



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
Câmpus de São José do Rio Preto

**MAGNO MASSOLINO VIÇOTI**

**ESTUDOS CONFORMACIONAIS DE DIVERSAS PROTEÍNAS EM SOLUÇÃO  
UTILIZANDO A TÉCNICA DE ESPALHAMENTO DE RAIOS-X À BAIXO  
ÂNGULO – SAXS.**

Tese apresentada ao Departamento de Física, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE – da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, para a obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular.

Orientador: Prof. Dr. José Ramon Beltran Abrego

**São José do Rio Preto – SP**  
**2009**

## ERRATA

Folha	Gráfico	Onde se lê (eixo x)	Leia-se (eixo x)
53	g) LTA pH 7,6	$q^4$	$q^4 \text{ \AA}^{-4}$

## **MAGNO MASSOLINO VIÇOTI**

Estudos conformacionais de diversas proteínas em solução utilizando a técnica de espalhamento de raios-X a baixo ângulo - SAXS

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular, área de Biofísica Molecular junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

### **BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. José Ramon Beltran Abrego  
Professor Assistente Doutor  
UNESP – São José do Rio Preto  
Orientador

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Yvonne Primerano  
Mascarenhas  
Professor Doutor  
Universidade de São Paulo – USP – São Carlos

Prof. Dr. Dimas Roberto Vollet  
Professor Adjunto Doutor  
UNESP – Rio Claro

Prof. Dr. João Ruggiero Neto  
Professor Titular Doutor  
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Johnny Rizzieri Olivieri  
Professor Pesquisador Doutor  
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 18 de maio de 2009

*À Ligia Maria, por todos os nossos momentos.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Dr. José Ramon Beltran Abrego, pela oportunidade de crescimento pessoal, pela amizade e pela orientação na elaboração deste trabalho.

Aos meus pais, Antonio Celso Baggio e Regina Aparecida Massolino, por acreditarem e me apoiarem nos momentos difíceis. E ao meu sobrinho e afilhado Níckolas, que é um presente de Deus que veio nos abençoar com sua alegria.

Aos professores do Departamento de Física do IBILCE, em especial Dr. João Ruggiero e Dr. Jorge Chahine, por acreditarem na elaboração deste trabalho.

Ao professor Raghuvir Krishnaswamy Arni, por permitir a utilização de seus laboratórios, pela amizade e pela colaboração na execução deste trabalho.

A todos os colegas do Departamento de Física do IBILCE, em especial ao Mário Murakami, Diego Nolasco, Sandro Zela, Priscila Tosqui, Pepeu, André Martins, Ricardão, Ricardinho, Gisele, Fernandinha, Fernando, Daniela e Denise, pela amizade e muitas risadas juntos...

À todos os funcionários do IBILCE, em especial aos funcionários do Departamento de Física, Paulinho, Barbosa e Marcelino, pelas longas discussões futebolísticas e pelo apoio técnico nos equipamentos utilizados para a elaboração desta tese. E à secretária Ilva, pela paciência.

*“O mistério é a coisa mais nobre de que podemos ter experiência. É a emoção que se encontra no cerne da verdadeira ciência. Aquele que não sente essa emoção e que não pode mais maravilhar nem se espantar, é como se já estivesse morto. Saber que aquilo que é impenetrável para nós verdadeiramente existe e se manifesta como a mais alta sabedoria e a mais radiosa beleza, que nossas limitadas faculdades só podem entender em suas formas mais primitivas, esse conhecimento, esse sentimento, está no centro de toda verdadeira devoção. A experiência cósmica é, com efeito, o mais poderoso e mais nobre pivô da pesquisa científica.”*

Albert Einstein

## RESUMO

A técnica de espalhamento de raios-X a baixo ângulo – SAXS é uma poderosa ferramenta para a caracterização de macromoléculas biológicas em solução. Aplicando-a de forma correta podemos obter parâmetros físicos à respeito do material de estudo, como raio de giração, máxima dimensão, volume e superfície.

Neste trabalho caracterizou-se em solução aquosa a macromolécula heterodimérica crotoxina com a variação do pH em ácido, básico e neutro. Esta proteína foi isolada da serpente sul-americana *Crotalus durissus terrificus* e seus constituintes crotapotina e fosfolipase A<sub>2</sub> também foram caracterizados isoladamente. Os parâmetros físicos obtidos foram confrontados com trabalhos realizados anteriormente. Propôs-se um modelo de coordenadas atômicas obtido por modelagem e dinâmica molecular.

Realizamos a análise estrutural das macromoléculas homólogas *Bothropstoxin – I* e *Bothropstoxin – II* isoladas da serpente sul-americana *Bothrops jararacussu*, indicando que os estados oligoméricos estão ambos em bom acordo com os resultados obtidos pelo seu estado cristalino.

*Lotus tetragonolobus lectin* (LTA) é uma lectina ligante específica de açúcar fucose de origem das leguminosas. O estudo do estado cristalino desta proteína revela uma diferente disposição dos monômeros no tetrâmero, este que é composto por dímeros em um novo modo arranjar-se, formando assim uma nova estrutura tetramérica a qual foi confirmado pela investigação da estrutura quaternária da função envelope disposto pela análise das curvas de SAXS, comparadas e sobrepostas à estrutura das coordenadas atômicas determinada por cristalografia.

A corismato sintase (CS) é a sétima enzima da via shikimato para a síntese de aminoácidos aromáticos, em fungos, bactérias e parasitas tais como o causador da tuberculose, porém, em mamíferos esta via é ausente. A estrutura da função envelope foi determinada revelando uma estrutura de tetrâmero em solução que também foi verificada pela análise cristalográfica. Os nossos resultados estão em bom acordo comparando os dados físicos obtidos das curvas de SAXS e os resultados do estudo do modelo cristalográfico, juntamente com a sobreposição dos modelos *ab initio* com as coordenadas atômicas.

## ABSTRACT

The technique of small angle X-ray scattering - SAXS is a powerful tool for characterization of biological macromolecules in solution. Applying it correctly so we can get physical with respect to materials, such as radius of gyration, maximum size, volume and surface area.

This work was characterized in aqueous solution macromolecule heterodimeric crotoxina with the change in pH in acid, basic and neutral. This protein was isolated from the South American snake *Crotalus durissus terrificus* and its constituents crotopotina and phospholipase A2 were also characterized in isolation. The physical parameters were confronted with work done previously. Propose is a model of atomic coordinates obtained by modeling and molecular dynamics.

We performed the structural analysis of macromolecules Bothropstoxin counterparts - and I Bothropstoxin - II isolated from South American snake *Bothrops jararacussu*, indicating that the states are oligomers both in good agreement with results obtained by its crystalline state.

Lotus tetragonolobus lectin (LTA) is a lectin binding specific sugar fucose of origin of legumes. The study of the crystalline state of this protein shows a different arrangement of monomers in the tetramer, that is composed of dimers in a new way get it, thus forming a new tetrameric structure which was confirmed by investigation of the quaternary structure of the envelope function provided by analysis of SAXS curves, and compared to the overlapping structure of atomic coordinates determined by crystallography.

The chorismato synthase (CS) is the seventh enzyme of shikimate route for the synthesis of aromatic amino acids in fungi, bacteria and parasites such as the cause of tuberculosis, but in mammals this pathway is absent. The structure of the envelope function was determined revealing a structure of tetramer in solution was also verified by crystallographic analysis. Our results are in good agreement comparing the physical data obtained from the SAXS curves and the results of the model Crystallographic with the overlap of the ab initio models with the atomic coordinates.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- § ADP = Adenosina difosfato
- § ATP = Adenosina trifosfato.
- § BthTX-I = *botropstoxin I*.
- § BthTX-II = *botropstoxin II*.
- § CS = *Corismato Sintase*.
- § D.S.P = Detector Sensível a Posição.
- §  $D_{Máx}$  = Máxima Dimensão.
- § LNLS = Laboratório Nacional de Luz Sincrotron.
- § LTA = *Lotus tetragonolobus lectin*.
- § MPV = *Most Populated Volume*.
- §  $NAD^+$  = Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (forma oxidada).
- § NADH = Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (forma reduzida).
- § NADPH = Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (forma reduzida).
- § NSD = *Normalized Spatial Discrepancy*.
- § PDB = *Protein Data Bank*.
- § PEG = Polietilenoglicol.
- § pH = Potencial hidrogeniônico.
- §  $P_i$  = Ortofosfato orgânico.
- § pI = ponto isoelétrico.
- §  $PLA_2$  = Fosfolipase tipo  $A_2$ .
- §  $PP_i$  = Pirofosfato inorgânico.
- § PRPP = 5-fosforribosil-1-pirofosfato.
- §  $R_g$  = Raio de Giração.
- § S = Superfície externa.
- § SAXS = Small Angle X-ray Scattering (sigla inglesa para espalhamento de raios-X a baixo ângulo).
- § TSR = *Total Spread Region*.
- §  $V_h$  = Volume de hidratação.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Via para o corismato. ....*Página 3.*
- Figura 2:** Síntese da fenilalanina e tirosina.....*Página 5.*
- Figura 3:** Síntese do triptofano. ....*Página 5.*
- Figura 4:** Espalhamento através de dois pontos centrais ou espalhamento de uma simples partícula. ....*Página 13.*
- Figura 5:** Representação da função  $V(r)$ .....*Página 18.*
- Figura 6:** O gráfico acima mostra um resumo das leis de Guinier e Porod.....*Página 20.*
- Figura 7:** Desenho esquemático da fonte de raios-X anodo rotatório. ....*Página 28.*
- Figura 8:** Esquema do sistema de colimação Kratky.....*Página 28.*
- Figura 9:** Diagrama mostrando a geometria da câmara de colimação pontual (fonte de luz Síncrotron). ....*Página 30.*
- Figura 10:** Esquema do detector sensível à posição e sua eletrônica. ....*Página 31.*
- Figura 11:** Curva de calibração do detector.....*Página 33.*
- Figura 12:** Gráfico da estabilidade do feixe (tempo x intensidade).....*Página 35.*
- Figura 13:** Gráfico do perfil horizontal do feixe. ....*Página 36.*
- Figura 14:** Gráfico do perfil vertical do feixe.....*Página 38.*
- Figura 15:** Invariante Q. ....*Página 42.*

<b>Figura 16:</b> Medidas experimentais de SAXS. ....	<b>Página 48.</b>
<b>Figura 17:</b> Curvas de intensidade de espalhamento.....	<b>Página 49.</b>
<b>Figura 18:</b> Curvas de intensidade de espalhamento normalizadas e extrapoladas a concentração 0 mg/ml. ....	<b>Página 50.</b>
<b>Figura 19:</b> Gráfico da região de Guinier.....	<b>Página 52.</b>
<b>Figura 20:</b> Gráfico da região de Porod. ....	<b>Página 54.</b>
<b>Figura 21:</b> Curvas experimentais corrigidas. ....	<b>Página 56.</b>
<b>Figura 22:</b> Gráfico da função de distribuição de distancia $p(r)$ vs $r$ . ....	<b>Página 57.</b>
<b>Figura 23:</b> Modelo tridimensional de átomos dummys da função envelope da estrutura quaternária da proteína <u>BhtX-I</u> pH 7,0. ....	<b>Página 58.</b>
<b>Figura 24:</b> Modelo tridimensional de átomos dummys da função envelope da estrutura quaternária da proteína <u>Crotoxina</u> pH 3.....	<b>Página 60.</b>
<b>Figura 25:</b> Modelo tridimensional de átomos dummys da função envelope da estrutura quaternária da proteína <u>Crotoxina</u> pH 6,6.....	<b>Página 60.</b>
<b>Figura 26:</b> Modelo tridimensional de átomos dummys da função envelope da estrutura quaternária da proteína <u>Crotoxina</u> pH 10,0.....	<b>Página 61.</b>
<b>Figura 27:</b> Sobreposição do modelo da função envelope determinado por SAXS e a estrutura modelada da crotoxina no pH 6,6. ....	<b>Página 63.</b>
<b>Figura 28:</b> Modelo tridimensional de átomos dummys da função envelope da estrutura quaternária da proteína <u>Fosfolipase A<sub>2</sub></u> pH 7. ....	<b>Página 64.</b>
<b>Figura 29:</b> Modelo tridimensional de átomos dummys da função envelope da estrutura quaternária da proteína <u>Crotapotina</u> pH 7,0.....	<b>Página 64.</b>
<b>Figura 30:</b> Sobreposição dos modelos tridimensionais da estrutura quaternária da proteína <u>LTA</u> pH 7,5.....	<b>Página 65.</b>
<b>Figura 31:</b> Modelo tridimensional de átomos dummys da função envelope da estrutura quaternária da proteína <u>BthTX-II</u> pH 7,0.....	<b>Página 66.</b>

