at 291 K. After mounting the crystal in a nylon loop and flash-freezing it in a nitrogen stream at 100 K with no cryoprotectant, X-ray diffraction data were collected at a wavelength of 1.38 Å using a synchrotron-radiation source (LNLS, Campinas, Brazil) and a MAR CCD imaging-plate detector (MAR Research). Data

were processed to 1.85 Å resolution using *DENZO* and *SCALEPACK* (Otwinowski & Minor, 1997). The data set was 94.4% complete at the highest resolution with $R_{\text{merge}} = 6.0\%$. The space group was $P2_1$. Data-processing statistics are presented in Table 1.

2.3. Structure determination and refinement

The BthA-I-BPB crystal structure was solved by molecular replacement using *AMoRe* (Navaza, 1994) with the coordinates of native monomeric BthA-I (PDB code 1umv) as the search model (Magro *et al.*, 2004). After a cycle of simulated-annealing refinement using *CNS* (Brünger *et al.*, 1998), the electron-density maps were inspected using *O* (Jones *et al.*, 1990) and the chemically modified residue His48/BPB of the acidic PLA₂ from *A. halys* Pallas venom (PDB code 1bk9) (Zhao *et al.*, 1998) was inserted in the structure to substitute the original His48 from native BthA-I. Electron-density maps calculated with $3|F_{\text{obs}}| - 2|F_{\text{calc}}|$ coefficients and simulated-annealing omit maps calculated with analogous coefficients were generally used. The model was improved, as judged by analysis of the free *R* factor (Brünger *et al.*, 1998), through rounds of crystallographic refinement (positional and restrained isotropic individual *B*-factor refinement, with an overall anisotropic temperature factor and bulk-solvent correction) and manual rebuilding. Three mutations were made because of the lack of electron density in some regions of the protein (Glu16→Gly in monomer *A*; Glu16→Gly, Lys78→Gly and Lys123→Gly in monomer *B*). The dictionaries of residue His48/BPB used by *CNS* (Brünger *et al.*, 1998) and *O* (Jones *et al.*, 1990) were generated using the programs *XPLO2D* and *MOLEMAN2* (Kleywegt & Jones, 1997). Solvent molecules were added and refined using *CNS* (Brünger *et al.*, 1998).

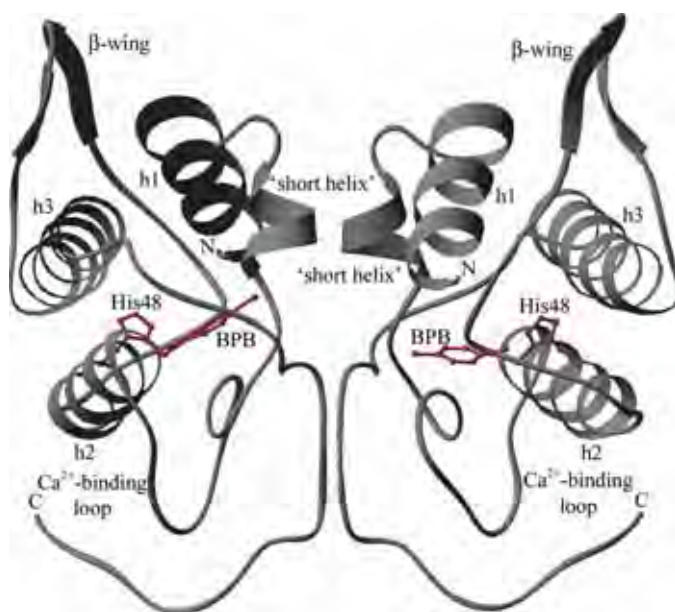


Figure 1
The structure of BthA-I complexed with BPB is shown as a ribbon diagram (Carson, 1997).

The refinement converged to *R* and R_{free} factors of 20.2 and 25.1%, respectively (see Table 1 for definition of *R* factors), and the final model comprises 1900 non-H protein atoms and 290 water molecules (Table 1). *O* (Jones *et al.*, 1990) was used for molecular superposition of the PLA₂ structures using only the C^α coordinates. The stereochemistry of the final structure was evaluated using *PROCHECK* (Laskowski *et al.*, 1993).

3. Results

3.1. Overall structure of the BthA-I-BPB complex

The crystals of the BthA-I-BPB complex diffract to 1.85 Å and are monoclinic, belonging to space group $P2_1$ with unit-cell parameters $a = 41.0$, $b = 45.6$, $c = 83.2$ Å, $\beta = 112.7^\circ$. The refinement converged to a crystallographic residual of 20.2% ($R_{\text{free}} = 25.1\%$) for all data between 27.15 and 1.85 Å (Table 1). The structure shows excellent overall stereochemistry, with no residues found in the disallowed or generously allowed regions of the Ramachandran plot. The overall *PROCHECK* *G* factor is -0.1 (Laskowski *et al.*, 1993).

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

The monomers of BthA-I-BPB are related by an approximate twofold axis parallel to the 'short' helix (Fig. 1). Hydrophobic contacts and three intermolecular hydrogen bonds contribute to the stabilization of the dimer. The contacts involve residues of both N-termini (Leu2, Trp3 and Lys7), both C-termini (Trp118, Phe119), the 'short' helices (Leu20, Gln21) and the 'pancreatic' loops located between α -helix 2 and the β -wing (Lys69) (Fig. 2). Furthermore, the Br atom of the BPB group from monomer *A* interacts with the Phe119 (C-terminal region) of monomer *B*.

A BPB molecule is covalently bound to the N^{δ1} atom of His48 of both monomers as illustrated in Fig. 3. The catalytic water hydrogen bonded to His48 N^{δ1} present in the native BthA-I structure is not present in the current structure and in both monomers the His48 imidazole ring is in the same position (Fig. 4) as observed in the native structure. The conformations of all residues involved in the catalytic network (Scott *et al.*, 1990) are structurally conserved in the native and inhibited structures, with the exception of Gly30 in monomer *A* (Fig. 4a).

The phenacyl group of BPB molecule extends along the hydrophobic substrate-binding channel of the protein, making several hydrophobic interactions (Fig. 5). The inhibitors in both monomers interact with Cys45 and Gly30. Additionally, the BPB molecules make other specific contacts: in monomer *A* with Phe119 (from monomer *B*) and two water molecules and in monomer *B* with Phe5 and Tyr22.

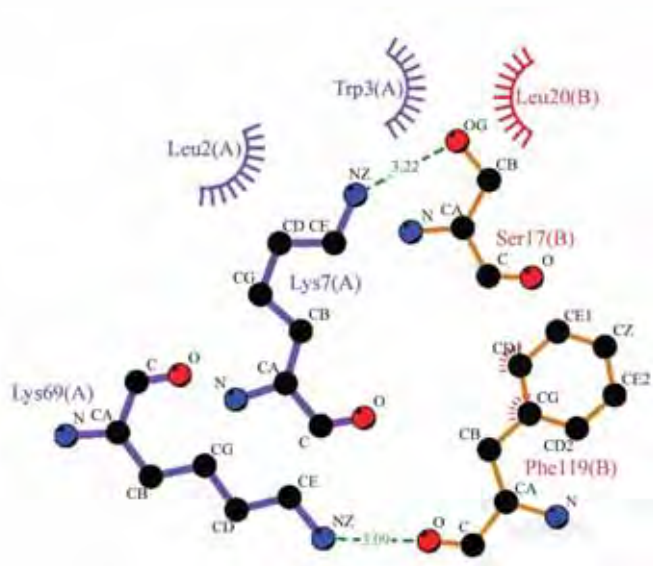
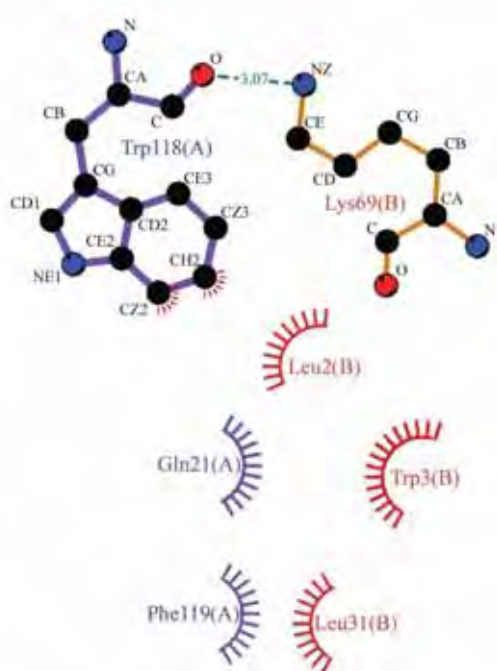


Figure 2

Schematic diagram of the dimer–interface interactions. Polar contacts are shown with dashed lines and hydrophobic contacts are indicated by arcs with radiating spokes. Monomer *A* residues are shown with purple bonds and are labelled in blue and monomer *B* residues are shown with gold bonds and are labelled in red. C, N and O atoms are shown in black, blue and red, respectively. This figure was prepared using the program DIMPLOT (Wallace *et al.*, 1995).

3.2. Comparison of native BthA-I and BthA-I–BPB complex

Table 2 catalogues the r.m.s. deviations after superposition of five BthA-I monomers (m-BthA-I and both monomers of d-BthA-I and BthA-I–BPB). This comparison shows the effect of the BPB molecule on the tertiary structure of BthA-I. The m-BthA-I and d-BthA-I monomers are more similar, with an r.m.s. deviation of about 0.5 Å between C $^{\alpha}$ atoms. In contrast, comparison of structures with and without BPB gives r.m.s. deviations of approximately 1.2 Å.

Fig. 6 shows the superposition of the three main helices (h1, h2 and h3) of m-BthA-I and monomer *A* of BthA-I–BPB and d-BthA-I. This comparison indicates that there are two main regions with significant structural differences: the Ca $^{2+}$ -binding loop and the β -wing. Additionally, there are also structural changes in the C-terminal region.

Superposition of the BthA-I–BPB monomers resulted in an r.m.s. deviation between C $^{\alpha}$ atoms of 0.72 Å, while the same superposition between native d-BthA-I monomers resulted in a value of 0.54 Å. These results are similar to those obtained for other dimeric PLA $_2$ s (Magro *et al.*, 2003).

In order to understand the quaternary structure changes between BPB-inhibited and native d-BthA-I, monomer *A* from both structures were superposed (C $^{\alpha}$ atoms of α -helices h1, h2 and h3 were used in the superposition) to determine the relative disposition of monomers *B* (Fig. 7). In the BPB-inhibited structure a completely new dimer interface is observed.

4. Discussion

4.1. Structural comparison of native and inhibited BthA-I

Comparison of the monomers of BPB-inhibited and native d-BthA-I and m-BthA-I results in the observation of three

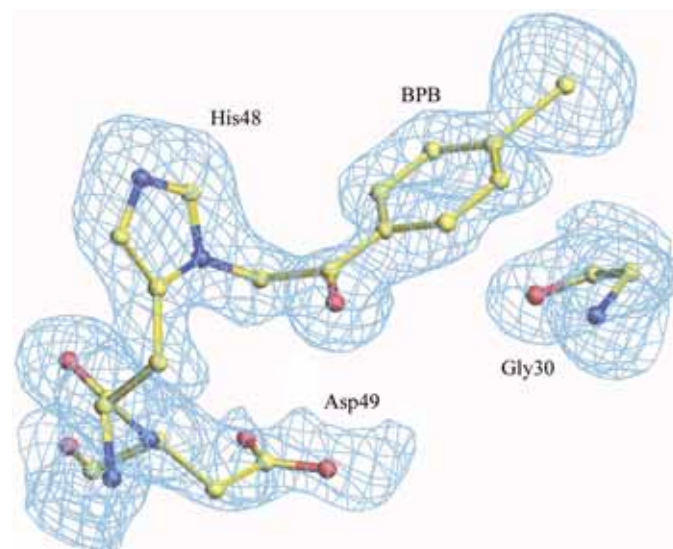


Figure 3

$3|F_{\text{obs}}| - 2|F_{\text{calc}}|$ electron-density omit map in the catalytic site region of monomer *A* of the BthA-I–BPB complex showing the His48 residue covalently bound with BPB contoured at 1.5 standard deviations. This figure was generated using *O* (Jones *et al.*, 1990).

Table 2
Superposition between BthA-I monomers (r.m.s. deviation of C $^{\alpha}$ atoms in Å).

	BthA-I-BPB		d-BthA-I		m-BthA-I
	Monomer A	Monomer B	Monomer A	Monomer B	
BthA-I-BPB (monomer A)	—	0.72	1.23	1.21	1.26
BthA-I-BPB (monomer B)	0.72	—	1.21	1.23	1.17
d-BthA-I (monomer A)	1.23	1.21	—	0.54	0.49
d-BthA-I (monomer B)	1.21	1.23	0.54	—	0.49
m-BthA-I	1.26	1.17	0.49	0.49	—

main regions with significant structural differences: the Ca²⁺-binding loop (residues 27–37), the β -wing (residues 75–84) and the C-terminal region (residues 119–133) (Fig. 6). It has been shown these regions are the most variable between the class I and II PLA₂s (Magro *et al.*, 2004).

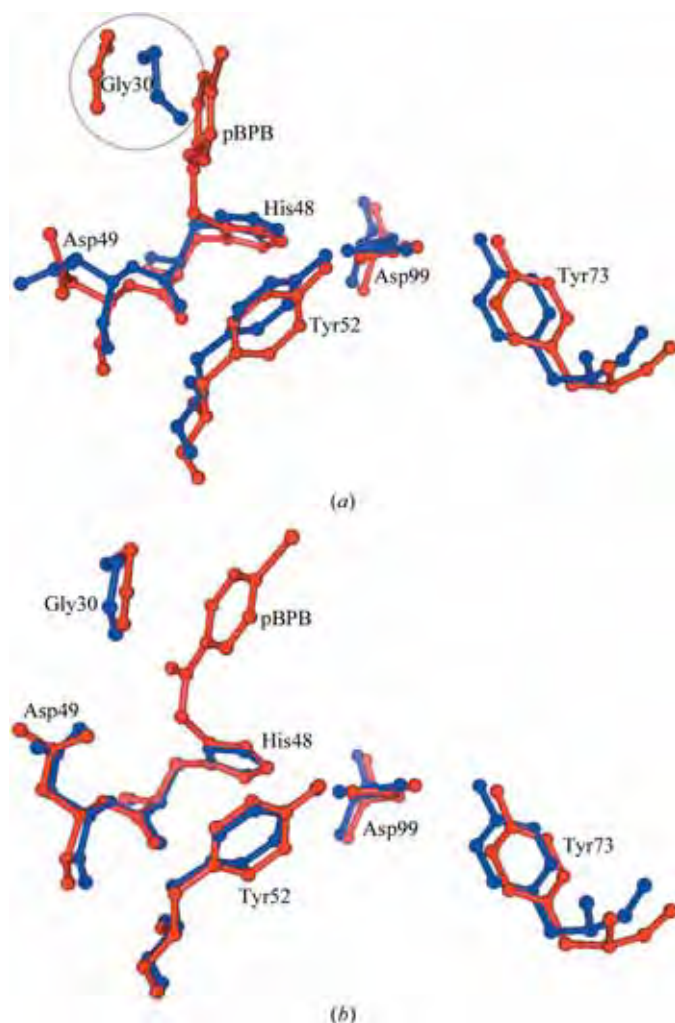


Figure 4
Superposition of residues involved in the catalytic network (Scott *et al.*, 1990). (a) Residues Gly30, His48, Asp49, Tyr52, Tyr73 and Asp99 of monomer A of native d-BthA-I (blue) and of the complex BthA-I-BPB (red) were superimposed. The C $^{\alpha}$ atoms of α -helices h1, h2 and h3 were used in the superposition. (b) Superposition of the catalytic residues of monomer B of native d-BthA-I (blue) and of the complex BthA-I-BPB (red) superimposed as in (a). This figure was drawn using *PyMol* (DeLano, 2002).