**Figura 32:** Modelo Corismato Sintase (CS) pH 7,5. ....*Página 68.*

**Figura 33:** Gel de Eletroforese (SDS-PAGE).....*Página 71.*

## LISTA DE TABELAS

**Tabela I:** Valores da linearidade do detector. ....*Página 33.*

**Tabela II:** Valores do perfil horizontal do feixe. ....*Página 37.*

**Tabela III:** Resumo dos valores resultantes dos experimentos de SAXS. ....*Página 70.*

## SUMÁRIO

I.	OBJETIVOS-----	1
II.	INTRODUÇÃO -----	2
	1. Corismato Sintase -----	2
	2. Crotoxina -----	5
	3. Bothrops Toxin -----	7
	4. Lotus Tetragonolobus -----	9
	<i>Teoria da Técnica de SAXS</i> -----	12
	1. O Espalhamento-----	13
	2. Interferências -----	13
	3. Espalhamento nos pequenos ângulos -----	15
	4. Função de correlação-----	16
	5. Aproximação de Guinier-----	18
	6. Lei de Porod -----	19
	7. Volume -----	21
	8. Superfície -----	21
	<i>Teoria e Métodos Computacionais</i> -----	22
	1. GNOM -----	22
	2. DAMMIM -----	23
	3. DAMAVER -----	24
	4. CRY SOL -----	27
III.	MATERIAIS E MÉTODOS -----	28
	1. Sistema de Colimação Kratky -----	28
	2. Monocromatização -----	29
	3. Colimação Fonte Sincrotron -----	29
	4. Detector -----	30
	<i>Calibração do Sistema de Raios-X Anôdo Rotatório</i> -----	32
	1. Alinhamento da Câmara de Kratky -----	32
	2. Linearidade do Detector -----	32
	3. Estabilidade do feixe de Raios-X Anôdo Rotatório -----	35
	4. Perfil do Feixe e Correção Geométrica-----	35
	5. Normalização e Extrapolação das Curvas a Concentração Zero -----	39
	6. Cálculo do Volume e da Superfície-----	41

<i>Preparação das Amostras</i> -----	44
1. Bothrops Toxin I e II-----	44
2. Lotus Tetragonolobus Lectin (LTA)-----	44
3. Corismato Sintase (CS) -----	44
4. Crotoxina -----	45
5. Fosfolipase e Crotapotina -----	45
<i>Eletroforese</i> -----	46
IV. RESULTADOS E DISCUSSÕES-----	47
1. Bothrops Toxin I -----	58
2. Crotoxina -----	61
3. Lotus Tetragonolobus lectin (LTA)-----	65
4. Bothrops Toxin II -----	67
5. Corismato Sintase -----	68
<i>Eletroforese</i> -----	71
V. CONCLUSÃO -----	72
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	74
VII. TRABALHOS PUBLICADOS-----	83
VIII. ARTIGOS – ANEXO -----	84

## I. OBJETIVOS

Esta tese teve como objeto de estudo macromoléculas biológicas em solução denominadas de proteínas, que são divididas em famílias das quais nos atemos nas fosfolipases tipo A<sub>2</sub> de veneno de serpentes, lectina de plantas, corismato sintase e a crotoxina.

- § Investigar a macromolécula crotoxina proteína dimérica heterogênea, isolada do veneno bruto da serpente sul americana *Crotalus durissus terrificus*. Com a aplicação da técnica de SAXS caracterizar esta proteína, realizando o experimento em solução variando o pH em ácido, básico e neutro, juntamente com outra técnica como dinâmica molecular e modelagem propor um modelo tridimensional de coordenadas atômicas.
- § Estudar as fosfolipases (BthTX-I) e (BthTx-II) e suas mudanças interfaciais, caracterizando-as e auxiliando com a técnica de SAXS, propondo assim um modelo da função envelope para confrontar com as demais ferramentas de estudos estruturais, cristalografia, dinâmica molecular e modelagem molecular.
- § Pesquisar as proteínas CS e a LTA em solução e investigando assim as suas estruturas quaternárias e seus estados de oligomerização.
- § Adequar aos novos métodos de análise dos dados de SAXS dispostos no pacote de programas computacional chamado (ATSAS) desenvolvido por Svergun e colaboradores.

## II. INTRODUÇÃO

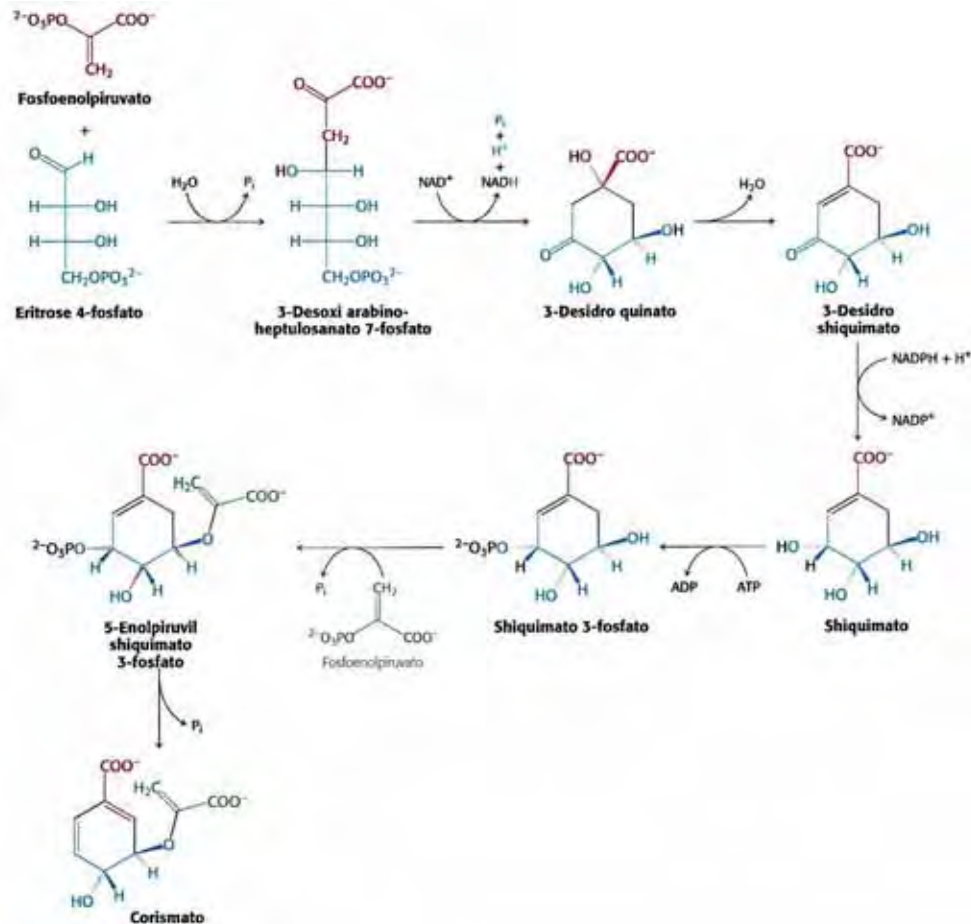
### 1. Corismato Sintase

Os aminoácidos essenciais, tais como, fenilalanina, triptofano e tirosina nos mamíferos são fornecidas basicamente pela dieta. Em bactérias, fungos, plantas e parasitas, estes aminoácidos aromáticos são sintetizados pela via shiquimato (Bentley, 1990; macheroux et al., 1999). Além disso, o shiquimato fornece a estes organismos os blocos básicos de construção para a síntese de outros compostos aromáticos necessários para diferentes funções como proteção UV, o transporte de elétrons, a sinalização, a absorção de ferro, etc. A etapa inicial onde a shiquimato é responsável pela condensação da D-eritrose-4-fosfato e fosfoenolpiruvato, para shiquimato e, posteriormente, ao corismato composto aromático dihidratado (Bentley, 1990; Dosselaere and Vanderleyden, 2001). A ausência de shiquimato em mamíferos tornou suas enzimas em potenciais alvos para o desenvolvimento de novas terapias infecciosas, tal como, a tuberculose (TB).

A tuberculose é a segunda causa de morte mais comum no mundo por doenças infecciosas, está atrás apenas da síndrome de imunodeficiência adquirida, isto faz com que seja considerado um sério desafio a saúde pública global no século 21. De acordo com um recente relatório elaborado pela OMS (Organização Mundial de Saúde), o número total de novos casos de TB no mundo em 2002 aumentou para cerca de 9 milhões de casos (Duncan, 2004; WHO, 2004), e que 2 a 3 milhões de pessoas vão a óbito, apesar da quimioterapia disponível (WHO, 2004). Estas mortes são principalmente em adultos jovens, mas também incluem cerca de 100.000 crianças menores de 5 anos (Gandy and Zumla, 2002). O principal motivo do aumento de casos de morte causados pela TB é a sua ação simultânea com o vírus da imunodeficiência humana, que tem um impacto devastador em algumas partes do mundo, tais como, as regiões Africanas (Duncan, 2004), assim, há uma necessidade urgente de novos inibidores de anti-micobactérias.

As enzimas de shiquimato são bons candidatos para o desenvolvimento de novas terapias contra a TB. Enzimas desta via metabólica apresentaram intensivos estudos estruturais (Azevedo et al., 2002; Basso et al., 2005, Pereira et al., 2003, 2004, Silveira et al., 2005). A condensação de fosfoenolpiruvato (um intermediário da glicólise) com eritrose 4-fosfato (um intermediário da via pentose fosfato). A ose resultante, em C<sub>7</sub> com cadeia aberta, perdem sua fosforila e se cicliza a 3-desidro quinato. Sua

desidratação gera então o 3-desidro shiquimato, que é reduzido pelo NADPH a shiquimato. A fosforilação do shiquimato pelo ATP produz 3-fosfo shiquimato, que se condensa com uma segunda molécula de fosfoenolpiruvato. Este intermediário 5-enolpiruvil perde sua fosforila, gerando corismato, o precursor comum de todos os três aminoácidos aromáticos (Figura 1).



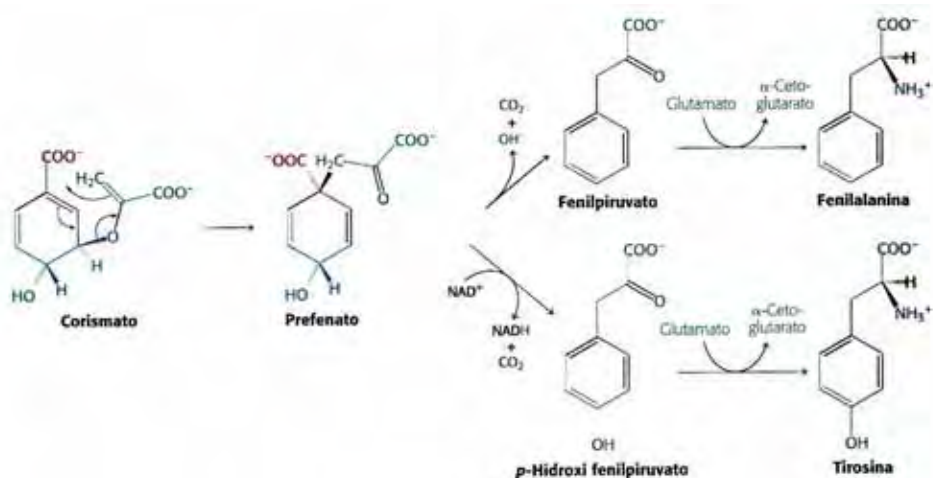
**Figura 1:** Via para o corismato. O corismato é um intermediário da biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano. (Stryer et al., 2004).

Ocorre uma bifurcação no corismato, onde uma mutase transforma o corismato em prefenato, mostrado na Figura 2. O precursor imediato do anel aromático de fenilalanina e tirosina. A desidratação seguida de descarboxilação produz fenilpiruvato. O prefenato pode sofrer descarboxilação oxidativa a p-hidroxi fenilpiruvato. Estes  $\alpha$ -cetoácidos sofrem reação de amida e são formados a fenilalanina e a tirosina. O ramo que começa com antranilato leva a síntese de triptofano (Figura 3). O corismato adquire uma amina da cadeia lateral da glutamina e libera piruvato, formando antranilato, este se condensa com 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP), uma forma ativa da ribose fosfato. O PRPP é também um intermediário na síntese da histidina e de nucleotídeos

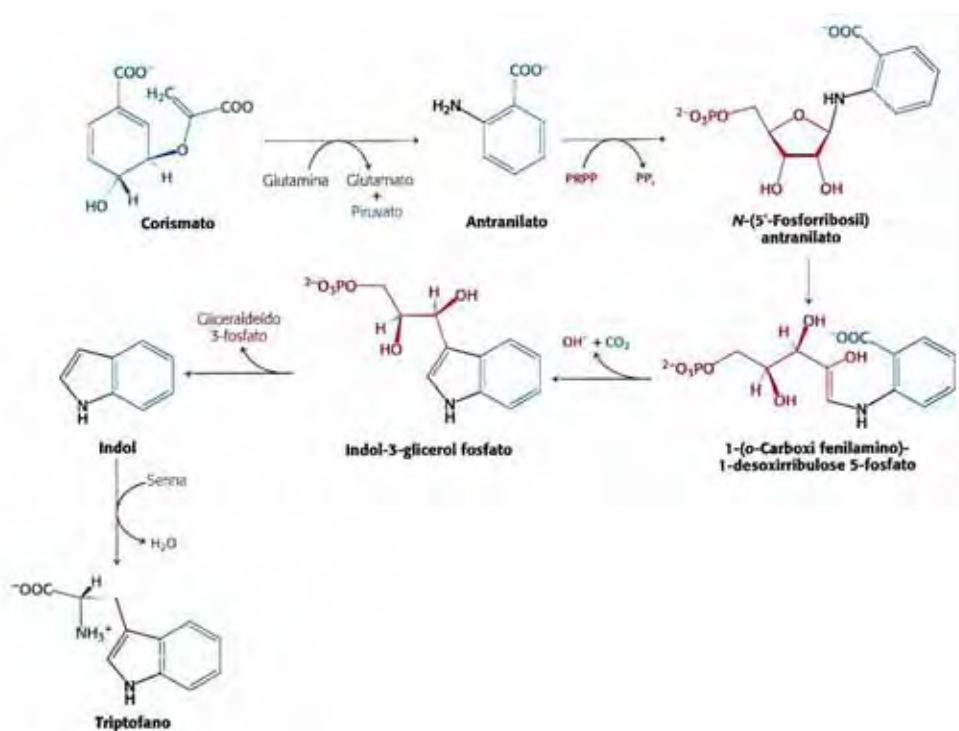
purínicos e pirimidínicos. O átomo C-1 da ribose 5-fosfato é ligado ao átomo de nitrogênio do antranilato, em uma reação que é acionada pela liberação e hidrólise de pirofosfato. A porção ribose do fosforribosil antranilato sofre um rearranjo, gerando 1-(o-carboxifenilamino) 1-desorriulose 5-fosfato, este intermediário é desidratado e depois descarboxilado a indol-3-glicerol-fosfato, que é clivado a indol, então o indol reage com a serina para formar o triptofano (Stryer, *et al.*, 2004). Esta é a única reação enzimática conhecida de tal transformação em sistemas biológicos, fazendo com que a CS seja uma enzima única na natureza. A CS exige a redução do mononucleotídeo flavina (FMN), um co-fator essencial encontrado normalmente em muitas reações redox biológicas. Surpreendentemente a reação catalisada pela CS não implica uma alteração global no estado redox (Bornemann et al., 1996; Kitzing et al., 2004; Macheroux et al., 1996; Macheroux et al., 1999). Segundo Bornemann et al, 1995, a FMN reduzida doa um elétron para 5-enolpiruvil shiquimato-3-fosfato (EPSP) facilitando assim a perda do fosfato e em recebê-lo novamente após a reação. Assim a flavina, apenas em sua forma reduzida é funcional e não é consumida durante a reação (Macheroux et al., 1998; Welch et al., 1974). Além disso, são distinguidas duas classes de CS entre os microorganismos que possuem shiquimato. A CS a partir de leveduras tem a capacidade de usar  $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) para a redução do FMN oxidado, tendo, portanto uma atividade catalítica adicional bi-funcional enquanto os outros CS são chamados mono-funcional (Mocheroux et al., 1999).

Existem estruturas cristalográficas disponíveis da CS obtidas de três bactérias: CS de *Streptococcus pneumoniae* complexado com FMN e EPSP (Maclean and Ali, 2003); CS da *Helicobacter pylori* complexado com FMN (Ahn et AL., 2004 e CS nativa da *Aquiflex aelicus* (Viola et AL., 2004) (código de acesso ao PDB 1QXO, 1UMO e 1Q1L respectivamente) e um CS de fermento nativo de *Saccharomyces cerevisiae* PDB de acesso 1R53 (Quevillon-Cheruel et al., 2004). Em todas essas estruturas o CS é apresentado como um tetrâmero composto por dois dímeros, como um dímero de dímero. O monômero inclui um domínio de um único núcleo grande, que é cercado por loops e trechos distintos de hélice- $\alpha$  e folha- $\beta$ . Dados de ultra-centrifugação analítica sugere que a CS da *Mycobacterium. tuberculosis* (MtCS) em solução apresenta predominantemente como um dímero em equilíbrio com uma forma tetramérica. Porém neste trabalho realizamos os experimentos de SAXS e obtivemos como resultado que essa proteína em solução apresenta-se predominantemente como tetrâmero não

observamos o mesmo resultado obtido por ultra-centrifugação analítica. Confirmamos assim os resultados cristalográficos em que esta estrutura em solução é tetramérica.



**Figura 2:** Síntese da fenilalanina e tirosina. O corismato pode ser transformado em pefenato, que é em seguida convertido a fenilalanina e tirosina. (Stryer, et al. 2004).



**Figura 3:** Síntese do triptofano. O corismato pode ser transformado em antranilato, que é a seguir convertido a triptofano. (Stryer et al., 2004).

## 2. Crotoxina

Crotoxina é a principal e mais tóxica proteína do veneno bruto da serpente sul-americana *Crotalus durissus terrificus*. Foi primeiramente isolada em 1938 por Fraenkel-Conrat. Apresenta-se como um heterodímero composto por duas subunidades

dissimilar, uma subunidade básica de baixa toxicidade chamada de fosfolipase do tipo A<sub>2</sub> com um pI 9,7 e massa molecular 14300 Daltons, uma subunidade ácida sem toxicidade denominada de crotapotina, possui um pI 3,4 com massa molecular de 9600 Daltons quando a toxina é complexada seu pI é de 4,7 e massa molecular de 23900 Daltons, a crotapotina potencializa a toxicidade da fosfolipase A<sub>2</sub>. A subunidade ácida consiste de três cadeias polipeptídicas interconectada por 7 pontes de dissulfeto. A cadeia A, B e C é constituída de 40, 34 e 14 resíduos de aminoácidos, com massa molecular de 4300, 3700 e 1600 Daltons, respectivamente (Breithaupt, *et al.*, 1974). A diminuição do ponto isoelétrico da fosfolipase se dá possivelmente pela neutralização dos grupos carregados positivamente pela crotapotina a qual interage nessas subunidades (Horst, *et al.*, 1972; Breithaupt, *et al.*, 1974).

Fosfolipases são proteínas de ação enzimática que hidrolisam especificamente fosfolípidios, e estão presentes em diversos processos celulares. São classificadas em quatro tipos; A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, C e D distintas pelo sítio específico de ação, nas peçonhas que possuem ação hemolítica e neurotóxicas são do tipo A<sub>2</sub>.

A crotoxina é um potente veneno sendo que sua dose letal, dependendo da espécie do animal, é provavelmente por volta de 200 µg/kg. O diafragma é um dos últimos músculos a se tornar paralisado por sua intoxicação. Demonstraram também lesões renais, essa paralisia é evidenciada pelo bloqueio da transmissão neuromuscular, a principal causa do bloqueio é o decréscimo da quantidade de acetilcolina liberado nas terminações nervosas (Brazil, 1966).

A crotoxina é um complexo, com atividade neurotóxica reversível, de ação pré-sináptica e pós-sináptica na junção neuro-muscular, a atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> liga especificamente nas membranas ricas em receptor de acetilcolina (Jeng, *et al.*, 1978, Bon, *et al.*, 1979). A fosfolipase A<sub>2</sub> da *Crotalus* apresenta atividade enzimática e requer Ca<sup>2+</sup> para sua atividade catalítica, sendo que a atividade da enzima também reconhece Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, e deoxicolato. Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Na<sub>2</sub>-EDTA, fosfato, oxalato, sulfeto, cianeto, citrato, ácido graxo, e lisolectina inibem a atividade enzimática (Breithaupt, 1976). A crotapotin potencializa a toxicidade da fosfolipase, mas inibe a sua atividade enzimática (Rubsamen, *et al.*, 1971).

A observação na redução da ligação não específica da subunidade básica após a dimerização sugere de que a crotapotina não esta agindo como uma sonda de afinidade para aumentar a especificidade da crotoxina no seu alvo de destino sobre os terminais

nervosos, mas sim como uma chaperona para orientar a afinidade específica (Cheng, 1985).

Embora não se tenha um bom conhecimento das formas terciárias e quaternárias, tão bem como o envelope dos componentes do complexo crotoxina, em 1975 Paradies e Breithaupt reportaram os primeiros dados experimentais das propriedades físico-químicas e estruturais da forma da crotapotina, fosfolipase A e a reconstituição do complexo crotoxina em condições fisiológicas, utilizando várias técnicas dentre elas SAXS, e obtiveram como resultado deste trabalho que o complexo crotoxina e a subunidade crotapotina podem ser descritas como formas esféricas e considerando a fosfolipase A como assimétrica devido à razão do longo eixo de simetria, com raio de giro para a crotoxina de 19,7Å, fosfolipase 32,4Å e crotapotina 13,4Å. A fosfolipase A<sub>2</sub> da crotoxina apresenta equilíbrio reversível entre dímero e tetrâmero o qual é governado pela concentração da fosfolipase A<sub>2</sub>, pelo pH e pela força iônica. (Paradies e Breithaupt, 1975).

Posteriormente, Mascarenhas, *et al.*, (1992) obtêm a estrutura tridimensional da crotoxina, proteína altamente tóxica isolada da serpente *Crotalus durissus terrificus*, baseada na análise da seqüência e da estrutura refinada foi modelada a fosfolípase do veneno da *Crotalus atrox* livre de cálcio, também realizaram experimentos em solução aquosa obtendo curvas de SAXS. A subunidade básica que utilizaram para a modelagem foi a 1PP2 naturalmente devido à alta homologia molecular, conseqüentemente os dados de SAXS forneceram um resultado que estava em boa concordância com o modelo e os dados experimentais da máxima dimensão e do raio de giro (52,0Å e 16,6Å, respectivamente). (Mascarenhas, *et al.*, 1992).

Propomos realizar os experimentos de SAXS com a crotoxina, fosfolipase e crotapotina, variando a condição do pH em ácido, básico e neutro do complexo crotoxina caracterizando-a, e também propomos uma modelagem do complexo, assim com o auxílio do potencial computacional obtemos modelos da forma envelope, ou seja, através das curvas de espalhamento foi possível chegar à estrutura quaternária da proteína e fazer a sobreposição dos modelos *ab initio* e modelado.

### **3. BTHTX**

As fosfolipases são proteínas com seqüências entre 119 a 143 aminoácidos, com peso molecular entre 10 kDa a 16 kDa, estabilizadas por sete pontes de dissulfeto. (Cintra, *et al.*, 2001). Tem sido observado um alto nível de homologia seqüencial entre

as fosfolipases principalmente as respectivas a Asp49, a qual muitas vezes é substituída pela Lys49, eliminando assim a atividade catalítica. (Cintra, *et al.*, 2001). A BthTx-I é uma proteína de cadeia simples com peso molecular 13,8 kDa, ponto isoelétrico 8,2 e 14 resíduos de cisteína (Cintra, *et al.*, 1993). A BthTx-II apresenta os efeitos de miotoxicidade e anti-coagulante, e demonstra baixa atividade catalítica da PLA2 (Gutiérrez *et al.*, 1991). A seqüência de aminoácido desta proteína foi determinada, e mostrou que a Asp49 é conservada (Pereira, *et al.*, 1995). As proteínas BthTx-I e BthTx-II foram isoladas e caracterizadas do veneno da serpente *Bothrops jararacussu*, em 1998 por Homs-Brandeburgo, *et al.*, demonstrou que são os principais componentes causadores da miotoxicidade. Ambas as miotoxinas foram posteriormente seqüenciadas e caracterizadas como fosfolípases Lys49 e Asp49 respectivamente. (Cintra, *et al.*, 1993; Pereira, *et al.*, 1998).

Venenos de serpentes são fontes ricas de fosfolipases capazes de induzir neurotoxicidade, miotoxicidade, cardiotoxicidade, e efeitos anticoagulantes através de uma ação em resposta a agregação plaquetária (Rosemberg, 1990; Kimi, 1997). Envenenamento por serpente da família *Viperidae* resulta em mionecrose aguda que provoca perda permanente do tecido, amputação de membros incapacitados e em alguns casos a morte (Gutiérrez e Lomonte, 1995). A mionecrose é causada principalmente pela ação direta da cataliticamente inativa Lys49 PLA<sub>2</sub> a partir da membrana plasmática homóloga das células musculares pela ação indireta da metaloproteinase e serino proteinase sobre o sistema hemostático (Gutiérrez e Lomonte, 1995; Ownby, *et al.*, 1999). Uma vez que a terapia do soro anti-veneno amplamente utilizada não aborda a mionecrose, a inclusão de um representante suplementar para o tratamento da mordidas de serpentes da família *Viperidae* é terapeuticamente relevante.

Estudos do mecanismo catalítico da PLA<sub>2</sub>s têm demonstrado que o ácido aspártico na posição 49 (Asp49) é essencial para a ligação com o co-fator Ca<sup>2+</sup>, o qual orienta o substrato fosfolípido e estabiliza a reação intermediária (Silva Giotto, *et al.*, 1998). A BthTX-I pertence a uma crescente família de PLA<sub>2</sub>s homólogas, em que antigamente pensava-se que o resíduo aspartato na posição 49 não era invariante, o qual é alterado para uma lisina. A Asp49 é essencial para a ligação do co-fator dos íons de Ca<sup>2+</sup>, e a substituição para uma lisina leva a perda da capacidade de ligação com o íon Ca<sup>2+</sup> e da sua atividade catalítica (Holland, *et al.*, 1990; Scott, *et al.*, 1992; Arni, *et al.*, 1995a).

Heparina e poliânions relacionados são capazes de inibirem a mionecrose induzida pelo veneno de serpentes que contenham miotoxinas tais como a *Bothrops jararacussu* BthTx-I (Homsí-Branderburgo, *et al.*, 1988), *Agkistrodon contortrix laticinctus* miotoxina (ACL miotoxina) (Johnson and Ownby, 1993) e a *Bothrops asper* miotoxina II (Basp-II), ambos *in vivo* e *in vitro* (Lomonte and Gutiérrez, 1989). A suramina, um derivado da uréia naftil polisulfonado utilizado clinicamente nos tratamentos de oncocercose (Burch and Ashburn, 1951), tripanossomos africano (Williamson e Desowitz, 1956) e alguns tipos de câncer (LaRocca *et al.*, 1993; van Oosterom *et al.*, 1991), é também um inibidor em potencial das miotoxinas ambos *in vivo* e *in vitro* e representa um importante agente terapêutico para o tratamento da mordida de serpente do tipo *Viperidae* (Arruda, *et al.*, 2002; Murakami, *et al.*, 2005).