The presence of the inhibitor in the active site displaces the Ca²⁺-binding loop, which interacts with the C-terminal region, which is also displaced. Residues Gly30, Leu31 and Leu32 are displaced by the BPB group, yielding a different conformation of the Ca²⁺-binding loop. Comparison of monomer B of BthA-I-BPB with the m-BthA-I and d-BthA-I monomers indicates significant structural modification of the Gly32 main chain and Leu31 main and side chains, while the same comparison for monomer A shows that not only the Gly32 and Leu31 but also the Gly30 main-chain atoms were displaced. Additionally, Leu23 from the ‘short’ helix is also displaced by the BPB group. Despite the disulfide bridge between Cys133 and Cys50 which gives reasonable stability to the C-terminal region, residues 123–130 are shifted up to 2.6 Å compared with the native BthA-I structure.

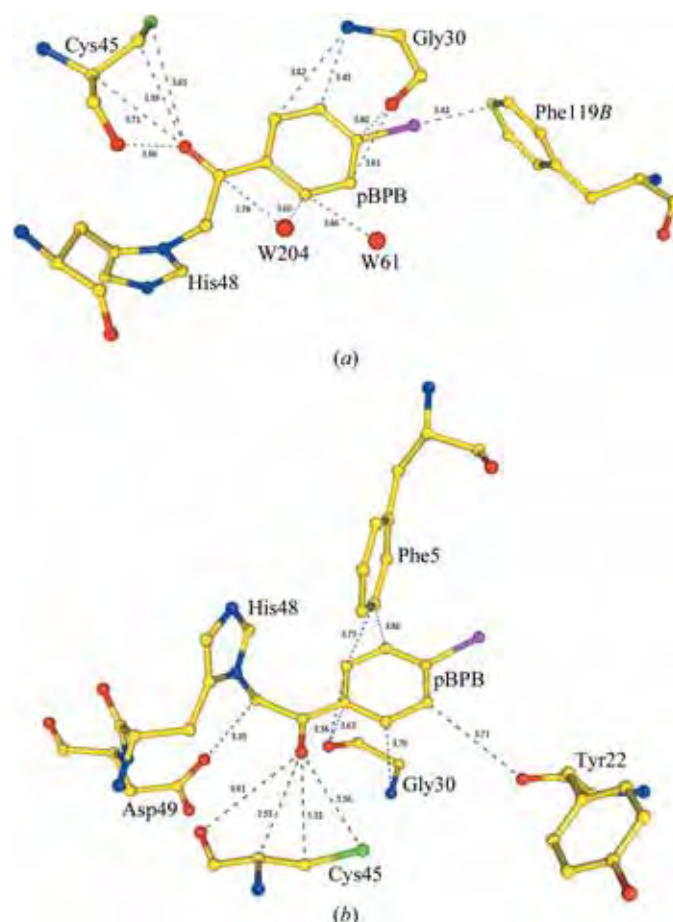


Figure 5
BPB-group interaction with the residues of the BthA-I-BPB complex structure. (a) Monomer A interactions. Residues Gly30, His48, Cys45 and Phe119 (from monomer B) and two water molecules (W61 and W204) are labelled (red, oxygen; yellow, carbon; blue, nitrogen; green, sulfur; pink, bromide). (b) Monomer B interactions. Residues Phe5, Tyr22, Gly30, His48, Asp49 and Cys45 are labelled (colored as in a). This figure was drawn using *RIBBONS* (Carson, 1997).

The BthA-I–BPB structure reveals a novel oligomeric conformation compared with d-BthA-I and with all class IIA PLA₂ structures available in the PDB. The dimer of d-BthA-I (Fig. 7) is stabilized by only a few hydrophobic contacts (six interactions), a salt bridge between Lys93 N^ε and Glu108 O^{δ2} and an additional interaction of Lys93 with Thr104. In contrast, the dimer of BthA-I–BPB is stabilized by a larger number of hydrophobic contacts (12 interactions) and three intermolecular hydrogen bonds. In addition, the BPB group of monomer A interacts with the C-terminus of monomer B (Phe119) (Fig. 5a). The dimeric interface of BthA-I–BPB includes different regions of the protein: the C-terminal, N-terminal, ‘short’ helix and ‘pancreatic’ loop; in BthA-I the dimer contacts only involve the β-wing and α-helix h3. Furthermore, BthA-I–BPB is a more compact structure

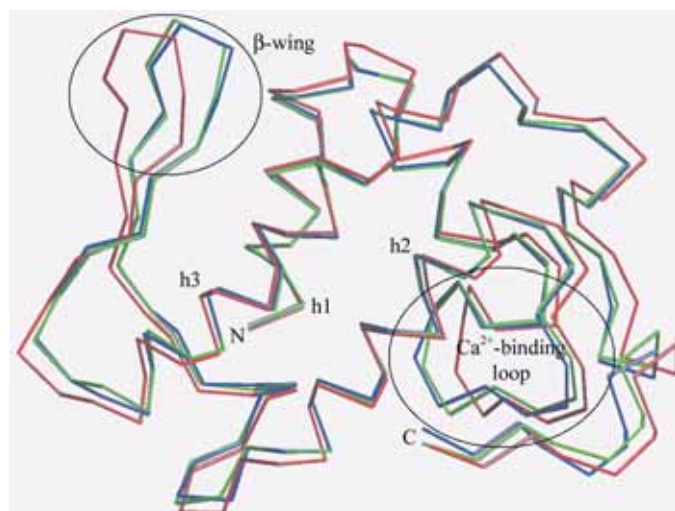


Figure 6
Superposition between BthA-I–BPB monomer A (red), m-BthA-I (green) and d-BthA-I monomer A (blue). The C^α atoms of α-helices h1, h2 and h3 were used in the superposition. This figure was generated using *O* (Jones *et al.*, 1990).

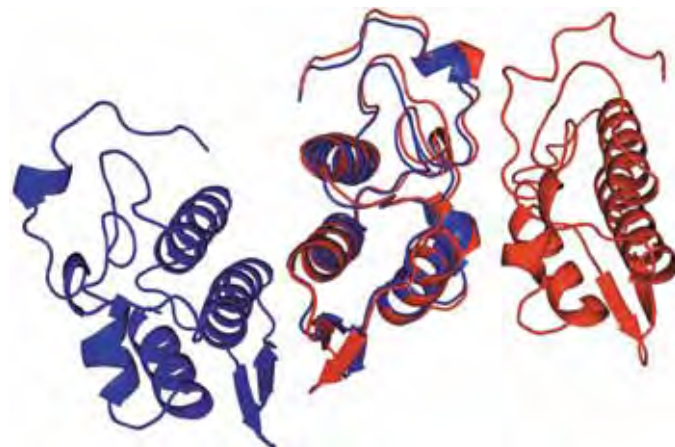


Figure 7
Superposition of monomer A from BthA-I–BPB (red) and d-BthA-I (blue) with the relative disposition of monomer B. The C^α atoms of α-helices h1, h2 and h3 were used in the superposition. This figure was drawn using *PyMol* (DeLano, 2002).

compared with BthA-I, as observed by calculating the buried surface between the monomers in the dimer: 1706 Å² for BthA-I–BPB and 1044 Å² for d-BthA-I. If all of the reasons above (number of interactions, parts of protein involved in the contacts and buried surface) are taken into account, we can hypothesize that the oligomeric structure of BthA-I–BPB is more stable than that of the native protein.

The alternative oligomeric conformation of BthA-I–BPB may be related to the structural changes which accompany BPB binding, mainly in the C-terminal region, leading to a more energetically stable structure. Additionally, the change in the physicochemical parameters used in the crystallization experiments (for example, pH 8.5 for BthA-I–BPB and pH 3.5 for d-BthA-I) may have affected the fragile stabilization of d-BthA-I described by Magro *et al.* (2004). In contrast, the conformational change of the β-wing region is probably a consequence of higher mobility of this region. The β-wing's average *B* factor is 32.9 Å², while for the entire structure this value is 24.5 Å². The β-wing is a region known to be highly flexible in class II PLA₂ enzymes (Magro *et al.*, 2003; da Silva-Giotto *et al.*, 1998). BPB binding probably does not directly affect the β-wing conformation because it is shielded by two α-helices (h2 and h3) which have relatively low mobility (the average *B* factors for the h2 and h3 helices are 19.6 and 21.3 Å², respectively).

In the Asp49-PLA₂ piratoxin III structure (Rigden *et al.*, 2003), the Ca²⁺-binding loop exhibits significant structural distortion when compared with other PLA₂s owing to an extreme diversion taken by the main chain of residues 30–31 which is associated with a change in the backbone dihedral angles of Cys29. The authors suggest this distortion may be a consequence of an alternative conformation of the enzyme (T-state). Following the reasoning of these authors, the BthA-I and BthA-I–BPB structures would represent R-state and T-state conformations, respectively.

4.2. Structural comparison between the inhibited PLA₂s

The crystal structure of bovine pancreatic PLA₂ complexed with BPB (Renetseder *et al.*, 1988) revealed both a Ca²⁺-binding loop and a ‘pancreatic’ loop (residues 59–72) with structural differences compared with the native protein. In contrast, the crystal structure of acidic PLA₂ from *A. halys* Pallas venom complexed with BPB (Zhao *et al.*, 1998) showed remarkable similarity to the native structure (the r.m.s. deviation of C^α atoms is 0.243 Å). The crystal structures of PLA₂s complexed with BPB represent apparently paradoxical results: one induces structural changes in parts of structure and the other does not (Renetseder *et al.*, 1988; Zhao *et al.*, 1998). These results might initially be attributed to structural differences in the native proteins, which belong to different species and classes of PLA₂s; however, closer study suggests these differences may be attributed mainly to the presence of Na⁺ ion at the Ca²⁺-binding loop.

Comparison of the BPB-inhibited and native BthA-I leads to the observation of three main regions with significant structural differences: the Ca²⁺-binding loop, the C-terminus

and the β -wing. In addition, analysis of the two inhibited PLA₂ structures (BthA-I-BPB and bovine pancreatic PLA₂) shows that BPB binding causes changes in the conformational structure of the Ca²⁺-binding loop while for BPB-inhibited *A. halys* Pallas PLA₂, whose Ca²⁺-binding loop binds an Na⁺ ion (Zhao *et al.*, 1998), it did not cause significant changes. It has been suggested that divalent cations such as Ca²⁺ protect bovine PLA₂ against inactivation by BPB and that Ca²⁺ does not bind to the inactivated PLA₂ (Volwerk *et al.*, 1974). Similarly, acidic PLA₂ from *A. halys* Pallas in the presence of Ca²⁺ prevents BPB modification (Zhang *et al.*, 1994). This is probably a consequence of the absence of a water molecule that coordinates the Ca²⁺ ion which was displaced by the BPB group (Renetseder *et al.*, 1988; Zhao *et al.*, 1998). However, the incomplete Ca²⁺ coordination by the ligands creates a distorted geometry of the Ca²⁺-binding loop. This new arrangement still may accommodate an Na⁺ ion in the loop and keeps it in a similar conformation to that observed by Zhao *et al.* (1998). These authors also observed that the presence of an Na⁺ ion may be related to the minor conformational changes in structure. Consequently, we suggest that PLA₂s undergo structural changes when chemically modified with BPB, particularly at the Ca²⁺-binding loop, leading to loss of catalytic activity.

4.3. Inhibition of pharmacological activity by BPB

Phospholipases A₂ from snake venoms are intriguing proteins with a wide range of pharmacological effects in addition to their catalytic role. Kini & Evans (1989) proposed a model in which there are specific pharmacological sites in different parts of the protein. However, in terms of structural information, little is known about the precise localization of these sites, although some information has been accumulated over the last few years. The anticoagulant-effect site is associated with two pairs of lysine residues between positions 54 and 77 (the 'pancreatic' loop; Kini & Evans, 1989; Carredano *et al.*, 1998). In the structure of toxin RVV-VD from Russell's viper (Carredano *et al.*, 1998) four lysine residues were observed at positions 54, 56, 67 and 69 which might be associated with anticoagulant action. The myotoxic and Ca²⁺-independent membrane-damaging activities have been associated with the C-terminal region of Lys49-PLA₂s (Ward *et al.*, 2002; Chioato *et al.*, 2002). Recently, site-directed mutagenesis experiments (Chioato *et al.*, 2002) showed these activities to be independent and determined by discrete yet partially overlapping motifs in the C-terminal loop, where residue Lys122 is essential for this function. Recent structural results also support this hypothesis (Magro *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2001). However, no structural information is known about the hypotensive effect and only a hypothesis has been developed for the inhibition of platelet aggregation (Wang *et al.*, 1996) in which it was suggested that the aromatic cluster formed by Phe20, Trp21 ('short' helix) and Phe113 and Trp119 (C-terminal) residues might be responsible for the platelet-aggregation inhibition effect. However, these aromatic resi-

dues are not totally conserved in some PLA₂s which also possess this activity.