A Lys49 homologa a PLA<sub>2</sub>s cataliticamente inativa causa perda da membrana na ausência de íons de Ca<sup>2+</sup>, sem hidrolisar simultaneamente, quando testado contra lipossomos carregados negativamente (Gutiérrez e Lomonte, 1995; Ownby, *et al.*, 1999). Uma série de estudos de diferentes técnicas envolvidas, tais como, modificação química, análise de comparações sequenciais, interação com moléculas neutralizantes, estudo de peptídeo sintético, e localização de mutagenes dirigido, têm sido aplicados na tentativa de elucidar os determinantes estruturais para a miotoxicidade da Lys49 homologa a PLA<sub>2</sub>s (Ownby, *et al.*, 1999; Murakami, *et al.*, 2005).

No estudo de cristalografia combinado com SAXS, simulações de dinâmica molecular, e testes *in vivo* da inibição causada pela suramina e polietileno glicol, revelam novos recursos do mecanismo de ação das miotoxinas, sugerindo um promissor complemento do tratamento com o soro através da inclusão destes potentes inibidores que ligam simultaneamente os locais de reconhecimento catalítico das interfaces.

#### **4. LTA – *Lotus tetragonolobus***

Lectinas de plantas é um grupo de proteínas que ligam carboidratos sem modificá-los, inclui uma classe heterogênea de glicoproteína que é fundamental para o reconhecimento de ligação célula – célula, a qual é crucial em eventos como a defesa contra parasitas na planta. Embora essas proteínas sejam similares em suas estruturas primária e terciária, diferenças são reportadas no modo de associação dos monômeros para a formação da complexa estrutura quaternária (Brida, *et al.*, 2005). Em geral, lectinas de leguminosas são dímeros – dímeros, e as diferenças entre elas são em como as interfaces dos dímeros estão combinadas para a disposição do tetrâmero (Moreno, *et*

*al.*, 2006; Delatorre, *et al.*, 2007). O modo como são formados os tetrâmeros de lectinas de leguminosas e suas afinidades por oligossacarídeos estão sendo exaustivamente pesquisados, assim podemos chegar a um entendimento detalhado dos mecanismos de interações biológicas entre as lectinas e os complexos de carboidratos estabelecendo uma base química importante para a função de reconhecimento específico que são fornecidos pelas lectinas de plantas (Moreno, *et al.*, 2008).

O interesse nos estudos das lectinas de leguminosas são as diferenças no modo de associação dos monômeros, podendo formar estruturas quaternárias diméricas ou tetraméricas, e esta é a principal característica e alvo deste trabalho.

Fitoaglutinates das sementes de *Lótus tetragonolobus* foi primeiramente investigado em 1963 por Sagan, *et al.*, os primeiros dados estruturais de um monômero da semente da (LTA) revelaram que essa molécula é composta de 240 aminoácidos com massa molecular de 26 kDa (Konami, *et al.*, 1990). Nos estudos posteriores a LTA mostrou-se ser específico para L-fucose e também para mono e oligossacarídeos contendo resíduos de L-fucose. Resultados de RNM indicam que LTA reconhece diversos L-fucose oligossacarídeos incluindo o antígeno determinante Le<sup>x</sup> e a forma bivalente (bifucosilato-N-neohexaose – Fuc-octa). Açúcar fucosilato são amplamente distribuídos na natureza, das plantas aos mamíferos, e mostra uma variedade de desempenhos biológicos, particularmente nos processos de reconhecimento (Moreno, *et al.*, 2008). Alguns estudos têm reportado que a L-fucose oligossacarídeo é muitas vezes expressos nas células durante a diferenciação ou estagio de metástase; eles também obtiveram correlações com metástase em potencial nos mesmos tipos de tumores, particularmente em neuroblastomas e adenocarcinomas (Kalb, 1968; Staudacher, *et al.*, 1999).

Devido a essa propriedade biológica da LTA em reconhecer L-fucose oligossacarídeo que estão presentes em glicoproteínas e nos receptores das células glicolipídicas, tem sido usado como uma ferramenta para vários estudos bioquímicos, dentre eles; (I) caracterização de antígenos (Thomas and Surolia, 2000; Napier, *et al.*, 1974; Butters and Hughes, 1978); (II) na exploração da composição relativa dos sacarídeos em diferentes células (Mayliepfeninger and Jamieson, 1979; Gurd, 1979); (III) aplicação das lectinas na histologia química de células malignas com o propósito de investigação de membranas anômalas de oligossacarídeos e diferenciação de carcinomas (Raedler *et al.*, 1983; Koch, *et al.*, 1983; Miettinen, *et al.*, 1983; Walker,

1984; Ulrich, *et al.*, 1985; Davidson, *et al.*, 1987; Griffiths and Stephenson, 1988; Raju and Lee, 1988; Finne, *et al.*, 1989; Imura, *et al.*, 2004; Turner, *et al.*, 1995).

A LTA tem sido extensivamente usada em vários experimentos envolvendo a ligação de lectinas com L-fucose devido a essa forte característica de afinidade pelo complexo L-fucose oligossacarídeo, porém ainda não é bem entendido esse fenômeno. Resultados prévios revelam que a LTA tem afinidade por vários L-fucose oligossacarídeos, conseqüentemente também é mostrado com esses resultados que a afinidade de ligação é diminuída com o aumento da complexidade destes sacarídeos (Haselhorst, *et al.*, 2001).

A contribuição deste trabalho foi à investigação do estado de oligomerização da LTA, com a técnica de espalhamento de raios-X a baixos ângulos, mostramos que esta lectina adota uma nova estrutura quaternária resultando de um conjunto de dois GS4-dímero descrevendo uma nova interface, lançando mais luz com bases estruturais para o reconhecimento da L-fucose sacarídeo na evolução molecular das lectinas e suas diversas aplicações.

## **Teoria da Técnica de Espalhamento de Raios X a Baixo Ângulo (SAXS)**

A técnica de espalhamento de raios X a baixo ângulo (sigla inglesa SAXS), é uma ferramenta fundamental para o estudo de macromoléculas biológicas. A maior vantagem deste método está na facilidade de se obter informação estrutural, parcial ou completa, de sistemas desordenados. SAXS permite um estudo de estruturas de partículas nativas em meio ambiente próximo ao fisiológico, e análise de mudanças estruturais em resposta a variações de condições externas.

Devido à necessidade de obter bons cristais para a cristalografia, e uma baixa massa molecular para RNM (ressonância nuclear magnética), uma significativa fração de proteínas não podem ser analisadas diretamente por essas duas técnicas de alta resolução. Com o progresso na instrumentação e principalmente nos novos métodos de análise, o qual melhora substancialmente a resolução e a confiabilidade nos modelos estruturais, promove o método de SAXS a uma importante ferramenta complementar para estas atividades de investigação estrutural.

Os experimentos de SAXS requerem tipicamente uma solução homogênea e diluída das macromoléculas a serem investigadas, em solução tampão sem aditivos especiais, próximo ou não do meio ambiente fisiológico. O preço a pagar por essa relativa simplicidade na preparação da amostra é a baixa informação nos dados do espalhamento, na ausência da ordem cristalina. Para soluções de proteínas diluídas incluindo sistemas monodispersos de partículas idênticas, a orientação randômica de partículas em solução conduz a uma média esférica para o espalhamento de uma simples partícula, produzindo um padrão de espalhamento uni-dimensional. A principal dificuldade, e simultaneamente o desafio fundamental, para o SAXS como método estrutural é extrair informações de um objeto tri-dimensional dos dados experimentais uni-dimensionais (Svergun and Koch, 2003).

Com a disponibilidade na internet de um conjunto de programas chamado ATSAS, desenvolvido por Svergun e colaboradores, trouxe um avanço essencial para os métodos de análise de dados do SAXS, permitindo confiáveis modelos *ab initio*, determinação do domínio estrutural e modelagem detalhada de macromoléculas complexas usando o refinamento de corpo rígido. Estes programas além da matemática convencional para SAXS como transformada e série de Fourier baseiam-se também na variação de contraste e expansão de multipólo, visto que, serão explanadas mais adiante, de uma forma resumida dando importância somente as principais equações da técnica.

## 1 . O espalhamento

O espalhamento é produzido pela interferência de ondas espalhadas por um objeto, todos os elétrons que constituem os átomos no sistema será uma fonte de onda espalhada, assim, todas as ondas secundárias são da mesma intensidade, pela bem conhecida fórmula de Thomson.

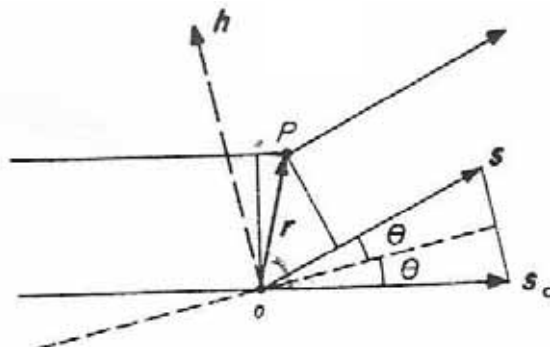
$$I_e(\theta) = I_p \cdot 7,90 \times 10^{-26} \cdot \frac{1}{a^2} \cdot \frac{1 + \cos^2 2\theta}{2} \quad (1)$$

Onde  $I_p$  é a intensidade primaria,  $a$  é à distância do objeto ao ponto de registro. O fator numérico é o quadrado do clássico raio do elétron ( $e^2/mc^2$ ). A intensidade depende apenas do ângulo de espalhamento  $2\theta$  pelo fator de polarização, que é praticamente igual a 1 para os pequenos ângulos, por isso para brevidade dos cálculos será omitido.

## 2. Interferências

As ondas são espalhadas de forma coerente, ou seja, as amplitudes estão em fase, e a intensidade é dada pelo quadrado absoluto da amplitude resultante. As amplitudes só diferem pela sua fase  $\varphi$ , o que depende da posição do elétron no espaço. A representação da onda secundaria é dada pela forma complexa:  $e^{i\varphi}$  e a fase é  $\varphi = -\left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)(s - s_0)r$  podendo assumir posteriormente a forma  $\varphi = -qr$ , como elucidada na Figura 4.

Onde a direção do feixe incidente é denotada pela unidade do vetor  $s_0$ , e do feixe espalhado por  $s$ ,  $r$  descreve o vetor na posição do elemento de volume  $dV_r$ , contra uma origem arbitraria  $O$ .



**Figura 4:** Espalhamento através de dois pontos centrais ou espalhamento de uma simples partícula. (Glatter, O., 1982).

Como é observado da Figura 4  $(s - s_0)$  existe simetricamente em relação ao feixe incidente e o espalhado, e que sua grandeza é dada por  $\frac{2\text{sen}\theta}{\lambda}$ , visto que  $\theta$  significa a metade do ângulo de espalhamento e que o vetor  $\vec{q}$  tem a mesma direção e magnitude,  $q = \left(\frac{4\pi}{\lambda}\right)\text{sen}\theta$ , significa que apenas a componente  $\vec{r}$  em  $\vec{q}$  no produto do vetor  $\vec{qr}$  é relevante para a fase.

Agora é possível obter a amplitude resultante, pela soma de todas as ondas secundárias que são representadas pelo termo  $e^{-iqr}$ . Considerando o grande número de elétrons, e o fato de não ser possível localiza-lo exatamente, aqui será necessário introduzir o conceito de densidade eletrônica, que pode ser definida como o número de elétrons por unidade de volume. Para obter a amplitude total espalhada pela partícula integram-se as ondas espalhadas pelos elétrons contidas num elemento de volume  $dV_r$ , que não é mais que a transformada de Fourier da densidade eletrônica  $\rho(\vec{r})_r$ , que vem definida pela equação 2.

$$F(\vec{q}) = \int_V \rho(\vec{r}) e^{-i\vec{q}\vec{r}} dV_r \quad (2)$$

E a intensidade  $I(q)$  é o quadrado absoluto obtido simplesmente quando aplicado o complexo conjugado da amplitude  $FF^*$ , em que envolve apenas as distâncias relativas  $(\vec{r}_1 - \vec{r}_2) = \vec{r}$  para cada par de elétrons, podendo representar um espaço-C real, e a densidade destes pares de elétrons é dada pela função de autocorrelação  $\tilde{\rho}^2(\vec{r})$  que será desenvolvido posteriormente, partindo da Equação (2) nos dá:

$$I(\vec{q}) = \int_V dV \cdot \overline{\rho^2(\vec{r})} \cdot e^{-i\vec{q}\vec{r}} \quad (3)$$

Esta é novamente uma transformada de *Fourier*. Portanto, a distribuição de intensidade em  $q$  ou espaço recíproco é exclusivamente determinado pela estrutura do

objeto, que se escreve por  $\bar{\rho}^{-2}(r)$ . Inversamente, estas últimas podem ser obtidas a partir de  $I(\vec{q})$  pela transformada inversa de Fourier:

$$\bar{\rho}^{-2}(\vec{r}) = \int_V I(\vec{q}) \cdot e^{i\vec{q}\vec{r}} dV_r \quad (4)$$

Uma conclusão bastante geral pode ser tirada a partir de (3) e (4): existe uma reciprocidade entre espaço recíproco e espaço-C ou real. Como eles estão ligados somente pela fase  $qr$ , o resultado será o mesmo, quando  $\vec{r}$  é aumentado e  $\vec{q}$  é diminuído pelo mesmo fator. Portanto grandes partículas darão uma difração padrão concentrada em pequenos ângulos. (Glatter and Kratky, 1982).