BthA-I chemically modified with BPB shows an interesting characteristic after inhibitor binding: oligomeric change. While the native protein appears to be a monomer or a weakly formed dimer, the BPB-modified protein appears to be a more energetically and conformationally stable dimer structure. Furthermore, this 'new' oligomeric structure of BthA-I-BPB buries a large number of residues in the dimeric interface which includes key regions related to the pharmacological effects for PLA₂s: the C-terminal loop, the 'short' helix and Lys69 (which belongs to the 'pancreatic loop' in class I PLA₂s and is associated with anticoagulant activities in class II PLA₂s). It has been proposed (Carredano *et al.*, 1998) that this residue is essential for the anticoagulant effect. Lys69 from both BthA-I-BPB monomers makes hydrogen bonds with C-terminal residues (Fig. 2). Consequently, we suggest that BPB binding may indirectly inhibit the anticoagulant effect and possibly other pharmacological effects such as hypotensive and platelet-aggregation inhibition by oligomeric structural changes.

In conclusion, modification of BthA-I by BPB leads to both tertiary and quaternary structural changes. The novel oligomeric conformation is more stable when compared with the native structure and the inhibition of pharmacological effects by the ligand might arise from the oligomeric changes in the protein structure. Further structural studies, including site-directed mutagenesis, must be performed to understand the pharmacological activities of this and other PLA₂s in order to aid the design of specific and potent inhibitors which could lead to new drugs.

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

References

- Andrião-Escarso, S. H., Soares, A. M., Fontes, M. R. M., Fuly, A. L., Corrêa, F. M. A., Rosa, J. C., Greene, L. J. & Giglio, J. R. (2002). *Biochem. Pharmacol.* **64**, 723–732.
- Arni, R. K., Fontes, M. R. M., Barberato, C., Gutiérrez, J. M., Díaz-Oreiro, C. & Ward, R. J. (1999). *Arch. Biochem. Biophys.* **366**, 177–182.
- Azevedo, W. F. de, Ward, R. J., Lombardi, F. R., Giglio, J. R., Soares, A. M., Fontes, M. R. M. & Arni, R. K. (1997). *Protein Pept. Lett.* **4**, 329–334.
- Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. & Warren, G. L. (1998). *Acta Cryst.* **D54**, 905–921.
- Carredano, E., Westerlund, B., Persson, B., Saarinen, M., Ramaswamy, S., Eaker, D. & Eklund, H. (1998). *Toxicon*, **36**, 75–92.
- Carson, M. (1997). *Methods Enzymol.* **277**, 493–505.
- Chandra, V., Kaur, P., Jasti, J., Betzel, C. & Singh, T. P. (2001). *Acta Cryst.* **D57**, 1793–1798.

- Chioato, L., de Oliveira, A. H., Ruller, R., Sá, J. M. & Ward, R. J. (2002). *Biochem. J.* **366**, 971–976.
- Daniele, J. J., Bianco, I. D. & Fidelio, G. D. (1995). *Arch. Biochem. Biophys.* **318**, 65–70.
- Deenen, L. L. M. van & de Haas, G. H. (1963). *Biochem. Biophys. Acta*, **70**, 538–553.
- DeLano, W. L. (2002). *The PyMOL Molecular Graphics System*. DeLano Scientific, San Carlos, USA.
- Georgieva, D. N., Rypniewski, W., Gabdoulkhakov, A., Genov, N. & Betzel, C. (2004). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **319**, 1314–1321.
- Gutiérrez, J. M. & Lomonte, B. (1997). *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism*, edited by R. M. Kini, pp. 321–352. Chichester: Wiley & Sons.
- Homsí-Brandeburgo, M. I., Queiroz, L. S., Santo-Neto, H., Rodrigues-Simioni, L. & Giglio, J. R. (1988). *Toxicon*, **26**, 615–627.
- Jancarík, J. & Kim, S.-H. (1991). *J. Appl. Cryst.* **24**, 409–411.
- Jones, T. A., Bergdoll, M. & Kjeldgaard, M. (1990). *Crystallographic and Modelling Methods in Molecular Design*, edited by C. E. Bugg & S. E. Ealick, pp. 189–195. New York: Springer-Verlag.
- Kini, R. M. & Evans, H. J. (1989). *Toxicon*, **27**, 613–635.
- Kleywegt, G. J. & Jones, T. A. (1997). *Methods Enzymol.* **277**, 208–230.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. (1993). *J. Appl. Cryst.* **26**, 283–291.
- Lee, W. H., da Silva-Giotto, M. T., Marangoni, S., Toyama, M. H., Polikarpov, I. & Garratt, R. C. (2001). *Biochemistry*, **40**, 28–36.
- MacPherson, A. (1982). *Preparation and Analysis of Protein Crystals*. New York: Wiley.
- Magro, A. J., Murakami, M. T., Marcussi, S., Soares, A. M., Arni, R. K. & Fontes, M. R. M. (2004). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **323**, 24–31.
- Magro, A. J., Soares, A. M., Giglio, J. R. & Fontes, M. R. M. (2003). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311**, 713–720.
- Navaza, J. (1994). *Acta Cryst.* **A50**, 157–163.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). *Methods Enzymol.* **276**, 307–326.
- Ownby, C. L. (1998). *J. Toxicol. Toxin Rev.* **17**, 1003–1009.
- Pereira, M. F., Novello, J. C., Cintra, A. C. O., Giglio, J. R., Landucci, E. C. T., Oliveira, B. & Marangoni, S. (1998). *J. Protein Chem.* **17**, 381–386.
- Renetseder, R., Dijkstra, B. W., Huizunga, K. H., Kalk, K. H. & Drenth, J. (1988). *J. Mol. Biol.* **200**, 181–188.
- Rigden, D. J., Hwa, L. W., Marangoni, S., Toyama, M. H. & Polikarpov, I. (2003). *Acta Cryst.* **D59**, 255–262.
- Roberto, P. G., Kashima, S., Marcussi, S., Pereira, J. O., Astolfi-Filho, S., Nomizo, A., Giglio, J. R., Fontes, M. R. M., Soares, A. M. & França, S. C. (2004). *Protein J.* **23**, 273–285.
- Roberto, P. G., Kashima, S., Soares, A. M., Chioato, L., Faça, V. M., Fuly, A. L., Astolfi-Filho, S., Pereira, J. O. & França, S. C. (2004). *Protein Expr. Purif.* **37**, 102–108.
- Rosenberg, P. (1990). *Handbook of Toxicology*, edited by W. Shier & D. Mebs, pp. 67–277. New York: Marcel Dekker.
- Scott, D. L., White, S. P., Otwinowski, Z., Yuan, W., Gelb, M. H. & Sigler, P. B. (1990). *Science*, **250**, 1541–1546.
- Serrano, S. M. T., Reichl, A. P., Mentele, R., Auerswald, E. A., Santoro, M. L., Sampaio, C. A. M., Camargo, A. C. M. & Assakura, M. T. (1999). *Arch. Biochem. Biophys.* **367**, 26–32.
- Silva-Giotto, M. T. da, Garratt, R. C., Oliva, G., Mascarenhas, Y. P., Giglio, J. R., Cintra, A. C. O., de Azevedo, W. F. Jr, Arni, R. K. & Ward, R. J. (1998). *Proteins*, **30**, 442–454.
- Six, D. A. & Dennis, E. A. (2000). *Biochim. Biophys. Acta*, **1488**, 1–19.
- Soares, A. M., Fontes, M. R. M. & Giglio, J. R. (2004). *Curr. Org. Chem.* **8**, 1677–1690.
- Soares, A. M. & Giglio, J. R. (2003). *Biochimie*, **42**, 855–868.
- Takeda, A. A. S., dos Santos, J. I., Marcussi, S., Silveira, L. B., Soares, A. M. & Fontes, M. R. M. (2004). *Biochim. Biophys. Acta*, **1699**, 281–284.
- Valentin, E. & Lambeau, G. (2000). *Biochimie*, **82**, 815–831.
- Volwerk, J. J., Pieterse, W. A. & de Haas, G. H. (1974). *Biochemistry*, **13**, 1446–1454.
- Wallace, A. C., Laskowski, R. A. & Thornton, J. M. (1995). *Protein Eng.* **8**, 127–134.
- Wang, X., Yang, J., Gui, L., Lin, Z., Chen, Y. & Zhou, Y. (1996). *J. Mol. Biol.* **255**, 669–676.
- Ward, R. J., Chioato, L., Oliveira, A. H. C., Ruller, R. & Sá, J. M. (2002). *Biochem. J.* **366**, 971–976.
- Watanabe, L., Soares, A. M., Ward, R. J., Fontes, M. R. M. & Arni, R. K. (2005). *Biochimie*, **87**, 161–167.
- Zhang, X., Zheng, L., Lin, N. Q., Ruan, K. C. & Zhou, Y. C. (1994). *Chin. Biochem. J.* **10**, 330–334.
- Zhao, H., Liang, T., Xiaoqiang, W., Yuancong, Z. & Zhengjiong, L. (1998). *Toxicon*, **36**, 875–886.



Molecular characterization and phylogenetic analysis of BjussuMP-I: A RGD-P-III class hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom[☆]

Maurício V. Mazzi^{a,1}, Angelo J. Magro^{b,1}, Saulo F. Amui^a, Clayton Z. Oliveira^a,
Fábio K. Ticli^a, Rodrigo G. Stábili^c, André L. Fuly^d, José C. Rosa^e,
Antônio S.K. Braz^f, Marcos R.M. Fontes^b, Suely V. Sampaio^{a,*},
Andreimar M. Soares^{a,*}

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

^bDepartamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP, Brazil

^cInstituto de Pesquisa em Patologia Tropical, Universidade de Rondônia, UNIR, Porto Velho, RO, Brazil

^dInstituto de Biologia, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal Fluminense, UFF, Niterói, RJ, Brazil

^eDepartamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos and Centro de Química de Proteínas, FMRP-USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^fDepartamento de Genética, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP, Brazil

Received 7 June 2006; received in revised form 20 September 2006; accepted 21 September 2006

Available online 28 September 2006

Abstract

Snake venom metalloproteases (SVMPs) embody zinc-dependent multidomain enzymes responsible for a relevant pathophysiology in envenomation, including local and systemic hemorrhage. The molecular features responsible for hemorrhagic potency of SVMPs have been associated with their multidomains structures which can target these proteins them to several receptors of different tissues and cellular types. BjussuMP-I, a SVMP isolated from the *Bothrops jararacussu* venom, has been characterized as a P-III hemorrhagic metalloprotease. The complete cDNA sequence of BjussuMP-I with 1641bp encodes open reading frames of 547 amino acid residues, which conserve the common domains of P-III high molecular weight hemorrhagic metalloproteases: (i) pre-pro-peptide, (ii) metalloprotease, (iii) disintegrin-like and (iv) rich cysteine domain. BjussuMP-I induced lyses in fibrin clots and inhibited collagen- and ADP-induced platelet aggregation. We are reporting, for the first time, the primary structure of an RGD-P-III class snake venom metalloprotease. A phylogenetic analysis of the BjussuMP-I metalloprotease/catalytic domain was performed to get new insights into the molecular evolution of the metalloproteases. A theoretical molecular model of this domain was built through folding recognition (threading) techniques and refined by molecular dynamics simulation. Then, the final BjussuMP-I catalytic domain model was compared to other SVMPs and Reprolysin family proteins in order to identify eventual structural differences, which could help to understand the biochemical activities of these enzymes. The presence of large hydrophobic areas and some conserved surface charge-positive residues were identified as important features of the SVMPs and other metalloproteases.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: *Bothrops jararacussu*; Snake venom hemorrhagic metalloprotease; cDNA; Phylogenetic analysis; Molecular evolution; Structural analysis

1. Introduction

Snake venoms comprise a complex mixture of pharmacological and toxic active components able to affect several biological systems. The toxic effects of snake venoms are associated with different actions of the major neurotoxins and hemorrhagins. Local and systemic hemorrhagic effects are due to synergic actions of proteolytic enzymes, such as metalloproteases (MPs) and serine-proteases (SPs) [1]. The local

Abbreviations: BjussuMP-I, *Bothrops jararacussu* hemorrhagic metalloprotease I; MP, metalloprotease; PTC-aa, phenylthiocarbamil amino acids; SVMPs, snake venoms metalloproteases

[☆] The sequence data of BjussuMP-I reported in this paper has been submitted to the GenBank under accession no. DQ408681.

* Corresponding authors. Fax: +55 16 3602 4725.

E-mail addresses: suivela@fcfrp.usp.br (S.V. Sampaio), andreims@fcfrp.usp.br (A.M. Soares).

¹ These authors contributed equally to the work.

pathophysiology manifestation of *Bothrops* genus envenomation includes necrosis, blistering, and edema [2–5].

The pathogenesis of venom-induced hemorrhage involves biochemical and biophysical alterations on capillary vessel structure by the action of MPs, which selectively cleave key peptide bonds of basement membrane components such as laminin, fibronectin and type IV collagen [3,5]. Thus, different mechanisms are involved in extravasation of blood and erythrocytes through gaps or intercellular junctions of endothelial cells [5].

Some secondary symptoms including cardiovascular shock may occur as a characteristic of severe envenomations. Systemically, α and β fibrinogenases (MPs and SPs) affect the blood coagulation in different ways, displaying procoagulant, fibrinogen clotting, fibrin and/or fibrinogenolysis and platelet modulations [6–10].

The fact some viper venoms may cause bleeding led many researchers to find out which groups of toxins can accelerate the process of blood coagulation or inhibit it [10]. Despite toxicological interests, some compounds such as snake venom thrombin-like enzymes (SVTLE) and metalloproteases (SVMPs) have been proved to be therapeutically useful as anticoagulants or for the development of diagnostic reagents [11]. During the last decades, some snake venom toxins have been shown to mimic/inhibit physiologically the platelets by interacting/degrading the major integrins of this system, namely Ib-IX-V, von Willebrand factor, $\alpha_2\beta_1$ and $\alpha\text{IIb}\beta_3/\text{IIb-IIIa}$ [7,12–14].

Recent studies have also used venom SVMPs to explore the cellular metabolism of many other cells. HF3, a P-III class metalloprotease from *Bothrops jararaca* and its recombinant disintegrin-like/cystein rich domains (DC-HF3), for example, activated phagocytosis by interacting with integrins $\alpha_M\beta_2$, which are central receptors located on leukocytes surface [4]. Cellular adhesion and apoptosis have been recently studied by using a 106 kDa SVMP from *Vipera lebetina*, which promoted both endothelial cell alterations and cell apoptosis [15]. Jararhagin, a P-III class toxin from *B. jararaca* venom [16] was extensively studied as a potent inhibitor of collagen-induced platelet aggregation via cleavage of $\alpha_2\beta_1/\beta_1$ subunit [7,17,18].

Snake venom metalloproteases (SVMPs) are zinc-dependent enzymes members of the Reprolysin subfamily, which include the ADAMs (*a* disintegrin and metalloproteinase) domains. Functional and structural characteristics of SVMPs have been extensively studied providing new insights into the biochemistry and pharmacology of these multidomain proteins [24]. They are responsible for a relevant pathophysiology in envenomation, including local and systemic hemorrhage. Alteration of basal membrane components and interactions with some factors of the coagulation pathway are the main actions of these classes of enzymes [3,5]. Moreover, these compounds were also demonstrated to be an important tool to understand signaling mechanisms either apoptosis or other cell adhesion alterations involved in wound healing and tumoral metastasis. These effects were recently observed with VLAIP and BaG from *V. lebetina* and *Bothrops alternatus*, respectively [15,20].

SVMPs are synthesized in the venom gland as large multidomain proteins, including a proenzyme and a conserved zinc-protease domains [1]. They are secreted as preproenzymes and contain additional regulatory modules, which are responsible for interactions with the extracellular matrix and integrins. Mature P-I class proteins have only a metalloprotease domain, whereas P-II, P-III, and P-IV classes have disintegrin or disintegrin-like, cysteine-rich, and lectin-like domains found close to the carboxyl end of the protease, respectively [1,2].

Important correlations have been established between hemorrhage and structural domains P-III class SVMPs, which are the most potent hemorrhagic toxins isolated from snake venoms. Some additional domains of these proteins (disintegrin-like and cysteine-rich) act in local and systemic hemorrhage [2,19]. Other comparative structural studies of hemorrhagic and non-hemorrhagic SVMPs have suggested that, in addition to disintegrin and cysteine residues, *N*-glycosylation with post-translational modification site (NCSY, NCSK) may contribute to hemorrhagic potency of some MPs [3,19,21]. Disintegrins are low molecular weight non-enzymatic venom components containing RGD or KGD sequences, reported as the main structures, which bind to platelet surface integrins and modulate platelet aggregation by different mechanisms [7]. However, most of disintegrin-like domains of the metalloproteases do not have an RGD sequence. With some exceptions, hemorrhagic and non-hemorrhagic SVMPs have a conserved ECD sequence near the region where an RGD sequence is found in the “true” disintegrins [7].

Recently, we isolated a 60 kDa hemorrhagic metalloprotease, BjussuMP-I, from *Bothrops jararacussu* snake venom [22]. BjussuMP-I exhibited proteolytic activity on fibrinogen that was completely inhibited by chelant agents. Because platelets play crucial role in hemostasis and are targets of metalloproteases disintegrin-like/disintegrins, we have investigated BjussuMP-I as an inhibitor of platelet aggregation. We also report the deduced full length sequence of BjussuMP-I by cDNA cloning, and, for the first time, the primary structure of an RGD-P-III class snake venom metalloprotease.

In addition, a phylogenetic analysis of the BjussuMP-I metalloprotease/catalytic domain was done to find out new insights into the molecular evolution of the metalloproteases. A theoretical model of this domain was also built through folding recognition (threading) techniques and refined by a molecular dynamics simulation. Then, the final BjussuMP-I catalytic domain model was compared to the corresponding domains present in other SVMPs and Reprolysin family proteins in order to identify eventual structural differences, which could help to understand the biochemical activities of these enzymes.

2. Materials and methods

2.1. Materials

BjussuMP-I and BthA-I-PLA₂ were purified from *B. jararacussu* snake venom using the methodology previously described [22,23].

2.2. Fibrinolytic activity of BjussuMP-I

Plates containing fibrin clots were prepared by the method of Leitão et al. [24] with some modifications. The methodology consists of mixing equal volumes of 0.3% fibrin and 0.95% agarose solutions, both dissolved in 50 mM barbital buffer (pH 7.8, 1.66 mM CaCl₂, 0.68 mM MgCl₂ and 93.96 mM NaCl). The fibrinogen–agarose mixture was coagulated with 80 μL thrombin (1 μg/μL) in glass Petri dishes 90 mm × 1.5 mm. After 30 min at 4 °C an adequate number of wells (5 mm in diameter) were dug. To determine fibrinolytic activity, 30 μL aliquots of crude *B. jararacussu* venom (Bioagents Serpentarium, Batatais, SP) and BjussuMP-I were added to each well, the plate incubated, and areas of lysis quantified after 12 h at 37 °C.

2.3. Platelet aggregation assay

In this assay, the procedure described by Andrião-Escarso et al. [22] was used. Platelet rich plasma (PRP) was prepared from citrated rabbit blood (0.31%, w/v) by centrifugation (360 × g/12 min) at room temperature. PRP samples obtained as above were centrifuged at 1370 × g for 20 min and the platelet pellets were suspended in a calcium-free Tyrode's solution containing 0.35% (w/v) bovine serum albumin (BSA) and 0.1 mM EGTA (final concentration), pH 6.5, and washed twice by centrifugation. The final pellet was then suspended in Tyrode-BSA, pH 7.5, without EGTA. The suspension was adjusted to give (3–4) × 10⁵ platelets/μL. Platelet aggregation was measured by turbidimetry using a Whole Blood Lumi-Aggregometer, Chrono-Log Corporation. Assays were performed at 37 °C in siliconized glass cells using 200 μL of PRP, under stirring, and aggregation was triggered after pre-incubation for 2 min with aliquots of *B. jararacussu* metalloprotease (BjussuMP-I) or acidic PLA₂ (BthA-I-PLA₂) in the presence of 1.0 mM CaCl₂ (final concentration). Control experiments were done using the platelet agonists alone (ADP or collagen).

2.4. Amino acid analysis

Amino acid composition was determined using a LDC Analytical HPLC (LDC-Thermo Separation Products). Previously, samples (0.3–0.6 μg/μL) of BjussuMP-I were hydrolyzed with 6 M HCl/0.5% phenol (v/v) for 24 h in vapor phase. The hydrolyzed BjussuMP-I was derivatized to phenylthiocarbonyl with 7:1:1:1 methanol:water:TEA:PITC (v/v/v/v) and the PTC-aa were separated by reverse phase HPLC on a C-18 column (Picotag 3.9 mm × 150 mm) from Waters, using a non-linear gradient from 8 to 52%B with 0.14 M of sodium acetate buffer pH 5.8 as solvent A and, acetonitrile:H₂O (60:40 v/v) as buffer B, at flow rate of 1.0 mL/min, temperature of 38 °C with effluent monitored at 254 nm. Data were analyzed by LC Talk software (Thermo Separation products) after standard calibration with amino acid mixture from Pierce Chemical Co.

2.5. Protein and DNA sequencing, design and synthesis of oligonucleotide probes

Briefly, BjussuMP-I (100 pmol) was reduced with 45 mM DTT for 1 h at 56 °C, followed by alkylation with 100 mM iodoacetamide for 3 h at 25 °C. N-terminal amino acid sequencing of BjussuMP-I was performed using a Procise protein sequenator model 491 (Perkin-Elmer Applied Biosystem Division, Foster City, CA) by automatic Edman degradation reaction using gas-phase chemistry with on-line identification of phenylthiohydantoin derivatives.

The primers used [5'-GGAAAAGATTATGACCGAGA-3' and 5'-TTGTTGGTTA GGCATGG(T/A)-3'] were designed according to N and C-terminal sequences of other snake venom MPs from class III and N-terminal sequence of BjussuMP-I. Total RNA was extracted from *B. jararacussu* venomous glands using the Trizol™ method as specified by the manufacturer. Later on, 5 μg of total RNA was submitted to the reverse transcription reaction for synthesis of the first cDNA strand of the toxin in the presence of reverse transcriptase and oligo dT for 1 h at 42 °C. The second strand was synthesized using 2 μL of the above volume, combined with general and specific primers in order to allow the enzyme to amplify the wanted genes.

The final product was analyzed for size after amplification on 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide. Purification of the PCR product was then carried out using Concert Rapid PCR Purification System (Gibco BRL) kit, according to the manufacturer's specifications. The sequencing reaction was led from the purified product using the ABI Prism® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin-Elmer), while electrophoresis was run in the ABI Prism 377 DNA Sequencer (Perkin-Elmer) apparatus, using a 4% polyacrylamide gel plus 6 M urea. Electrophoresis was run at 1500 V, 51 °C, for 7 h. The electrophorogram obtained were analyzed with the ABI Analysis Data Collection program and the sequences were then analyzed with the Sequencer software, version 3.1.

2.6. Sequence identification in databases

The amino acid sequence of the BjussuMP-I metalloprotease domain was used as a probe to search for homologous sequences in the NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and UniProt databases (<http://www.pir.uniprot.org>). The BLAST P was used to select sequences in the first database, with a BLOSUM45 distance matrix and default parameters. The minimum e-value of the sequences selected using the BLASTp was 1e-28. UniProt database searching was executed through the Pfam website (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>). All the identified protein sequences and their respective data base identification codes are shown in Table 1.

2.7. Sequence alignments and phylogenetic analysis

All protein sequence alignments were made using the program ClustalX (version 1.83) [26]. The sequences were

Table 1
Homologue protein sequences to the BjussuMP-I catalytic domain found at the NCBI and UniProt databases

Protein (four-letter identification code)	Species or subspecies	ID code
Protein sequences from Viperidae family		
Metalloprotease BOJUMET I (Bjus)	<i>Bothrops jararacussu</i>	gb AAP78952.1
Metalloprotease BaP1 (Basp)	<i>Bothrops asper</i>	pdb 1ND1
Metalloprotease precursor (Gsax)	<i>Gloydius saxatilis</i>	gb AAP20642.1
Insularinase and insularin precursor (Bins)	<i>Bothrops insularis</i>	gb AAU47334.1
Piscivostatin beta chain (Apis)	<i>Agkistrodon piscivorus piscivorus</i>	dbj BAC55947.1
Metalloprotease (Ghal)	<i>Gloydius halys</i>	gb AAD02655.1
Lebetase isoform Le-4 (Mleb-1)	<i>Macrovipera lebetina</i>	gb AAY45880.1
Non-hemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease (Bneu)	<i>Bothrops neuwiedi</i>	gb AAF28364.1
Jararhagin (Bjar)	<i>Bothrops jararaca</i>	emb CAA48323.1
Hemorrhagic metalloprotease HR1b (Tfla-1)	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	dbj BAB92014.1
Adamalysin II (Cada)	<i>Crotalus adamanteus</i>	pdb 1IAG
Metalloprotease 4 (Bgab)	<i>Bitis gabonica</i>	gb AAR19273.1
Metalloprotease atrolysin E (Catr)	<i>Crotalus atrox</i>	gb AAB23201.1
Stejnihagin-A (Vste-1)	<i>Viridovipera stejnegeri</i>	gb ABA40760.1
Acutolysin A (Dacu-1)	<i>Deinagkistrodon acutus</i>	gb AAD51824.1
Berythactivase (Bery)	<i>Bothrops erythromelas</i>	gb AAL47169.1
Stejnihagin-B (Vste-2)	<i>Viridovipera stejnegeri</i>	gb ABA40759.1
Metalloprotease (Epyr)	<i>Echis pyramidum</i>	emb CAA55566.1
Trimutase precursor (Pmuc)	<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	gb AAB94016.1
Zinc metalloprotease flavoridin precursor (Tfla-2)	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	sp P18619
Prothrombin activator EoMP06 (Eoce)	<i>Echis ocellatus</i>	gb AAP92424.1
Acutolysin C (Aacu)	<i>Agkistrodon acutus</i>	sp P60244
Coagulation factor X activating enzyme heavy chain (Vrus)	<i>Vipera russelli</i>	gb AAB22477.1
Aculysin-1 (Dacu-2)	<i>Deinagkistrodon acutus</i>	emb CAB46429.1
Metalloprotease precursor (Cmol)	<i>Crotalus molossus molossus</i>	UniProt TrEMBL Q8JJ51
Hemorrhagic factor II (Lmut)	<i>Lachesis muta muta</i>	UniProt P22796
Metalloprotease precursor (Acon)	<i>Agkistrodon contortrix</i>	gb AAC59703
Fibrolase (Mleb-2)	<i>Macrovipera lebetina</i>	sp P83255
Protein sequences from Elapidae family		
Mocarhagin 1 (Nmos)	<i>Naja mossambica mossambica</i>	gb AAM51550.1
Hemorrhagic metalloprotease kaouthiagin (Nkao)		
Cobrin precursor (Nnaj)	<i>Naja kaouthia</i>	UniProt Swiss-Prot P82942
Metalloprotease precursor (Amic-1)	<i>Naja naja</i>	UniProt TrEMBL Q9PVK7
Metalloprotease precursor (Amic-2)	<i>Atractaspis microlepidota andersoni</i>	gb AAF01040.1
	<i>Atractaspis microlepidota andersoni</i>	gb AAF01041.1
Other related protein sequences		
ADAM metalloprotease domain 28 (Ggal-1)	<i>Gallus gallus</i>	ref NP_001026058.1
Protein similar to ADAM 13 (Ggal-2)	<i>Gallus gallus</i>	ref XP_420886.1
ADAM metalloprotease domain 9 (Ggal-3)	<i>Gallus gallus</i>	ref NP_001026567.1
Protein similar to a disintegrin and metalloprotease domain 21 preproprotein (Ggal-4)	<i>Gallus gallus</i>	ref XP_428276.1
Disintegrin and metalloprotease domain 28 isoform 1 (Mmus-1)	<i>Mus musculus</i>	ref NP_034212.1
Disintegrin and metalloprotease domain 8 (Mmus-2)	<i>Mus musculus</i>	ref NP_031429.1
Unnamed protein product (Mmus-3)	<i>Mus musculus</i>	dbj BAE27990.1
Disintegrin and metalloprotease domain 7 (Mmus-4)	<i>Mus musculus</i>	ref NP_031428.1
ADAM metalloprotease domain 12 isoform 2 preproprotein (Hsap-1)	<i>Homo sapiens</i>	gb AAH60804.1
Metalloprotease-disintegrin meltrin beta (Hsap-2)	<i>Homo sapiens</i>	gb AAG50282.1
ADAM metalloprotease domain 8 precursor (Hsap-3)	<i>Homo sapiens</i>	ref NP_001100.2
ADAM metalloprotease domain 28 isoform 1 preproprotein (Hsap-4)	<i>Homo sapiens</i>	ref NP_055080.1
Disintegrin and metalloprotease domain 7 (Hsap-5)	<i>Homo sapiens</i>	ref NP_003808.1
Unknown protein (Xlae-1)	<i>Xenopus laevis</i>	gb AAH91726.1
ADAM 13 (Xlae-2)	<i>Xenopus laevis</i>	gb AAB51194.1
Metalloprotease-disintegrin (Xlae-3)	<i>Xenopus laevis</i>	gb AAC61846.1
Protein similar to a disintegrin and metalloprotease domain 28 isoform 1 preproprotein (Drer-1)	<i>Danio rerio</i>	ref XP_686264.1
Protein similar to a disintegrin and metalloprotease domain 8 (Drer-2)	<i>Danio rerio</i>	ref XP_684931.1
Disintegrin and metalloprotease domain 8 (Drer-3)	<i>Danio rerio</i>	ref NP_956931.1
SD04095p (Dmel)	<i>Drosophila melanogaster</i>	gb AAO39439.1
Hypothetical protein C04A11.4 (Cele)	<i>Caenorhabditis elegans</i>	emb CAA94147.1

aligned using the PAM series protein weight matrices for the pairwise and multiple alignments, with the default values for gap parameters (open and extension penalties). The phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using MEGA version 2.1 [27].