### 3. Espalhamento nos pequenos ângulos

O espalhamento nos pequenos ângulos, como citado anteriormente, deve seu domínio a aplicabilidade em partículas de dimensões coloidais ou inhomogeneidade, e é limitado ao pequeno comprimento de onda, além disso, devemos introduzir duas restrições: (1) O sistema é estatisticamente isotrópico. Não fazendo diferença se isto é propriedade da partícula ou consequência de alguma alteração no tempo (ex.: rotação). (2) Não existe nenhuma ordem de longo alcance, ou seja, não há correlação entre dois pontos amplamente separados.

A restrição (1) visa que a distribuição no espaço-C dado por  $\tilde{\rho}^2(\vec{r}) \rightarrow \tilde{\rho}^2(r)$  depende apenas da unidade de  $\vec{r}$  que é a grandeza da distância, apesar de isto não ser verdade para  $\rho(r)$ , no espaço ordinário, assim podemos substituir o fator da fase  $e^{-i\vec{q}\vec{r}}$  pela sua média vetorial que só depende do modulo de  $|\vec{r}|$ , que será expresso pela fórmula fundamental de Debye (1915).

$$\left\langle e^{-i\vec{q}\vec{r}} \right\rangle = \frac{\text{sen}(qr)}{(qr)} \quad (5)$$

Desse modo vamos reescrever a expressão (3), desta forma temos:

$$I(\vec{q}) = \int 4\pi r^2 \cdot \bar{\rho}^{-2}(\vec{r}) \frac{\text{sen}(qr)}{(qr)} dr \quad (6)$$

Em conformidade com a restrição (2), nas distâncias  $r$  amplamente separadas as respectivas densidades eletrônicas se tornam independentes, e podem ser substituídos

pelo valor médio  $\bar{\rho}$ , aqui então devemos introduzir um artifício matemático chamado de convolução quadrática ou autocorrelação. Sabemos que  $\vec{r} = (\vec{r}_1 - \vec{r}_2)$ , então a função de autocorrelação fica assim:

$$\tilde{\rho}^2 = \int_V \rho(\vec{r}_1) \rho(\vec{r}_2) dV \quad (7)$$

De acordo com esta definição a Equação (7), deve, portanto tender para um valor constante  $V\bar{\rho}^2$ , o qual evidentemente não possui qualquer informação adicional, pois a região finita da estrutura que é representada por  $\tilde{\rho}^2$  desvia do valor final, que obviamente contém as informações. Este valor constante completa o volume total (assumindo ser muito grande) e atua como um objeto vazio, não podendo contribuir para o espalhamento, sendo acessível apenas aos pequenos ângulos extremos. É conveniente considerar essa flutuação da densidade eletrônica como  $n = \rho - \bar{\rho}$ , em vez de  $\bar{\rho}$  somente, então a expressão (7) torna-se:

$$\tilde{\eta}^2 = (\tilde{\rho} - \bar{\rho})^2 = \tilde{\rho}^2 - V\bar{\rho}^2 = V \cdot \gamma(r) \quad (8)$$

#### 4. Função de correlação

A função de correlação  $\gamma(r)$  pode ser interpretada como a média do produto de duas flutuações a uma distância  $\vec{r}$ , e assim podemos reescrever a Equação (6) (Debye e Bueche, 1949) que agora assume a forma:

$$I(q) = V \int_0^\infty 4\pi r^2 \cdot \gamma(r) \frac{\text{sen}(qr)}{(qr)} dr \quad (9)$$

Esta é a fórmula mais geral para os sistemas de espalhamento obedecendo às restrições (1) e (2),  $\gamma(r)$  é encontrada pela transformada inversa de Fourier;

$$V\gamma(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty q^2 \cdot I(q) \frac{\text{sen}(qr)}{(qr)} dq \quad (10)$$

Ambas as fórmulas são de extraordinária importância para todos os problemas a seguir. Mas vamos primeiro tirar algumas conclusões gerais: obviamente a partir de (9)

e (10) tomar uma simples forma particularmente para  $q = 0$  e  $r = 0$ , tal como então, o fator Debye tem o valor 1. Portanto, temos;

$$I(0) = V \int_0^{\infty} 4\pi r^2 \cdot \gamma(r) dr \quad (11)$$

$$V\gamma(0) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^{\infty} q^2 \cdot I(q) dq = V\overline{\eta^2} \quad (12)$$

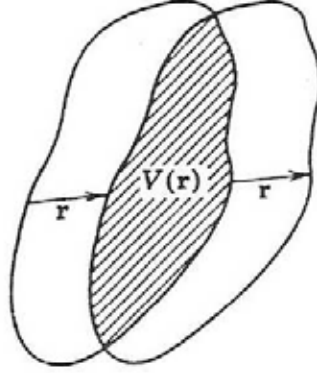
Na Equação (11) mostra que para  $q = 0$  exatamente todas as ondas secundárias devem estar em fase, a fim de obtermos o valor de  $I(0)$ , mas isto não pode ser diretamente observado por não ser uma quantidade mensurável, como definido pela Equação  $\gamma(r)$  que cada um dos elétrons do volume  $V$  atua em coerência com uma só região circundante, e então o valor de  $I(0)$  deve ser extrapolado.

A Equação (12) mostra que o integrado da intensidade no espaço recíproco esta diretamente relacionada com a média quadrática da flutuação da densidade de elétrons, e que mesmo que partes do sistema forem desviadas ou deformadas, podendo alterar consideravelmente a difração padrão, mas a integral (12) deve permanecer invariante. A integral (12) será fundamental para poder calcular o volume e a superfície da partícula, os quais serão explicados posteriormente.

$$\text{“INVARIANTE” } Q = \int_0^{\infty} q^2 \cdot I(q) dq \quad (13)$$

Podemos ainda melhorar o conceito da função de correlação como  $\gamma(r)$  esta sempre relacionada com a geometria da partícula, atribuímos um significado mais intuitivo (Porod, 1948), imaginando uma partícula deslocada por um vetor  $\vec{r}$ , como mostrado na Figura 5, observamos que o volume  $V$  em comum com as partículas e suas "intersecções" apenas contém todos os pontos que dão uma contribuição para  $\gamma_0(r)$ , assim precisamos apenas da média ao longo de todas as direções  $\vec{r}$ , com  $\vec{r} = |\vec{r}|$  sendo mantido constante.

$$\gamma_0(r) = \frac{\overline{V(r)}}{V} \quad (14)$$



**Figura 5:** Representação da função  $V(r)$ , partícula “fantasma” (Guinier, A. 1955).

A função de correlação  $\gamma_0(r)$  é, portanto, bem adaptada para representar uma partícula com relação a seu padrão de difração, e pode ser obtida pela transformada inversa de *Fourier*.

$$(\Delta\rho)^2 \cdot V \cdot \gamma_0(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty q^2 \cdot I_1(q) \frac{\text{sen}(qr)}{(qr)} dq \quad (15)$$

### 5. Aproximação de Guinier

Existe uma aproximação geral para todas as formas das partículas, que é válida para valores de  $q$  tendendo a zero da curva de espalhamento (Guinier, 1939), o qual é dado pela seguinte formula:

$$I_1(q) = (\Delta n_e)^2 e^{-q^2 Rg^2/3} \quad (16)$$

Tal formula é conhecida como “lei de Guinier” da qual pode ser obtida facilmente o raio de giração  $Rg$ , que é definido como a média da distância do quadrado do centro de gravidade:  $R = \sqrt{r^2}$ , este parâmetro é análogo ao raio de inércia em mecânica, onde o papel das “massas” é desempenhado pelos elétrons.

Podemos obter o raio de giração a partir da Equação da função de distribuição de distâncias  $p(r)$  (Equação 17);

$$p(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^{\infty} I(q) \cdot (qr) \cdot \text{sen}(qr) dq \quad (17)$$

A função  $p(r)$ , denominada função de distribuição de distância, representa o número de pares de elétron separados pela distância  $r$  dentro da partícula, e dela obtêm-se todas as informações sobre a forma da macromolécula.

Esta função tem a mais completa informação estrutural da partícula, capaz de fornecer a máxima dimensão desta, bem como prever a formação de dímeros ou agregados das macromoléculas em solução, mostrando, principalmente, a forma da partícula em solução nas diferentes condições físico-química. (dos Santos, 1998).

O raio de giração fica assim:

$$R^2 = \frac{\int_0^{\infty} p(r) r^2 dr}{2 \int_0^{\infty} p(r) dr} \quad (18)$$

Ou da parte mais interna da curva de espalhamento (aproximação de Guinier - Equação 16), assim podemos chegar a plotagem do gráfico de Guinier que é:  $\log I(q)$  vs  $q^2$ , o qual mostra uma reta descendente de inclinação negativa, onde o coeficiente linear é chamado de alfa de Guinier, podemos assim obter o raio de giração diretamente da curva de espalhamento pela formula seguinte:

$$Rg = 2.628 \sqrt{-\alpha} \quad (19)$$

## 6. Lei de Porod

A partir da lei de Porod podemos encontrar características físicas das partículas como; volume e superfície, os quais estão relacionados com a inclinação final da curva de espalhamento  $I(q)$ . Para se argumentar de uma forma quantitativa deriva-se  $\gamma_0$ , da Expressão (14), tendo em mente uma fina casca de dimensão  $r$  conforme ilustrado na Figura 5 o volume  $\bar{V}$  difere de  $V$  somente se houver uma mudança na superfície, e essa contribuição da superfície é  $dS$  e para a casca é  $dS \cdot r \cos \vartheta$ , aqui  $\vartheta$  especifica o ângulo

entre  $r$  e a superfície. Vamos levar em consideração apenas uma contribuição infinitesimal o qual nos dá à média  $|\overline{\cos \vartheta}| = 1/2$ , e somente das direções internas de  $r$  o que nos conduz a um segundo fator  $1/2$ , assim a superfície do elemento será, portanto, diminuído por  $\frac{1}{4}dS \cdot r$  na média, o que dá  $\frac{1}{4}Sr$  para a superfície total.

Aqui, chegamos a mais importante expressão, para a aproximação da inclinação final da curva de espalhamento.

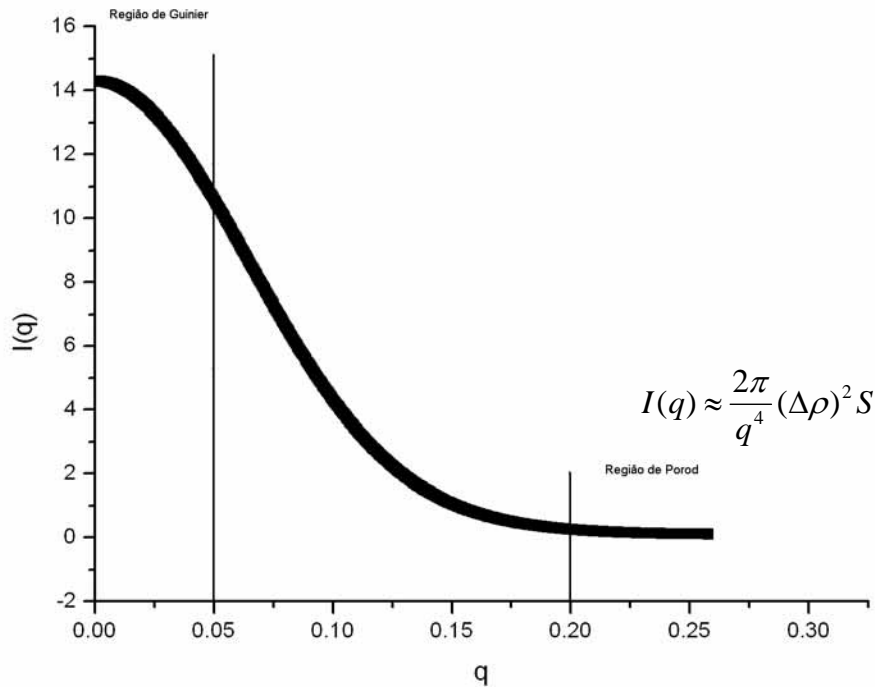
$$I(q) \approx -\frac{8\pi}{q^4} \cdot \gamma(0) \quad (20)$$

Como  $\gamma(0) = -(\Delta\rho)^2 S/4$  sendo  $S$  a superfície podemos reduzir a Equação (20), onde então temos:

$$I(q) \approx \frac{2\pi}{q^4} (\Delta\rho)^2 S \quad (21)$$

Esta lei da quarta potência foi formulada por Porod (1951).

$$I(q) = I(0)^2 e^{-q^2 R^2/3}$$



**Figura 6:** O gráfico acima mostra um resumo das leis de Guinier e Porod.

## 7. Volume

De acordo com Porod (1951), aplicando a Equação (13) o invariante  $Q$ , em combinação com a extrapolação da intensidade espalhada no ângulo zero, podemos chegar ao resultado do volume das partículas.

$$V = 2\pi^2 \cdot \frac{I(0)}{Q} \quad (22)$$

## 8. Superfície

A determinação da superfície esta diretamente relacionada com a Equação (21), onde  $I(q)$  é a intensidade de uma partícula dispersa, aqui a determinação da intensidade absoluta pode ser evitada aplicando a seguinte Equação:

$$O_s = \frac{S}{V} = \pi \frac{\lim_{h \rightarrow \infty} [I(q) \cdot q^4]}{Q} \quad (23)$$

O termo  $O_s$  e a razão  $S/V$  são chamados de superfície específica e podem ser determinadas diretamente da curva de espalhamento, (Mittelbach and Porod, 1965).