Trees were generated by Neighbor-Joining using the following parameters: complete deletion, Poisson correction, and bootstrap with 2000 replications. The protein sequences utilized in this analysis and their respective four-letter identification codes in the phylogenetic trees are shown in Table 1.

2.8. Protein modeling

All the alignments between the BjussuMP-I catalytic domain sequence and the other homologue molecules deposited in structural databases were generated using the program HHpred [27] available at the Max-Planck Institute for Developmental Biology server (<http://protevo.eb.tuebingen.mpg.de/toolkit>) and based in a threading method. The structure of BaP1 – a metalloproteinase from *Bothrops asper* snake venom (PDB code 1ND1) [28] – was selected and used as template by the program MODELLER 8v2 [29] to build the initial model of the BjussuMP-I catalytic domain. The Zn^{2+} ion and the structural water molecules present in the template structure were added to the initial model using the program MODELLER 8v2 [29]. The structural models of the mocarhagin 1 from *Naja mossambica mossambica* (Nmos), and unknown protein (Xlae-1) and ADAM 13 (Xlae-2) from *Xenopus laevis* were generated through a threading method using the program Fugue [30] (<http://www-cryst.bioc.cam.ac.uk/fugue/prfsearch.html>).

2.9. Molecular dynamics simulation

The molecular dynamics (MD) simulation was executed using the GROMACS program (Groningen Machine for Chemical Simulation) package version 3.3.1 [31,32] and explicit water molecules, in a Dual Intel Xeon 64 using a SuSe Linux operational system. The simple point charge (SPC) model was used to represent the water molecules [33]. Protonation states of charged groups in each model were set according to pH 7.0. Counter ions were added to neutralize the system and the GROMOS 96 53a6 force field [34] was chosen to perform the MD simulation. The MD simulation was performed at constant temperature and pressure in a periodic truncated dodecahedron box. The minimum distance between any atom of the protein and the box wall was 1.2 nm.

The following protocol was used to generate the starting configuration for the system: after energy minimization (EM) using a steepest descent algorithm, 200 ps of molecular dynamics with position restraints applied to the protein (PRMD) were performed at 298 K to relax the system gently. Then, an unrestrained MD was executed at 298 K during 5 ns of simulation to assess the stability of the structures. During the simulations, temperature and pressure (1.0 bar) were maintained by the coupling to an external heat and an isotropic

pressure bath [35]. The distances between the catalytic histidines and the Zn^{2+} ion were kept according to Andreini et al. [36].

2.10. Evaluation of the theoretical BjussuMP-I catalytic domain model

The overall geometric quality of the final theoretical BjussuMP-I catalytic domain model was checked through the programs PROCHECK v.3.5.4 [37] and ProSa2003 [38]. The structural coordinates of the final theoretical BjussuMP-I catalytic domain model have been deposited in the RCSB Protein Data Bank under accession code 2DX9.

2.11. Identification of conserved surface residues

The identification and localization of the conserved surface residues were executed through the program Chimera [39] and based on the final theoretical BjussuMP-I catalytic model and threading models of the mocarhagin 1 from *Naja mossambica mossambica* (Nmos), and unknown protein (Xlae-1) and ADAM 13 (Xlae-2) from *Xenopus laevis*. The figures of the structural models with the conserved surface residues were generated with the program PyMOL [40].

3. Results and discussion

3.1. Fibrinolytic and platelet aggregation effects of BjussuMP-I

In a previous study we showed that BjussuMP-I degraded the $A\alpha > B\beta$ chain of fibrinogen, classifying it as a α -fibrinogenase [22]. In Fig. 1A direct proteolysis of fibrin clots is observed with BjussuMP-I confirming the fibrin(ogen)olytic mechanism of the enzyme. In order to eliminate a possible indirect effect, we used plasminogen-free fibrinogen. The minimum fibrinolytic dose (MFD) is defined as the dose of enzyme which results in a halo of 10 mm diameter. BjussuMP-I degraded fibrin with $MFD \cong 6.0 \mu\text{g}$.

Fibrinogenolytic enzymes are naturally found in Viperidae, Elapidae and Crotalidae snake venoms. As reviewed by Swenson and Markland [41], since 1700 several attempts have been made in order to find a practical application of proteolytic enzymes in blood disorders. With some exceptions, from the 67 fibrin(ogen)olytic enzymes reported, 46 are high or low molecular weight metalloproteases, hemorrhagic or non-hemorrhagic. These enzymes are classified as α and β fibrinogenases in virtue of degrading preferentially (although not exclusively) either α or β chains of fibrinogen, respectively. In addition, most of metalloproteases are both fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes (for more details, see [8,41]).

One of the major medical interests for snake venom proteases may be their use as sources of potential pharmaceutical agents. Indeed, because of their broad spectrum of proteolytic activity leading to fibrinogen and/or fibrin degradation, they can be true anticoagulants or templates to obtain new drugs. Regarding that, in vitro and in vivo studies

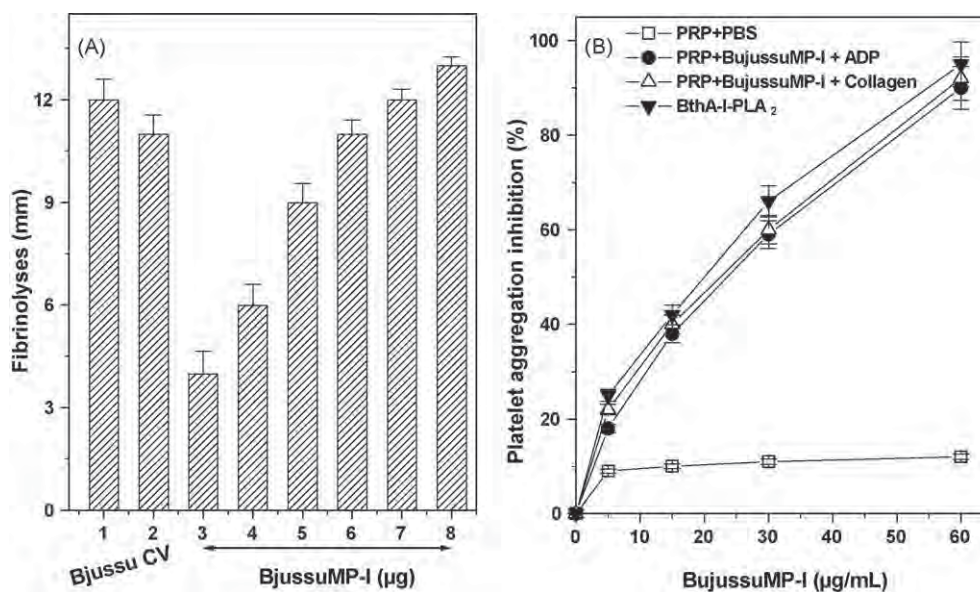


Fig. 1. Effects of BjuSSuMP-I upon fibrin and platelets. (A) Fibrinolytic activity of BjuSSuMP-I upon plates containing fibrin clots. (1,2) *Bothrops jararacussu* CV (15.0 µg), (3–8) BjuSSuMP-I in different concentrations (3.0, 6.0, 15.0, 30.0, 60.0 and 120.0 µg). (B) Inhibition of ADP- and collagen-induced platelet aggregation by BjuSSuMP-I. Rich plasma platelets suspensions containing 4×10^5 platelets/µL were incubated with different concentrations of BjuSSuMP-I and for 2 min before adding 2.0 µg/mL ADP or collagen. Results are expressed as percentages of positive and negative control values using acidic PLA₂ (BthA-I-PLA₂) and PBS, respectively. Each bar represents the mean \pm S.D. ($n = 3$).

using hemorrhagic or non-hemorrhagic metalloproteases have been demonstrated that these compounds may have potential application in thrombolytic therapies [42,43].

In order to investigate the effect of BjuSSuMP-I and to suggest a mechanism involved in platelet modulation (Fig. 1B), we show the aggregation of platelets triggered by ADP and collagen. To compare the effects of BjuSSuMP-I, we used a *B. jararacussu* acidic phospholipase A₂ (BthA-I-PLA₂) as a platelet aggregation inhibitor. In Fig. 1B, we observed that the BjuSSuMP-I inhibited platelet aggregation triggered by collagen or ADP. Recently, snake venom proteins such as disintegrins and disintegrin-like metalloproteases have been shown to be selective for integrin receptors, providing new insights into molecular mechanisms on platelet adhesion. This fact proves these proteins are useful to identify targets for novel anti-thrombotic or diagnostic reagents [14,44].

3.2. Primary structure of BjuSSuMP-I: N-terminus and cDNA sequencing

BjuSSuMP-I was first isolated from *B. jararacussu* by Mazzi et al. [22]. The primary sequence of this protein consists of 546 amino acid residues, with a high percentage of polar groups (Asp, Glu, Gly). As confirmed by the cDNA sequence (Fig. 2), the amino acid composition of BjuSSuMP-I shows this molecule has a possible acidic character, with a theoretical $pI \cong 5.65$ and $M_r \cong 61930.6$, and also shows the presence of 29 half-cysteine residues. In previous studies, Bjarnason and Fox [2] suggested that the high cysteine content and the disintegrin-like domain might be involved in the hemorrhagic effect. BjuSSuMP-I presented hemorrhage on mouse back skin when micrograms (MHD = 4.5 µg) of enzyme was injected subcutaneously [22]. Recent research has been reported that the domain of P-III class

SVMPs has a considerable content of cysteinyl (Cys) residues [19]. Moreover, the Cys residues and the intra-domain disulfide bonds found in variable positions of the P-III metalloproteases, may be associated with the structural stability of the molecule containing disintegrin-like and cysteine-rich residues [19,45].

The identity of the BjuSSuMP-I cDNA was confirmed by N-terminal amino acid sequence, E-QQKFPYRYVEIVVVD-RRHV, which together with the amino acid sequence of other SVMPs from P-III class, were used to design the primers. The degenerate primers were designed for cDNA amplification and the PCR products analysis revealed a cDNA sequence of 1.6 kb (results not shown).

The sequence search of the GenBank data base revealed that BjuSSuMP-I has a high sequence identity with other P-III SVMPs. The sequence identities of BjuSSuMP-I precursor with those snake venom metalloprotease precursors was shown in Fig. 3. The protease, disintegrin, and cysteine-rich domains in mature BjuSSuMP-I are composed of 207, 100 and 127 amino acid residues, respectively.

According to the deduced amino acid sequence analysis of BjuSSuMP-I, we found an open reading frame of 547 amino acid residues, consisting of conserved domains of P-II and P-III high molecular weight hemorrhagic metalloproteases. In Fig. 3, we observed a multidomain structure comprised of a proprotein sequence of 133 residues and a mature protein of 414 residues, including a cysteine switch motif, metalloprotease, disintegrin and cysteine-rich domains. BjuSSuMP-I is a potentially active hemorrhagic and proteolytic protein, which is inhibited by chelating agents [22]. We also identified the sequence of the consensus zinc-binding site (H-E-L-G-H-N-L-G-M-E-H-D) localized in its metalloprotease domain, which is constituted by 218 amino acid residues. The conservative presence of zinc-binding domain histidine residues is essential for both stability

1	gagtttaaagttaaacgggtgagccagtagtgctacatttggaaaagaataaggggctcttt	60
1	E F K V N Q E P V V L H L R K N K Q L F	20
61	tctgaggattatagcagagcccactatagtcocgatggctcagataactacgtatccc	70
21	S E D Y S E T H Y S P D Q R Q I T T Y P	40
	Prepropeptide	
71	Ccagttgaggatcactggttattaccacggcagaatagaaaatgacgcagactctactgcc	130
41	P V E D H C Y Y H Q R I E N D A D S T A	60
131	togatcagtgocctgcaatgggcttaaaaggcactttaaaactccaaggtgagacttatctg	190
61	S I S A C N G L K G H F K L Q G E T Y L	80
191	atagagccgttaaagtatccggacagcagggcgatgcgggtatataaatcgaaaatggt	250
81	I E P L K L S D S E A H A V Y K Y E N Y	100
251	gaaaaagaggatgaagctcctaaaatgtgtgggttactgaaactaaatgggagtacgaa	310
101	E K E D E A P K M C G V T E T N W E Y E	120
311	gagcctataaagaagcgtccaagcttctggttacggcagagcaacagaaaatttccgtac	370
121	E P I K K A S K L V V T A E Q Q K F P Y	140
371	cgctatgtgaaaatagtggttagtcgtagacaggagaatggtgacgaagtataatggcgac	430
141	R Y V E I V V V V D R R M V T K Y N G D	160
431	ttgaaagaaaattaggaagtggtctacgaactgttaacattgtaacaatatttacggg	490
161	L K K I R K W V Y E L V N I V N N I Y R	180
491	agcttgaatgtacatgtcgcactagtaggactgaaaatctggtccaaggtgacaaaatc	550
181	S L N V H V A L V G L E I W S K G D K I	200
551	acagttcaacctgactccgattataacctaaattcttttggggagtggcgcgaagagat	610
201	T V Q P D S D Y T L N S F G E W K E R D	220
611	ttcctaccagaaaaagcagcacaatgcacagttgcttacagctgtagttttogatggc	670
221	L L P R K K H D N A Q L L T A V V F D G	240
671	cccacaataggtcagcaccatcgcctggtggtgacccctcgacacagcgtcggagtt	730
241	P T I G R A Y I A G M C D P R R H S V G V	260
731	gtgatggatcatagcaaggaaaacttacaagtggtgtaacaatggcgcagcagctaggg	790
261	V M D H S K E N L Q V A V T M A H E L G	280
791	cataacctgggcatggaacatgacgagaaacaaatgtcattgtgcgcgcctcgtgctc	850
281	H N L G M E H D E N Q C H C D A P S C V	300
851	atggcctccgtccttagtggttctatcctatgagttctcagattgttctcagaaccas	910
301	M A S V L S V V L S Y E F S D C S Q N Q	320
911	taccagcgtaccctgacgaagcacaacccacagtgcatctccaagaaactttgtaaca	970
321	Y Q T Y L T K H N P Q C I L N E P L L T	340
971	gtaaatgggaatgagttactcgaggctggggaggaatgtgactcggcgcgccagaaaat	1030
341	V S G N E L L E A G E F C D C G A P R N	360
1031	ccgtgttgacagcgggcaacttgcaaatggggcaggcgcacagtgcgccgaaggctcg	1090
361	P C C D A A T C K L R P G A Q C R E G L	380
1091	tgtgtgatcaatgtgatccaggagctggaasaatttgcggcgtgacagcggagat	1150
381	C C D Q C K F K G A G K I C R R A I C D	400
1151	aatccagacgatcgggtgcacggggcagagtgoggaetgtcctcgtaatcgtttccatoga	1210
401	N P D D R C T G Q S A D C P R N R F H R	420
1211	aatggtcaaccgtgctgtataaccacggatctgttacacggtaaatgtccgatcatg	1270
421	N G Q P G L Y N H G Y G Y N G K G P I M	440
1271	ttttatcaatgttactttctatttcggctcaaaagccaccgtcgtgaggatgactgcttc	1330
441	F Y Q G Y F L F G S N A T V A E D D G F	460
1331	aatcaacataagaaggagacaagtacttttactgcaggaaagaaaatgaaaagtatact	1390
461	N N N K K G D K Y F Y G R K E N E K Y I	480
1391	ccgtgcgcccaagaagatgtgaagtgcggtaggcttttttgcgataacaaaaagtaccoc	1450
481	P G A Q E D V K C G R L F C D N K K Y P	500
1451	tgtcattataattactcagaggatctcgaattcggcatggtgatcatggaaccaagtgt	1510
501	C H Y N Y S E D L D F G M V D H G T K C	520
1511	gctgatggaagtcgtttctaaacggcagtgctgtagatgtcaacgaagcgtataaatca	1570
521	A D G K V C S N R Q C V D V N E A Y K S	540
1571	Acaaccgtattttcgttaatt	1591
541	T T V F S L I	547

Fig. 2. The cDNA and deduced amino acid sequence of BjuSSMP-I. The deduced amino acid sequence is represented by one-letter code, with the cDNA sequence with 1540 pb encoded open reading frames the follow 547 amino acid residues: pre-pro-peptide, metalloprotease, residues determined by protein sequencer cysteine switch motif (PKMCGVT), a zinc-binding motif (HELGHNLGMEHD) disintegrin-like and a rich cysteine domain.

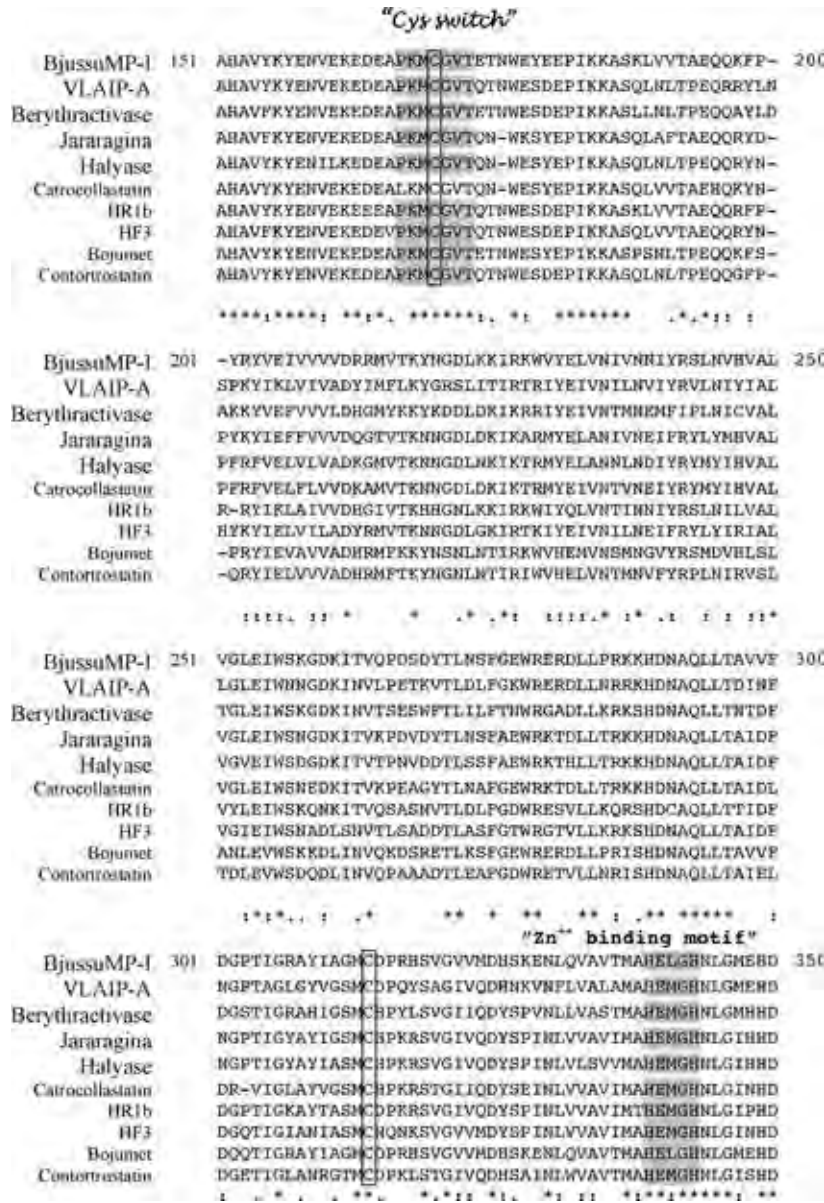


Fig. 3. (Continued)

to the gonad morphogenesis and cell adhesion in *C. elegans* [48,49]. In the main branch, there is an unequivocal relation between the SVMPs and others identified in different species (Drer-1, Xlae-1, Ggal-1, Mmus-1, Mmus-4, Hsap-4, and Hsap-5). Thus, despite all metalloproteases selected here are taking part in the reprotolysin family, some molecules from *Xenopus laevis*, *Danio rerio*, *Gallus gallus*, *Mus musculus*, and *Homo sapiens* are more related to the SVMPs than others. Based on this information, it was possible to classify the sequences in four groups (viperid SVMPs, elapid SVMPs, proto-SVMPs, and non-SVMPs), according to their phylogeny and phenotype (Fig. 4A). The sequences from Drer-1, Xlae-1, Ggal-1, Mmus-1, Mmus-4, Hsap-4, and Hsap-5 were classified as proto-SVMPs due to their phylogenetic relation with the SVMPs, since these sequences are in a monophyletic branch. The analysis of the phylogenetic tree shows that the evolutionary history of the proto-SVMPs began with a primitive gene

duplication which occurred before the emergence of the common ancestor of teleosts and tetrapods. Also is possible to conclude that new and independent duplication events occurred in mammals, birds, and teleosts, whereas it was not possible to find in the databases more than one reprotolysin isoform in the snake species. However, the lack of a complete snake genome sequence does not allow us to conclude whether reprotolysin isoforms are not present in these animals. Therefore, it is possible to suppose that mutations in a proto-SVMP of a snake ancestor can be responsible by the transformation of these domains with an endogenous function in a potent toxin, even though the lack of homologue sequences in other reptiles could be an obstacle for this hypothesis.

The second part of this phylogenetic analysis was executed with the catalytic domain sequences of all SVMPs selected in the NCBI and UniProt databases (Fig. 4B). As shown in the phylogenetic tree (Fig. 4B), it was not possible to arrange these

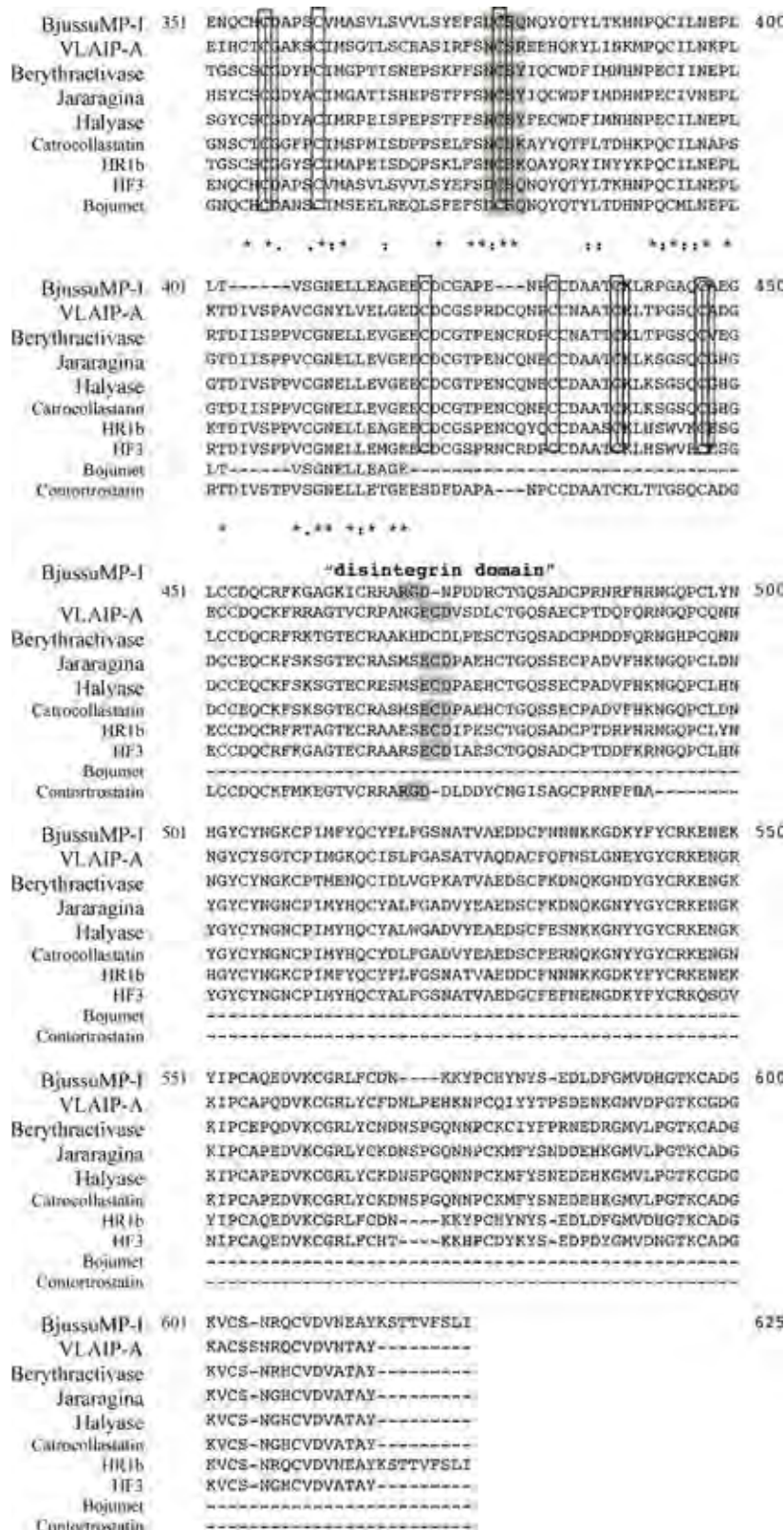


Fig. 3. (Continued).

metalloproteases in separated branches according to their capacity of inducing hemorrhage. Similarly, these results were also obtained by Ramos and Selistre-de-Araújo [21]. Analyzing this tree is also possible to suggest that the hemorrhagic activity

was a biochemical activity present in the first SVMPs due to the higher number of hemorrhagic toxin sequences obtained in the databases. Apparently, some of these toxins lost this activity during the process of molecular evolution of the SVMPs. The

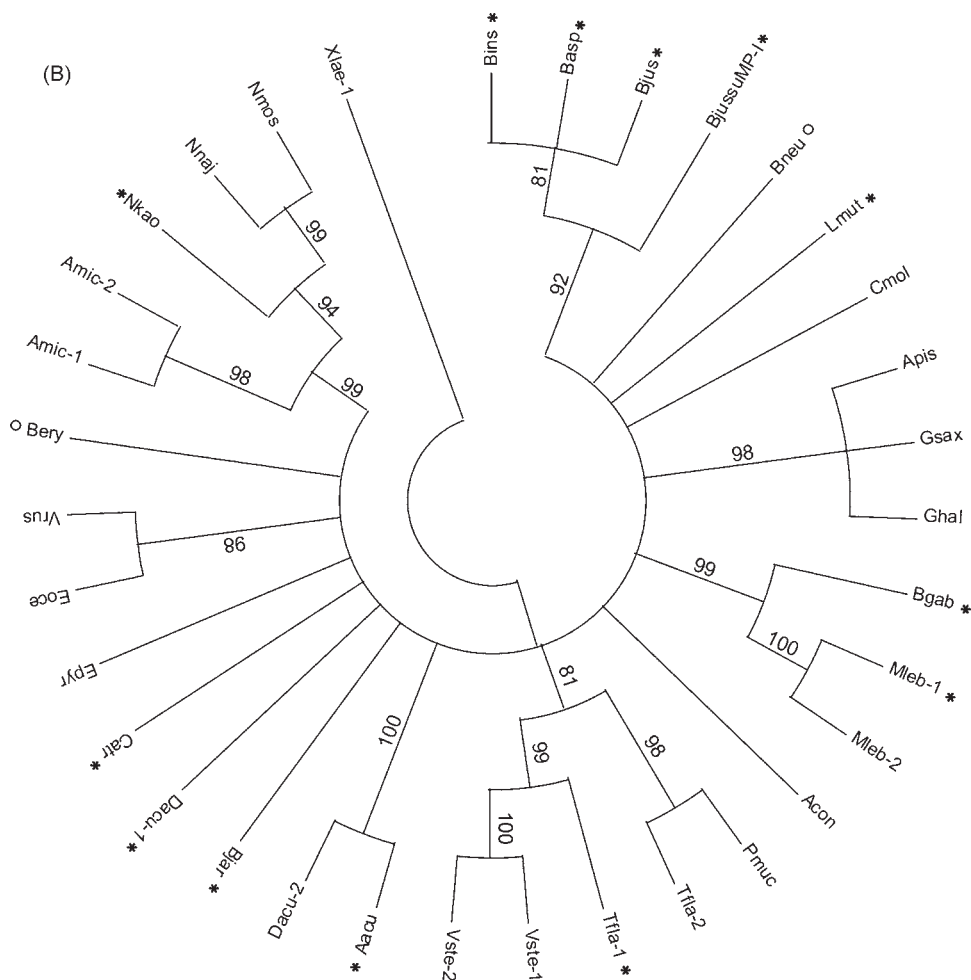


Fig. 4. (Continued).

catalytic domain sequences obtained from SVMPs. Therefore, the other domains from these toxins may present variations still more significant in relation to the nature of their biochemical and pharmacological activities.