## Teoria e Métodos Computacionais

### 1. Determinação do parâmetro de regularização do método de transformada indireta usando critério percentual – (Programa – GNOM)

O parâmetro utilizado para a regularização é o “múltiplo de Lagrange”, aplicando diretamente no método da transformada indireta. O método esta baseado no critério percentual para descrever a melhor qualidade da solução dos dados de SAXS (Svergun, Semenyuk & Feigin, 1988).

O método da transformada indireta esta fundamentado na aplicação da transformada inversa de *Fourier*, ou seja, na função de distribuição de distâncias  $p(r)$  aplicada diretamente aos dados da intensidade de espalhamento obtidos experimentalmente. Este método garante confiáveis resultados a serem obtidos até mesmo com resultados ruins dos dados experimentais, a eficácia do método pode ser confirmada pelos modelos computacionais.

A aproximação indireta em SAXS esta argumentada na suposição em que os conjuntos de medidas das intensidades experimentais  $J = J(q_i), i = 1, \dots, N$  podem ser relacionados com a integral da transformada inversa de *Fourier* na função de distribuição no espaço real  $p = p(r)$ . O gráfico da função de distribuição de distância é uma curva que difere de zero somente no intervalo  $D_{\min} < r < D_{\max}$ .

Os métodos convencionais trabalham apenas com os mínimos quadrados, aqui o que nos dá o parâmetro de regularização é o valor de  $\alpha$ . O grande problema é encontrar a melhor solução para  $\alpha$ , um modo para isso é a aplicação do critério do  $\chi^2$  (Bevington, 1969), um segundo critério também pode ser adotado como o ponto de inflexão (Glatter, 1977), porém estes métodos podem também falhar devido ao intervalo de  $\alpha$ , onde  $\alpha \rightarrow 0$  e  $\alpha \rightarrow \infty$ , assim deparou com uma forma para encontrar a melhor solução do problema com o parâmetro de regularização que é o critério percentual.

O critério percentual está amparado em seis parâmetros; oscilação, desvio sistemático, discrepância, estabilidade, positividade e validade da parte central da função  $p(r)$ .

A oscilação ou OSCILL é assumida como uma interpretação visual da suavização da melhor solução da função  $p(r)$ , e o valor da oscilação para uma partícula considerada como uma esfera deve estar próxima de 1.1, quando próximo de 2 corresponde a uma partícula bimodal ou monomodal instável.

Desvio sistemático ou SYSDEV, o mais importante critério está relacionado com o desvio da função de distribuição de distância  $p(r)$  dos dados experimentais, pode ser estimado fazendo uma análise residual  $\Delta_i = J(q_i) - J_\alpha(q_i)$ , o valor ideal para SYSDEV deve ficar por volta de 1.

Discrepância ou DISCRP avalia se o residual obtido pelo SYSDEV corresponde ao erro experimental, pode ser obtido de uma forma padrão chamado de discrepância generalizada (Tikhonov & Arsenin, 1977, ch. 2), o critério é obtido pelo melhor valor alcançável do  $\chi^2$ . Para uma aplicação prática o valor da DISCRP deve estar contido entre o intervalo:  $0,7 < DISCRP < 0,95$ .

Estabilidade ou STABIL descreve como a solução muda em relação às mudanças nos valores de  $\alpha$ , de acordo como o método do ponto de inflexão o valor de STABIL deve ser  $\ll 1$ .

Positividade ou POSITV. A função de distribuição de distância  $p(r)$  deve ser naturalmente uma solução não negativa. Para uma solução não negativa o termo POSITV deve ser igual a 1.

Validade da parte central da função de distribuição de distância  $p(r)$  ou VALCEN é determinada quando o intervalo da gaussiana  $(D_{\min}, D_{\max})$  está corretamente definida. Muita informação está contida na parte central da  $p(r)$ . Assim, do ponto de vista físico, estes valores não devem ser muito grandes, VALCEN é então um critério para averiguar soluções instáveis e oscilantes ao redor de zero. O valor ótimo esperado é por volta de 1 (Svergun, 1992).

## **2. DAMMIN – Estruturas de baixa resolução de macromoléculas biológicas aplicando *SIMULATED ANNEALING***

Um método é proposto para restaurar a forma *ab initio* de baixa resolução dos dados do espalhamento de raios X de partículas orientadas caoticamente. O modelo é construído partindo de um conjunto denso de átomos *dummy*, o qual é caracterizado pela configuração de assinalamento do vetor (0 e 1), especificando a fase em que se encontra o átomo, partícula ou solvente. *Simulated annealing* é empregado para encontrar a melhor configuração do modelo, coerente com os dados experimentais.

Primeiramente um modelo geral de uma partícula esférica de fase  $K$  é construído ( $K \geq 1$ ), o seu volume é definido com um raio  $R$  suficientemente maior que a própria partícula a ser modelado, e preenchido com  $N$  átomos *dummy* (os átomos *dummy's* são

pequenas esferas com raio  $r_0 \ll R$ ). Cada átomo *dummy* é então fixado e endereçado como  $X_j$  indicando qual a fase que este pertence (e.g.  $X_j = 0$  solvente,  $X_j = 1$  partícula).

A reconstrução do modelo tri-dimensional de baixa resolução obtidos dos dados de SAXS procede de uma minimização de energia. Encontrando uma configuração  $X$  para os átomos *dummys*, a função objetivo  $f(X) = \chi^2 + \alpha P(X)$  deve ser minimizada,  $\alpha$  é o peso da Equação para a perda de liberdade na conectividade dos átomos adjacentes, e seu valor deve ser  $\alpha \approx 10^1$  é uma escolha razoável, o  $\chi^2$  dá o critério da minimização de discrepância no conjunto dos dados experimentais, teóricos e o erro, quanto mais próximo de 1 o valor do  $\chi^2$  melhor será a solução da construção do modelo, para modelos compactos o valor de  $P(X)$  é da ordem de  $10^{-2}$ .

Dado o grande número de variáveis e a natureza combinatória para o problema, *simulated annealing* (SA) (Kirkpatrick, *et al.* 1983) tem demonstrado ser apropriado para o método de minimização global de energia. A principal idéia deste método está em disponibilizar modificações randômicas para o sistema (isto é a configuração  $X$ ), durante este processo dos movimentos randômicos a nova configuração decresce a energia  $f(X)$ , mas em alguns casos a energia pode ser aumentada. (Svergun, 1999).

### **3 . DAMAVER – Determinação da única forma *ab initio*.**

A análise e recuperação de modelos *ab initio* com vista a uma estrutura tridimensional de uma curva de espalhamento unidimensional é, obviamente, ambígua, já que modelos diferentes podem ser produzidos da mesma curva de espalhamento e com a mesma exatidão.

No passado, métodos de tentativa e erro foram empregados, modelando diferentes formas computacionalmente e comparando com padrões de espalhamento experimentais, definiram assim duas estratégias para gerar o modelo singular. Uma estratégia foi utilizar o menor número de modelos e parâmetros possível, usando três formas como parâmetro tais como: prisma, elipsóide e cilindro; e o outro método foi construir complicados corpos utilizando de pequenas esferas (isto é, utilizando de muitos parâmetros) assim restringindo o modelo a informações adicionais (Kratky & Pilz, 1978). As duas estratégias evoluíram junto com o melhoramento do poder computacional, conduzindo assim a modernos métodos de determinação das formas *ab*

*initio*.

Um primeiro método geral *ab initio* é amparado na aproximação de poucos parâmetros, Stuhrmann (1970) propôs representar a forma da partícula por uma função envelope angular  $r = F(\varpi)$ , onde  $(r, \varpi)$  são coordenadas esféricas, a densidade da partícula no interior do envelope é unitário e zero no exterior. O envelope pode ser descrito por uma série de harmônicos esféricos:

$$F(\varpi) = \sum_{l=0}^L \sum_{m=-l}^l f_{lm} Y_{lm}(\varpi) \quad (24)$$

Onde o  $L$  define a máxima ordem harmônica de resolução, demonstrando que na prática o único envelope que pode ser extraído dos dados de espalhamento tem resolução acima de  $L = 4$ . (Svergun, *et al.*, 1996)

A modelagem usando função envelope angular tem limitações em descrever partículas complexas, em geral, partículas assimétricas, ou que possuam cavidades internas, então a série harmônica não pode assegurar uma adequada representação conduzindo a erros sistemáticos. Uma descrição mais abrangente é alcançada em um módulo dos métodos de modelagem, que foram melhorados utilizando da velocidade dos computadores modernos para restaurar a estratégia da modelagem de muitos parâmetros através da pesquisa das variações tipo Monte Carlo. O módulo de modelagem *ab initio* esta confinado ao volume e foi primeiramente proposto por (Chacon, *et al.*, 1998; Chacon, *et al.*, 2000).

A máxima dimensão  $D_{\max}$  ajustada a uma esfera  $M$  densamente empacotada com átomos dummies (esfera de raio  $r_0 \ll D_{\max}$ ) conduz a uma seqüência  $X$  de  $M$  bits, e a configuração desses átomos podem ter a seguinte forma: ( $X_i = 1$  para partículas) e ( $X_i = 0$  para o solvente), e a intensidade de espalhamento deste modelo é posteriormente computado usando em geral a fórmula de Debye (Debye, 1915).

$$I(q) = f^2(q) \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^M X_i X_j \frac{\text{sen}(qr_{ij})}{qr_{ij}} \quad (25)$$

Onde  $r_{ij} = |r_i - r_j|$  é a distância entre os átomos dummies adjacentes e  $f(q)$  é o fator forma (da amplitude de espalhamento da esfera de raio  $r_0$ ), assim iniciando de uma distribuição randômica de 1 e 0, o modelo é modificado até encontrar a seqüência binária (isto é, o modelo da partícula) que é ajustado aos dados experimentais. A intensidade do modelo é então computada utilizando dos harmônicos esféricos para melhorar a velocidade de cálculo computacional e compactação das conectividades. O modelo *ab initio* é aproximado sem limitações pela busca espacial avaliada pelo tipo *Monte Carlo* (Walther, Cohen & Doniach, 2000) e (Vigil, *et al.*, 2001).

O programa DAMMIN fornece muitas soluções (distribuição espacial dos átomos dummies) para o modelo, isto é, gera os mesmos modelos de forma randômica, o qual pode servir como um indicador da estabilidade da solução. O conjunto de programas DAMAVER foi escrito baseado no programa SUPCOMB (Kozin & Svergun, 2001). O programa SUPCOMB alinha dois modelos arbitrários de baixa ou alta resolução representada por conjunto de pontos; a minimização da medida da dissimilaridade é chamada de *normalized spatial discrepancy* (NSD) ou *normalização da discrepância espacial*, uma minimização dos valores das distâncias entre todos os pontos (átomos dummies) do primeiro e do segundo modelo são encontrados, estas distâncias são adicionadas e normalizadas diante das medias das distâncias dos pontos vizinhos dos dois modelos.

Para efetuar a reconstrução e análise do modelo com o DAMAVER, no mínimo dez e no máximo cem modelos independentes devem ser gerados pelo DAMMIN. Os valores da NSD foram computados entre cada par do conjunto e um valor médio de todos os pares (NSD) e de dispersão  $\Delta(\text{NSD})$  foram calculados. Para cada reconstrução do modelo um valor médio de  $\text{NSD}_k$  foi computado e tomado como referência o menor valor de  $\text{NSD}_k$ . Os modelos que possuam valores de  $\text{NSD}_k$  superiores a  $(\text{NSD}) + 2\Delta(\text{NSD})$  são descartados, assim o módulo do SUPCOMP sobrepõe todos os modelos ao modelo de referência criando um conjunto de átomos dummies que são densamente remapeados e caracterizados pelo seu fator de ocupação, a parte central dos modelos formam uma ocupação não-zero resultando em uma região total de propagação ou *total spread region* (TSR), essa região com maior ocupação é selecionado e encontrado o volume mais populoso ou *most populated volume* (MPV) para produzir o volume igual ao volume médio de exclusão de todas as reconstruções, desse modo a

dispersão computada a partir da (MPV) vem a ser o modelo que deverá preservar as características mais prováveis da solução (Volkov & Svergun, 2003).

#### **4. CRY SOL – Programa de avaliação das soluções de espalhamento de raios-X de coordenadas atômicas de macromoléculas biológicas.**

Este programa está baseado na expansão de multipolo para rápido cálculo da média esférica do padrão de espalhamento levando em consideração a camada de hidratação. Fornecendo as coordenadas atômicas (PDB) é possível prever a solução da curva de espalhamento ou ajustar a curva experimental usando apenas dois parâmetros livres, o volume médio do solvente por grupo atômico e o contraste da camada de hidratação (Svergun, *et al.*, 1995).

Comparações entre soluções experimentais de SAXS e estruturas cristalográficas são amplamente aplicadas para validar modelos teóricos e para verificar a similaridade entre estruturas de proteínas cristalinas e em solução para prever a estrutura quaternária (Svergun, *et al.*, 1995).

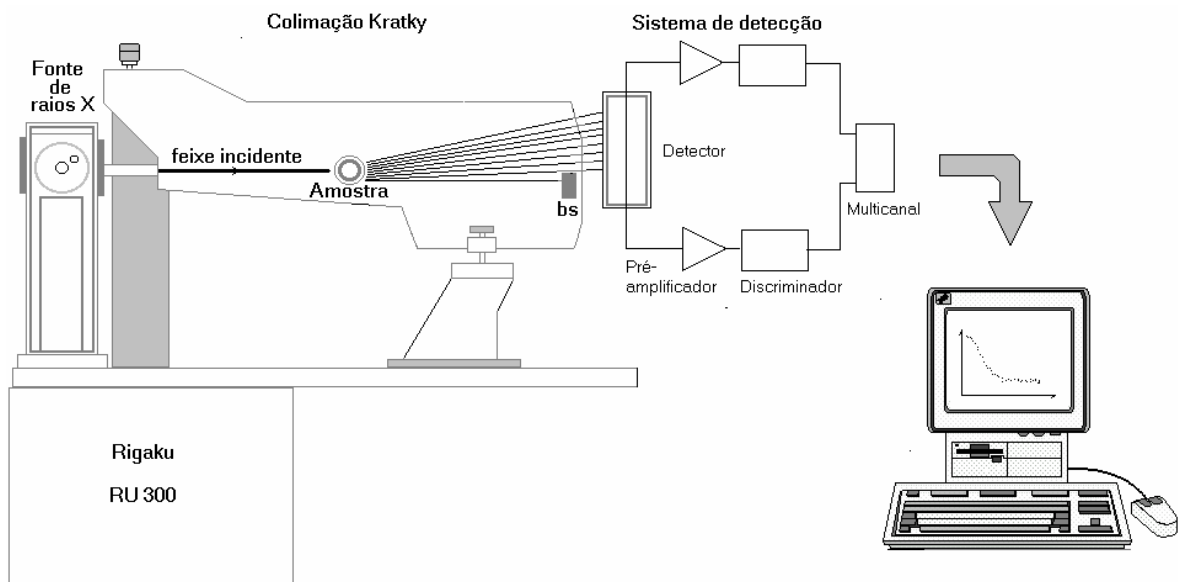
O principal problema para avaliação das curvas de espalhamento de coordenadas atômicas é obter o espalhamento do solvente de forma adequada. Alguns métodos têm sido desenvolvidos, no qual diferem basicamente na representação do volume da partícula que é inacessível ao solvente, no método “fator de espalhamento atômico efetivo” (Langridge, *et al.*, 1960; Fraser, MacRae & Suzuki, 1978; Lattman, 1989), o volume excluído é construído por átomos de solvente dummy o qual ocupam a posição dos átomos nas macromoléculas, esta aproximação é bem justificada na resolução de 10Å a 20Å (a qual está dentro da faixa de trabalho do momento de transferência  $0 \leq q \leq 30 \text{ \AA}^{-1}$ ). Nos modelos de alta resolução o preenchimento do volume excluído pode introduzir desvios sistemáticos, assim um método cúbico e a modificação no preenchimento homogêneo por elementos de volume cúbico fornecem um melhor resultado para o espalhamento dos altos vetores (acima de  $q \geq 30 \text{ \AA}^{-1}$ ) (Fedorov, Ptitsyn & Voronin, 1972; Ninio, Luzzati & Yaniv, 1972).

O programa CRY SOL tem como objetivo de comparar as de curvas de espalhamento experimental com as curvas teóricas dos modelos de estruturas cristalográficas de proteínas, levando em consideração o espalhamento da camada de hidratação assim diminuindo os erros dos desvios sistemáticos, e tem provado ser adequadamente eficiente para tal propósito.

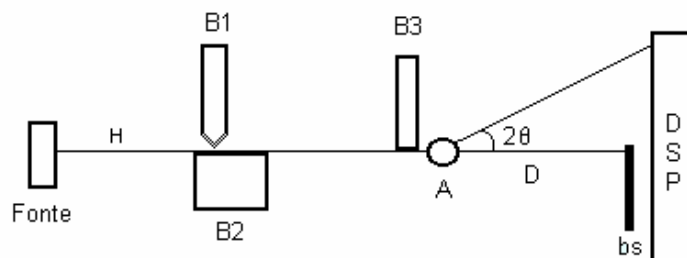
### III. MATERIAIS E METODOS

#### 1. O sistema de colimação (ânodo rotatório – câmara de Kratky)

Em nossos experimentos, utilizamos o sistema de colimação por blocos que também é conhecido por “sistema de colimação Kratky” ou simplesmente “câmara de Kratky”. Este sistema pode diminuir drasticamente o problema do espalhamento parasita permitindo que se alcance menores ângulos de espalhamento no qual será mostrado nas Figuras 7 e 8, este sistema também possui uma outra vantagem onde a câmara é dotada de um porta-amostra interno, com isso a amostra é mantida no vácuo resolvendo as possíveis interferências do espalhamento do ar.



**Figura 7:** Desenho esquemático da fonte de raios-X ânodo rotatório, aqui o equipamento é mostrado de uma forma completa, (fonte de raios-X, câmara de colimação Kratky, sistema de detecção e computador). (dos Santos, 2003).



**Figura 8:** Esquema do sistema de colimação Kratky. (dos Santos, 2003).

A fonte de radiação é perpendicular ao feixe, como no esquema da câmara de

Kratky, representado na figura 8. A colimação do feixe é realizada por três elementos estruturais, que são os blocos com superfície polida representados por  $B_1$ ,  $B_2$  e  $B_3$ .  $D$  é a distância da amostra ao detector sensível à posição (D. S. P.). O beam stop (bs) é um aparato mecânico que protege o detector da incidência direta do feixe de raios-X. “A” é o local onde a amostra será disposta para efetuar o espalhamento e  $2\theta$  é o ângulo de espalhamento.

Este tipo de colimação por blocos dá a geometria do feixe uma secção transversal, possuindo a forma de um trapézio com altura variando de 3,0 a 4,0 mm e largura de 1 mm.

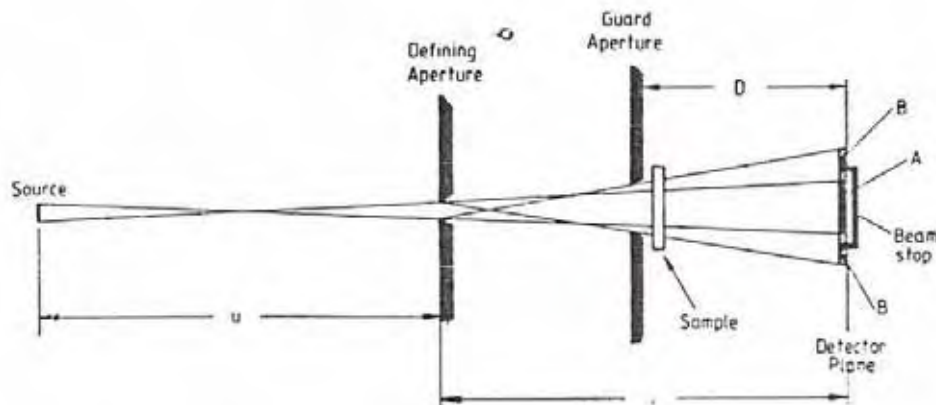
## **2. Monocromatização**

A correta interpretação dos experimentos de SAXS utilizando ânodo rotatório (constituído de ânodo de cobre) exige o conhecimento prévio da curva correspondente à radiação monocromática. Os efeitos policromáticos devem ser eliminados. É de conhecimento técnico que a radiação do ânodo de cobre produz dois comprimentos de onda na geração dos raios-X; o comprimento de onda chamado de  $CuK\alpha = 1,54 \text{ \AA}$  e o comprimento de onda chamado de  $CuK\beta = 1,39 \text{ \AA}$ , este último deve ser eliminado.

Para eliminar o comprimento de onda  $CuK\beta$  utilizamos de filtros. Estes filtros são nada mais do que folhas de níquel, no nosso equipamento a espessura das folhas de 20  $\mu\text{m}$  foi suficiente para absorver o comprimento de onda  $k\beta$ .

## **3. Colimação e fonte de radiação sincrotron**

A forma de colimação no sistema sincrotron é chamada de “colimação pontual”. A colimação é mais facilmente alcançada pelo uso da fonte pontual e duas aberturas sucessivas como mostrado na Figura 9. A primeira abertura define o feixe e a segunda abertura limita o espalhamento da primeira abertura.



**Figura 9:** Diagrama mostrando a geometria da câmara de colimação pontual. O feixe colimado ao plano do detector é representado por (A) que é o diâmetro angular. Os pequenos ângulos são observados pelo diâmetro (B). Os parâmetros  $u$ ,  $v$  e  $D$  devem ser escolhidos de acordo com cada caso experimental para otimizar a intensidade. (Glatter, 1982).

Utilizando a fonte de radiação síncrotron, obtém-se algumas vantagens sobre o sistema convencional (ânodo rotatório); a) muito alta intensidade; b) ótima colimação intrínseca; c) fonte é branca; d) a radiação é emitida em pulsos a alguns décimos de nanosegundos com uma frequência de repetição de um megahertz.

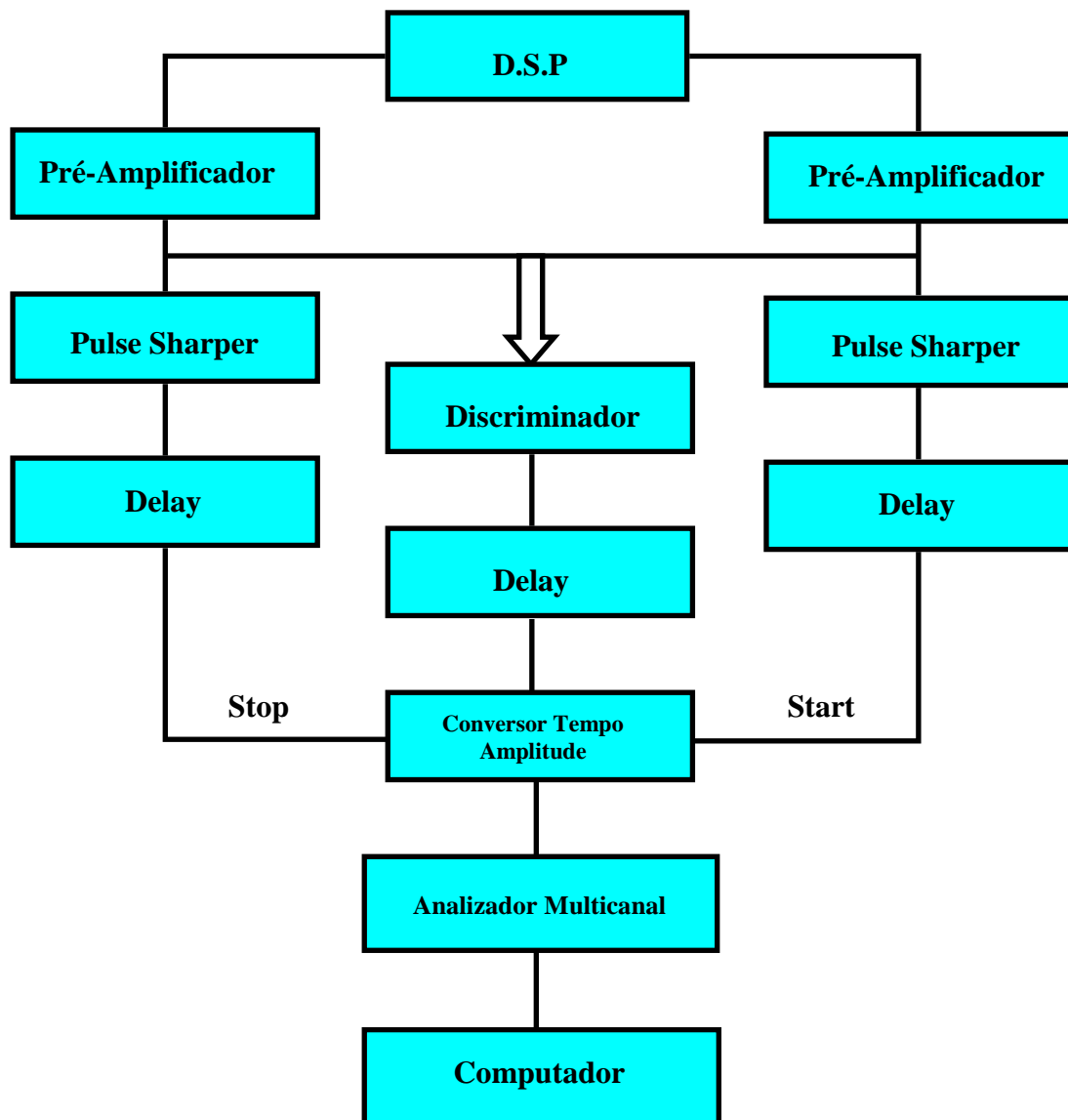
A geração da radiação é descrita da seguinte forma: uma placa metálica situada em um acelerador de partículas chamado de injetor é bombardeada por ondas de rádio frequência, as quais retirarão elétrons desta placa metálica, e estes são acelerados em um “booster” um anel de menor proporção depois esses elétrons passam a ser armazenados no anel principal e viajam a uma alta velocidade sendo forçados a uma trajetória circular devido aos eletroímãs dispostos nas tangentes do anel.