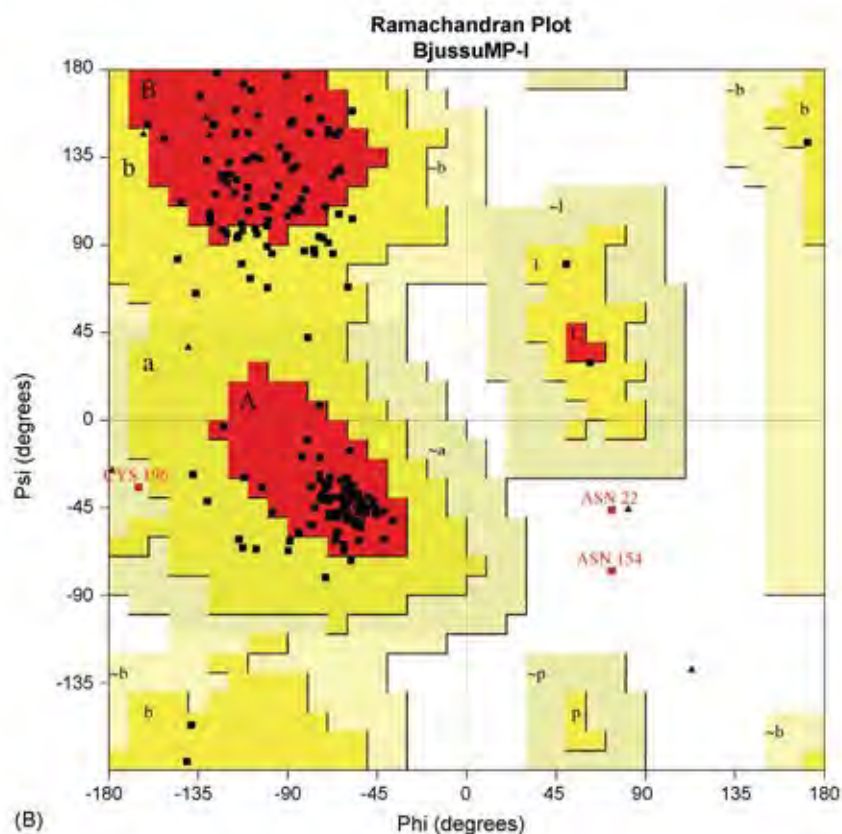
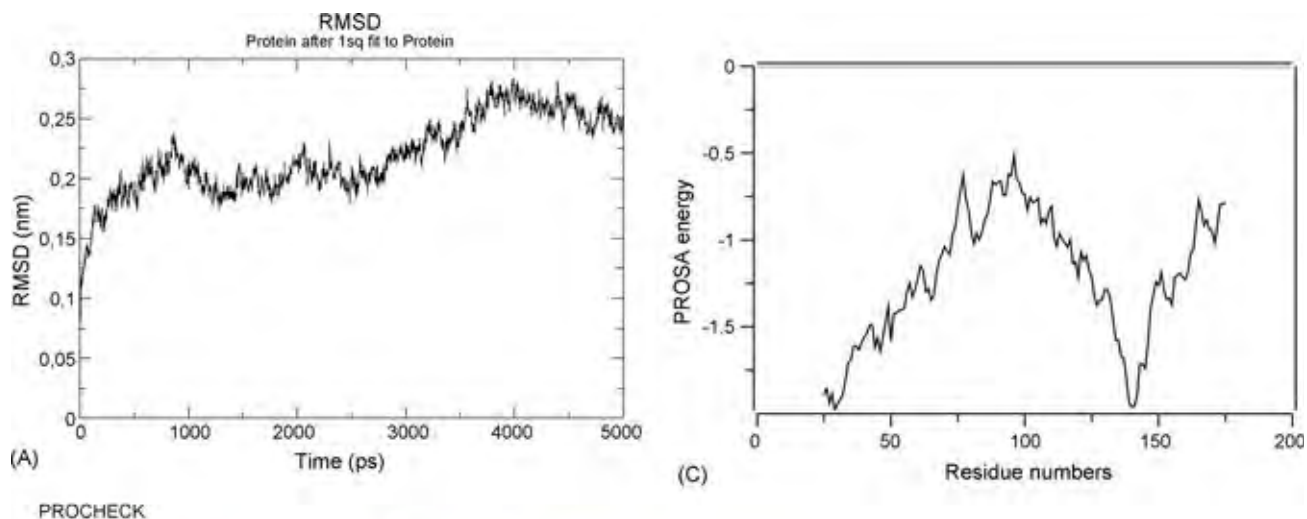
Finally, the SVMPs and some corresponding molecules present in other organisms have a close evolutionary relation. This connection makes these toxins good models for the investigation of adhesion, cell fusion, intracellular signaling and reproductive roles played by the metalloproteases in the metabolic pathways and physiology of different species, mainly in humans and other mammals.

3.4. *BjussuMP-I* catalytic domain theoretical model: modeling, molecular dynamics simulation and structural analysis

Initially, the primary sequence of the *BjussuMP-I* catalytic domain was utilized to build several alignments [27] based on a threading method of several homologue proteins deposited in structural databases. The structure of BaP1 (metalloproteinase from *Bothrops asper*) [28] was selected due to its identity degree with the *BjussuMP-I* catalytic domain sequence (71%) and in the score (442.93) attributed by the program HHpred

[27] to the alignment of these two sequences. BaP1 structure was used as template to build the initial model of the *BjussuMP-I* catalytic domain [29]. R.M.S.D. of the *BjussuMP-I* catalytic domain model was stabilized around 1500 ps during the molecular dynamics simulation (Fig. 5A). After the stabilization point, the atoms of the model suffered a slight variation in their positions of approximately 0.1 nm, which indicates the final model is stable and probably consistent. The Ramachandran plot [37] (Fig. 5B) shows 98.3% of the model residues are in the core and additionally allowed regions. Furthermore, the graph calculated by the program ProSa2003 [38] shows all residues have negative potential energies indicating the high stability degree of the model (Fig. 5C). Thus, all these results demonstrate the *BjussuMP-I* catalytic domain theoretical model is feasible.

The final model is very similar to other three-dimensional *BjussuMP-I* catalytic domains already described [25,50–52], presenting an ellipsoidal form and two subdomains. The major subdomain is constituted by the first 152 residues and presents four α -helices (h1, h2, h3, and h4) and six stranded β -sheets (β_1 , β_2 , β_3 , β_4 , β_5 , and β_6), while the last 98 residues belong to the minor subdomain, which is formed by one α -helix and several loops (Fig. 6A). However, the catalytic histidines show

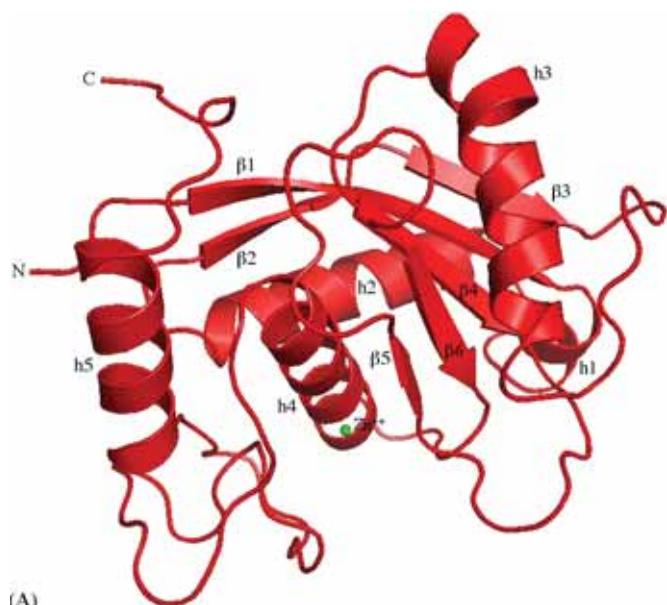


Plot statistics

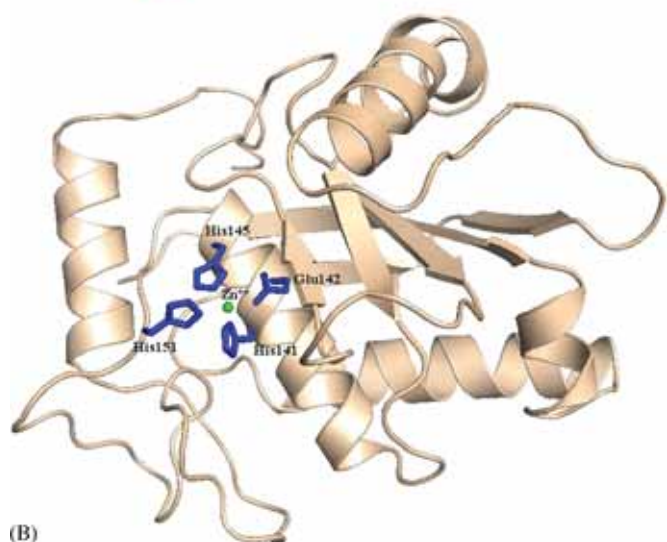
Residues in most favoured regions [A,B,L]	140	77.3%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	38	21.0%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	1	0.6%
Residues in disallowed regions	2	1.1%
Number of non-glycine and non-proline residues	181	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	3	
Number of glycine residues (shown as triangles)	10	
Number of proline residues	7	
Total number of residues	201	

Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.

Fig. 5. Molecular dynamics. (A) BjussuMP-I catalytic domain R.M.S.D. deviation during the molecular dynamics (MD) simulation. The stabilization of the structure occurred approximately in 500 ps. Generated by GROMACS [31]. (B) Ramachandran plot. Generated by the program PROCHECK v.3.5.4 [37]. (C) ProSa energy profile. Generated with the program Prosa [38].



(A)



(B)

Fig. 6. Structure of BjussuMP-I. (A) Secondary and tertiary structure of the final theoretical BjussuMP-I catalytic domain model. The ion Zn^{2+} is shown as a green sphere. Generated by the program PyMOL [40]. (B) Final theoretical BjussuMP-I catalytic domain model showing the side chains of the catalytic histidines as blue sticks. The ion Zn^{2+} is shown as in (A). Generated by the program PyMOL [40].

a good structural relation: His141 and His145 from h4 and His151 from the Met-turn (a conserved motif present in zinc-peptidases [53]) keep their imidazole rings in a favorable position to coordinate the catalytic zinc (Fig. 6B).

Structure–function relationships of some P-I metalloproteases have been identified in recent works [21,52]. These studies indicate that the differentiation between the hemorrhagic and non-hemorrhagic P-I metalloproteases can only be deduced by structural comparison. On this basis, the structural comparison between the theoretical catalytic domain of the BjussuMP-I, a P-III metalloprotease, and the other sequences selected in the databases was realized to understand the evolution of these molecules and to obtain hints about their biochemical activities. The program Chimera [39] was used to



Fig. 7. Ribbon representation of the final theoretical BjussuMP-I catalytic domain model showing the conservation degree between the residues of all sequences of metalloproteases selected in the databases. The regions more conserved are shown in magenta and those with a lower conservation are green. Generated with the program Chimera [39].

identify conserved residues of these molecules in the generated multiple sequence alignments, showing positions of these residues at the three-dimension structure of the sequences used. The analysis of the alignment of all metalloprotease catalytic domain sequences [39] showed few surface residues were conserved during the evolution, in contrast with the internal residues which remained practically unaltered (Fig. 7).

Additionally, the catalytic domain sequences from viperid and elapid SVMs and other homologue sequences were separated in four groups according to phylogeny and phenotype (see phylogenetic analysis) and aligned separately. The final theoretical BjussuMP-I catalytic domain model and the threading models built with the sequences of the mocarhagin 1 from *Naja mossambica mossambica* (Nmos) and two proteins from *Xenopus laevis* (an unknown protein (Xlae-1) and ADAM 13 (Xlae-2)) were compared using the program Chimera in order to identify the conserved residues present in these four specific alignments. An interesting feature was then revealed about the catalytic domain of the metalloproteases: each group presented a determined set of surface conserved residues. All sets are composed by surface conserved residues present in all sequences. However, there are additional surface conserved residues specifically found in each group. A common characteristic of the molecular surfaces of all metalloproteases aligned, which was not changed during the evolution history of these proteins, is the presence of large hydrophobic areas (data not shown). The independent degree of conservation of these hydrophobic areas suggests that this biochemical architecture was an important factor in the adaptation of the cellular metalloproteases as toxins. It is likely the apolar surfaces present in the substrates of the primitive intracellular metalloproteases keep a high similarity with the proteins attacked by these toxins, particularly in the case of the hemorrhagic SVMs. However, the most remarkable structural difference between the catalytic domains of the metalloproteases seems to be related to the type and number of the specific

Table 2
Specific conserved surface residues present in the groups of metalloproteases

	SVMPs			
	Viperid SVMPs	Elapid SVMPs	Proto-SVMPs	Non-SVMPs
Specific conserved surface residues	14	56	13	14
Specific positive-charged conserved surface residues	2	8	5	1
Specific negative-charged conserved surface residues	–	5	2	2

Results obtained by the program Chimera [39].

electrostatically charged surface residues present in each group (Table 2 and Fig. 8). This fact shows these charged surface residues may play an important role in the specific biochemical reactions executed by each group of metalloproteases.

Another interesting structural feature that could be a hint to explain the different biological roles of the SVMP catalytic domains and their more related sequences (proto-SVMPs) is found in the positions 15 and 21. In the viperid SVMP catalytic domains, these positions are occupied by positive-charged surface conserved residues (Arg15 or His15 and Lys20), whereas in the proto-SVMPs these positions are occupied only by non-charged residues (Ala15 and Phe20). The elapid SVMPs sequences also present a clear predominance of

positive-charged residues at these same positions. Thus, these positive-charged residues may be essential for the biochemical functions played only by the SVMPs.

In conclusion, interesting structural features were identified for the SVMPs and their more related metalloproteases: these molecules are characterized by the presence of large hydrophobic areas and group-specific charged conserved residues (mainly positive-charged residues) at their surfaces. Therefore, these characteristics are probably important for the interaction between these toxins and their substrates. Site-specific mutagenesis and expression experiments with the replacement of the group-specific surface residues conserved in these proteins could help to confirm this theory.

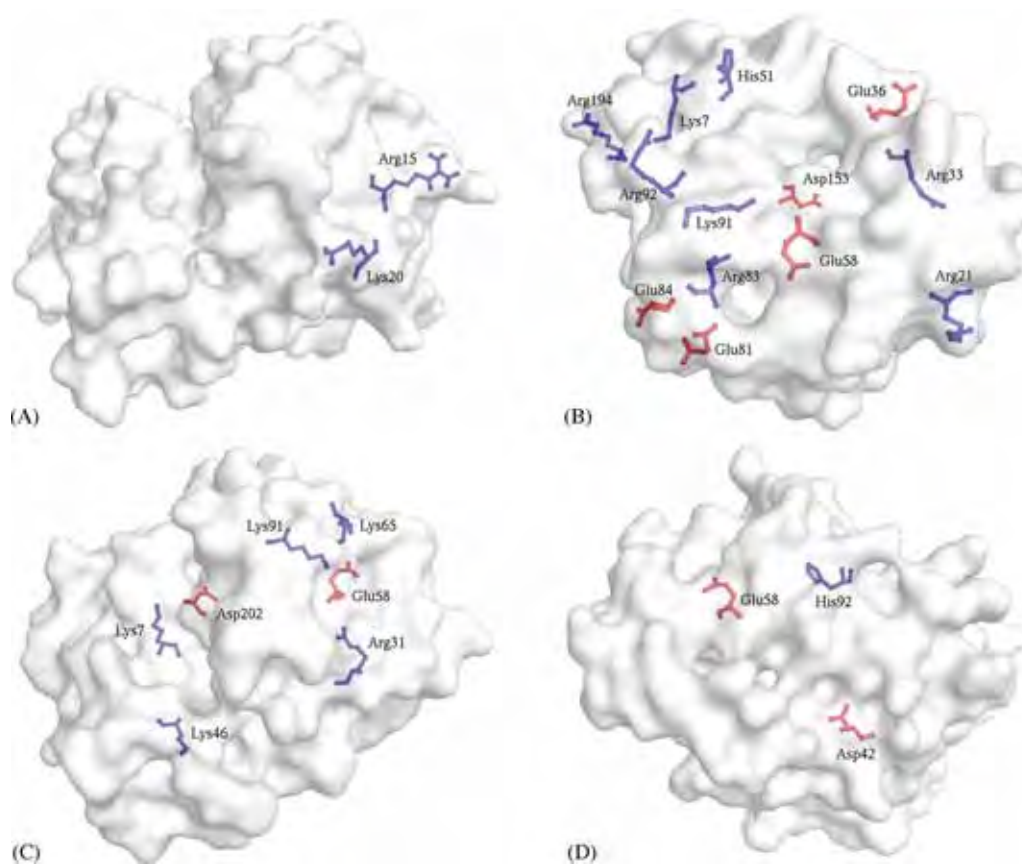


Fig. 8. Specific surface charged residues of the catalytic domains from the metalloproteases classified as viperid SVMPs, elapid SVMPs, proto-SVMPs, and non-SVMPs (respectively labeled as A, B, C, and D). The structures used for the identification (residue number) and localization of the conserved surface residues were the final theoretical B_jssuMP-I catalytic domain model (viperid SVMPs), and threading models of the mocarhagin 1 from *Naja mossaibica mossaibica* (Nmoc) (elapid SVMPs) and two sequences from *Xenopus laevis* (an unknown protein (Xlae-1) (proto-SVMPs) and ADAM 13 (Xlae-2) (non-SVMPs)). The positive and negative charged residues are shown, respectively, as blue and red sticks. The conserved residues were identified with the program Chimera [39] and the figures were generated with PyMOL [40].

Acknowledgements

The authors express their gratitude to the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the financial support. We are grateful to Danilo Menaldo (TT-USP) for his helpful technical collaboration.

References

- [1] T. Matsui, Y. Fujimura, K. Titani, Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis, *Biochim. Biophys. Acta* 1477 (2000) 146–156.
- [2] J.B. Bjarnason, J.W. Fox, Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms, *Pharm. Ther.* 62 (1994) 325–372.
- [3] J.M. Gutiérrez, A. Rucavado, Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage, *Biochimie* 82 (2000) 841–850.
- [4] C.A. Silva, J.P. Zuliani, M.T. Assakura, R. Mentele, A.C.M. Camargo, C.F.P. Teixeira, S.M.T. Serrano, Activation of $\alpha_M\beta_2$ -mediated phagocytosis by HF3, a P-III class metalloproteinase isolated from the venom of *Bothrops jararaca*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322 (2004) 950–956.
- [5] J.M. Gutiérrez, A. Rucavado, T. Escalante, C. Díaz, Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage, *Toxicon* 45 (2005) 997–1077.
- [6] 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.
- [7] A.S. Kamiguti, C.R.M. Hay, R.D.G. Theakston, M. Zuzel, Insights into mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases, *Toxicon* 34 (1996) 627–642.
- [8] F.S. Markland, Snake venoms and the hemostatic systems, *Toxicon* 36 (1998) 149–180.
- [9] I.M.B. Francischetti, H.C. Castro, R.B. Zingali, C.R. Carlini, J.A. Guimarães, *Bothrops* sp. Snake venoms: comparison of some biochemical and physicochemical properties and interference in platelet functions, *Comp. Biochem. Physiol.* 119 (1998) 21–29.
- [10] J. White, Snake venoms and coagulopathy, *Toxicon* 45 (2005) 951–967.
- [11] N. Marsh, V. Williams, Practical applications of snake venom toxins in haemostasis, *Toxicon* 45 (2005) 1171–1181.
- [12] R.K. Andrews, M.C. Berndt, Snake venom modulators of platelet adhesion receptors and their ligands, *Toxicon* 38 (2000) 775–791.
- [13] R.K. Andrews, A.S. Kamiguti, O. Berlanga, M. Leduc, R.D.G. Theakston, S.P. Watson, The use of snake venom toxins as tools to study platelet receptors for collagen and von Willebrand factor, *Haemostasis* 31 (2001) 155–172.
- [14] L.C. Wijeyewickrema, M.C. Berndt, R.K. Andrews, Snake venom probes of platelet adhesion receptors and their ligands, *Toxicon* 45 (2005) 1051–1060.
- [15] K. Trummal, K. Tõnismägi, E. Siigur, A. Aaspõllu, A. Lopp, T. Sillat, R. Saat, L. Kasak, I. Tammiste, P. Kogerman, N. Kalkkinen, J. Siigur, A novel metalloprotease from *Vipera lebetina* venom induces human endothelial cell apoptosis, *Toxicon* 46 (2005) 46–61.
- [16] M.J. Paine, H.P. Desmond, R.D.G. Theakston, J.M. Crampton, Purification, cloning and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloproteinase, jararagin from *Bothrops jararaca* venom. Insights into the disintegrin gene family, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 22869–22876.
- [17] A.S. Kamiguti, F.S. Markland, Q. Zhou, R.D.G. Theakston, M. Zuzel, Proteolytic cleavage of the β_1 subunit of platelet $\alpha_2\beta_1$ integrin by the metalloproteinase jararhagin compromises collagen-stimulated phosphorylation of pp72^{syk}, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 32599–32605.
- [18] A.S. Kamiguti, A.M. Moura-da-Silva, G.D. Laing, T. Knapp, M. Zuzel, J.M. Crampton, R.D.G. Theakston, Collagen-induced secretion-dependent phase of platelet aggregation is inhibited by snake venom metalloproteinase jararhagin, *Biochim. Biophys. Acta* 1335 (1997) 209–217.
- [19] W.J. Fox, S.M.T. Serrano, Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M 12 reprolysin family of metalloproteinases, *Toxicon* 45 (2005) 969–985.
- [20] M.R. Cominetti, J.U. Ribeiro, J.W. Fox, H.S. Selistre-de-Araújo, BaG, a new dimeric metalloproteinase/disintegrin from *Bothrops alternatus* that interacts with $\alpha_5\beta_1$ integrin, *Arch. Biochem. Biophys.* 416 (2003) 171–179.
- [21] O.H.P. Ramos, H.S. Selistre-de-Araújo, Comparative analysis of the catalytic domain of hemorrhagic and non-hemorrhagic snake venom metalloproteinases using bioinformatic tools, *Toxicon* 44 (2004) 529–538.
- [22] M.V. Mazzi, S. Marcussi, G.B. Carlos, R.G. Stabeli, J.J. Franco, F.K. Ticli, A.C. Cintra, S.C. Franca, A.M. Soares, S.V. Sampaio, A new hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom: isolation and biochemical characterization, *Toxicon* 44 (2004) 215–223.
- [23] S.H. Andrião-Escarso, A.M. Soares, M.R.M. Fontes, A.L. Fuly, F.M. 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.
- [24] D.P.S. Leitão, A.C.M. Polizello, Z. Rothschild, Coagulation and fibrinolysis in capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*), a close relative of guinea-pig (*Cavia porcellus*), *Comp. Biochem. Physiol.* 125A (2000) 113–120.
- [25] J.D. Thompson, T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, D.G. Higgins, The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools, *Nucl. Acids Res.* 24 (1997) 4876–4882.
- [26] S. Kumar, K. Tamura, I.B. Jakobsen, M. Nei, MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software, *Bioinformatics* 17 (2001) 1244–1245.
- [27] J. Söding, A. Biegert, A.N. Lupas, The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction, *Nucl. Acids Res.* 33 (2005) 244–248.
- [28] L. Watanabe, J.D. Shannon, R.H. Valente, A. Rucavado, A. Alape-Giron, A.S. Kamiguti, R.D. Theakston, J.W. Fox, J.M. Gutierrez, R.K. Arni, Amino acid sequence and crystal structure of BaP1, a metalloproteinase from *Bothrops asper* snake venom that exerts multiple tissue-damaging activities, *Protein Sci.* 12 (2003) 2273–2281.
- [29] 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.
- [30] J. Shi, T.L. Blundell, K. Mizuguchi, FUGUE: sequence-structure homology recognition using environment-specific substitution tables and structure-dependent gap penalties, *J. Mol. Biol.* 310 (2001) 243–257.
- [31] H.J.C. Berendsen, D. van der Spoel, R. van Drunen, GROMACS: a message-passing parallel molecular dynamics implementation, *Comp. Phys. Commun.* 91 (1995) 43–56.
- [32] E. Lindahl, B. Hess, R. van der Spoel, GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis, *J. Mol. Mod.* 7 (2001) 306–317.
- [33] 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.
- [34] 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.
- [35] H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postma, A. DiNola, J.R. Haak, Molecular dynamics with coupling to an external bath, *J. Chem. Phys.* 81 (1984) 3684–3690.
- [36] C. Andreini, L. Banci, I. Bertini, S. Elmi, A. Rosato, Comparative analysis of the ADAM and ADAMTS families, *J. Prot. Res.* 4 (2005) 881–888.
- [37] R.A. Laskowski, M.W. MacArthur, D.S. Moss, J.M. Thornton, PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Cryst.* 26 (1993) 283–291.
- [38] M.J. Sippl, Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins, *Proteins* 17 (1993) 355–362.

- [39] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin, UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis, *J. Comput. Chem.* 25 (2004) 1605–1612.
- [40] W.S. Delano, The PyMOL Molecular Graphics System, Delano Scientific, San Carlos, CA, 2002, <http://www.pymol.org>.
- [41] S. Swenson, F.S. Markland Jr., Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes, *Toxicon* 45 (2005) 1021–1039.
- [42] C.F. Toombs, Alfimeprase: pharmacology of a novel fibrinolytic metalloproteinase for thrombolysis, *Haemostasis* 31 (2001) 141–147.
- [43] R.O. Hynes, Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion, *Cell* 69 (1992) 11–25.
- [44] W.J. Wang, C.H. Shi, T.F. Huang, Primary structure and antiplatelet mechanism of a snake venom metalloproteinase, acurhagin, from *Agkistrodon acutus* venom, *Biochimie* 87 (2005) 1065–1077.
- [45] J.J. Calvete, M.P. Moreno-Murciano, L. Sans, M. Jurgens, M. Schrader, M. Raida, D.C. Benjamin, J.W. Fox, The disulfide bond pattern of catrocolastin C, a disintegrin-like/cysteine-rich protein isolated from *Crotalus atrox* venom, *Protein Sci.* 9 (2000) 1365–1373.
- [46] A.S. Kamiguti, M. Zuzel, R.D.G. Theakston, Snake venom metalloproteinases and disintegrins: interactions with cells, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31 (1998) 853–862.
- [47] W.-J. Wang, C.-H. Shih, T.-F. Huang, Primary structure and antiplatelet mechanism of a snake venom metalloproteinase, acurhagin, from *Agkistrodon acutus* venom, *Biochimie* 87 (2002) 1065–1077.
- [48] Y. Kubota, R. Kuroki, K. Nishiwaki, A fibulin-1 homolog interacts with an ADAM protease that controls cell migration in *C. elegans*, *Curr. Biol.* 14 (2004) 2011–2018.
- [49] B. Podbilewicz, ADM-1, a protein with metalloprotease- and disintegrin-like domains, is expressed in syncytial organs, sperm, and sheath cells of sensory organs in *Caenorhabditis elegans*, *Mol. Biol. Cell* 7 (1996) 1877–1893.
- [50] X. Zhu, M. Teng, L. Niu, Structure of acutolysin-C, a haemorrhagic toxin from the venom of *Agkistrodon acutus*, providing further evidence for the mechanism of the pH-dependent proteolytic reaction of zinc metalloproteinases, *Acta Crystallogr.* 55D (1999) 1834–1841.
- [51] K.F. Huang, S.H. Chiou, T.P. Ko, J.M. Yuann, A.H. Wang, The 1.35 Å structure of cadmium-substituted TM-3, a snake-venom metalloproteinase from Taiwan habu: elucidation of a TNF-converting enzyme-like active-site structure with a distorted octahedral geometry of cadmium, *Acta Crystallogr.* 58D (2002) 1118–1128.
- [52] L. Watanabe, J.D. Shannon, R.H. Valente, A. Rucavado, A. Alape-Girón, A.S. Kamiguti, R.D.G. Theakston, J.W. Fox, J.M. Gutiérrez, R.K. Arni, Amino acid sequence and crystal structure of BaP1, a metalloproteinase from *Bothrops asper* snake venom that exerts multiple tissue-damaging activities, *Protein Sci.* 12 (2003) 2273–2281.
- [53] W. Stöcker, F. Grams, U. Baumann, P. Reinemer, F.X. Gomis-Ruth, D.B. McKay, W. Bode, The metzincins-topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases, *Protein Sci.* 4 (1995) 823–840.