#### 4. Detector

O detector utilizado em nossos experimentos de SAXS foi o D.S.P. – Detector Sensível a Posição, em ambas as fontes de raios X, (ânodo rotatório e luz síncrotron).

O sistema de detecção é descrito da seguinte forma: o detector está acoplado a um pré-amplificador, amplificadores, analisador, discriminador, somador de ondas e por fim a um computador, observável na Figura 10. O detector é constituído por um filamento de quartzo, revestido de carbono, que será preenchido por uma mistura gasosa de (90% de Xe e 10% de CH<sub>4</sub>), sob uma pressão de 75 PSI. O fóton espalhado pela amostra ioniza o gás que irá descarregar no filamento.

O sinal gerado é enviado para cada um dos lados do detector, os quais chegam com uma diferença de tempo. Estes sinais são amplificados e disparam um pulso (start e stop). Essa diferença de tempo de chegada determina a posição de entrada do fóton. A função do “delay” é para garantir que o sinal start sempre chegue primeiro, e então este sinal é convertido a uma voltagem, que será enviada ao multicanal.



**Figura 10:** Esquema do detector sensível à posição e sua eletrônica.

## **Calibração do sistema de raios-x ânodo rotatório:**

### **1. Alinhamento da câmara de Kratky**

O primeiro passo para a calibração é certificar que a câmara esta perfeitamente alinhada em relação à fonte e o detector. Para isso diminuimos a tensão em 20 kV e 10 mA e adicionamos 5 filtros de níquel (aproximadamente 72  $\mu\text{m}$  de espessura) na saída do tubo de raios X, como uma medida de segurança para não queimar o detector, pois neste procedimento trabalha-se sem o beam stop.

O alinhamento da câmara é feito com um nível. Após estar nivelado determinamos a abertura do feixe que deve ser 30 mm, com o laboratório totalmente no escuro e, utilizando uma placa graduada que em sua superfície possui um material que é fosforescente quando excitado com os raios X, verificamos se a abertura realmente condiz com os 30 mm.

Posteriormente, é preciso verificar se o feixe esta passando na posição em que a amostra estará situada dentro do porta amostra, sendo que a abertura da janela do porta amostra é de 1 mm de comprimento por 20 mm de altura. A posição do porta amostra e do feixe é horizontal. Com a utilização de uma pequena barra de metal com as medidas características do porta amostra, tampamos os feixe e observamos se há fluorescência na placa graduada. Caso ocorra fluorescência, o feixe não esta alinhado com o porta amostra, ou seja, quando o porta amostra é tampado não deverá aparecer fluorescência, este é o parâmetro adotado para o alinhamento da câmara de Kratky.

### **2. Linearidade do detector**

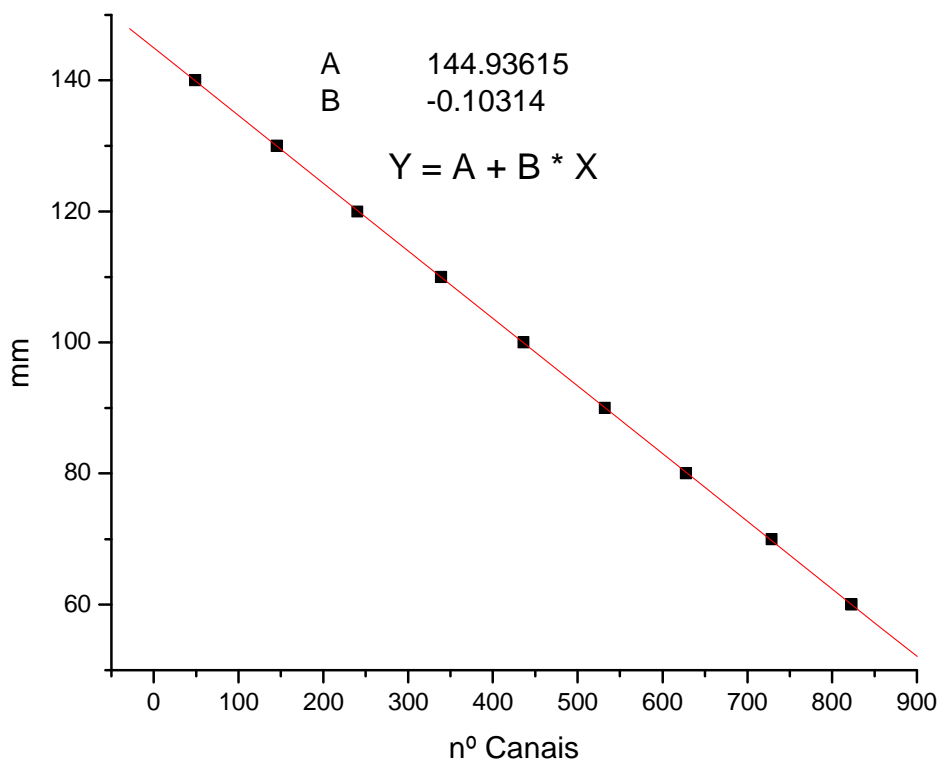
As condições para a “calibração” e determinação da linearidade do detector são as mesmas descritas no alinhamento da câmara.

A distância do detector ao porta- amostra é de 210 mm.

Foram feitas medidas sucessivas variando a altura do detector de 10 em 10 mm em um intervalo de tempo de 120 segundos de exposição ao feixe, e determinado à posição do canal. Essas posições estão descritas na tabela I. Com essas medidas é possível traçar uma reta e obter o coeficiente angular da reta que nos fornece a relação ( $k = \text{mm/canal}$ ).

**Tabela I:** Valores para a construção do gráfico de linearidade do detector.

Posição do detector em mm (eixo y)	Numero de canais (eixo x)
60	823
70	729
80	628
90	532
100	436
110	339
120	240
130	145
140	49



**Figura 11:** Curva de calibração do detector. Determinado o coeficiente angular da inclinação da reta alcança a relação (mm/canal).

Empregando as condições experimentais como: distância do detector a amostra, comprimento de onda e o coeficiente angular da reta de linearidade do detector, é possível calcular o passo do vetor de espalhamento (q).

$$D = 210 \text{ mm} .$$

$$\lambda = 1,54 \text{ \AA} .$$

$$k = 0,10314 \text{ mm/canais} .$$

Como é de conhecimento que o ângulo de espalhamento é  $2\theta$  .

$$S = \frac{2\theta}{\lambda} \Rightarrow \frac{\varepsilon}{\lambda} \Rightarrow \varepsilon = \frac{0,10314 \text{ mm/canais}}{210\text{mm}} \cdot \Delta N = 0,0005 \cdot \Delta N (\text{radianos})$$

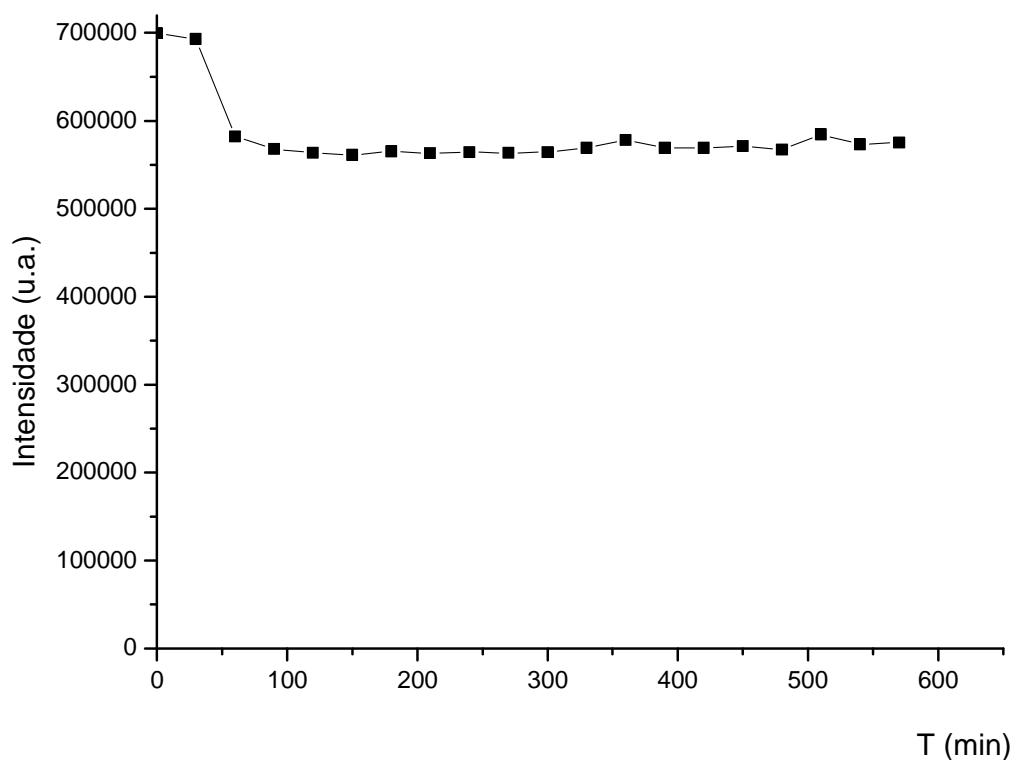
$\Delta N$  = número de canais

$$\varepsilon(\text{graus}) = 0,0005 \cdot \left( \frac{180}{\pi} \right) \cdot \Delta N = 0,0281 \cdot \Delta N$$

$$S(\text{radianos}) = \frac{0,0005}{1,54} \cdot \Delta N = 0,00032 \cdot \text{\AA}^{-1} \cdot \Delta N$$

$$q = 2\pi S \Rightarrow 2\pi 0,00032 \cdot \text{\AA}^{-1} \cdot \Delta N = 0,00201 \cdot \text{\AA}^{-1} \cdot \Delta N \Rightarrow \text{passo}$$

### 3. Estabilidade do feixe dos raios x ânodo rotatório



**Figura 12:** Gráfico da estabilidade do feixe (tempo x intensidade).

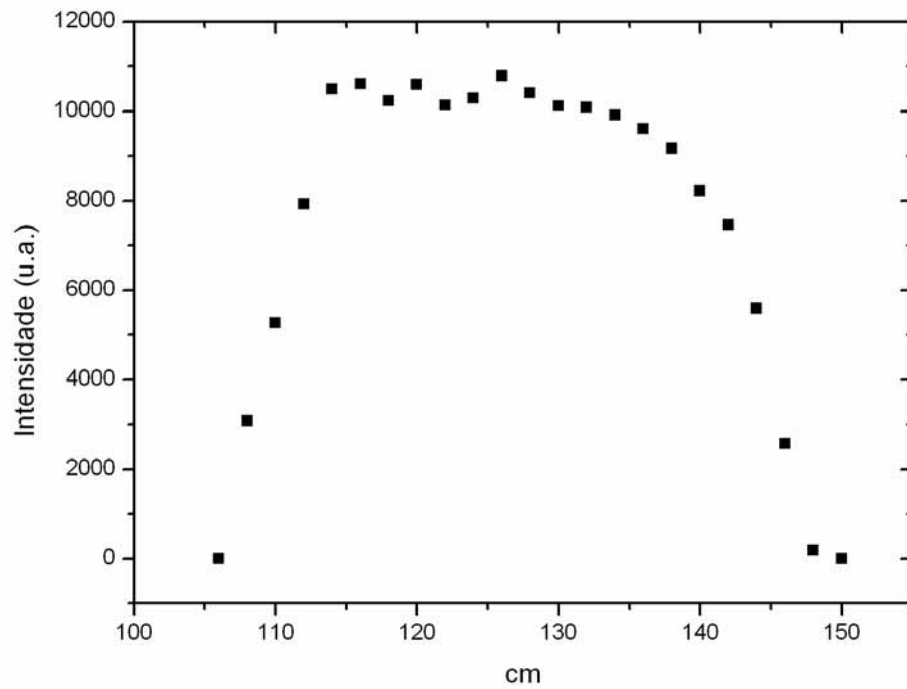
Como apresentado na Figura 12, o teste de estabilidade foi realizado expondo uma amostra padrão ao feixe de raios X e determinando a variação da intensidade, e observamos que o feixe torna estável após 100 minutos. A amostra padrão utilizada foi Lupolen. O tempo de exposição do Lupolen foi de 5 minutos, foi respeitado um intervalo de 30 minutos entre as coletas de dados, o tempo total do teste foi de 7 horas aproximadamente, e a potencia do equipamento foi ajustado em 40 kV e 100 mA.

### 4. Perfil do feixe e correção geométrica

A técnica de SAXS foi desenvolvida para feixe pontual, como o sistema de colimação por blocos dá a característica do feixe à forma de um trapézio, chamado de feixe linear infinito, é necessária correção geométrica. Para que seja possível essa correção é essencial o conhecimento das qualidades do feixe, como; o perfil comprimento e o perfil altura do feixe.

Para determinar o perfil comprimento ajustamos a intensidade em 20 kV e 10 mA, as medidas foram feitas com o tempo de exposição de 120 segundos, e variamos a

altura do detector em um intervalo de 2 em 2 mm, os valores obtidos estão representados na Tabela II.

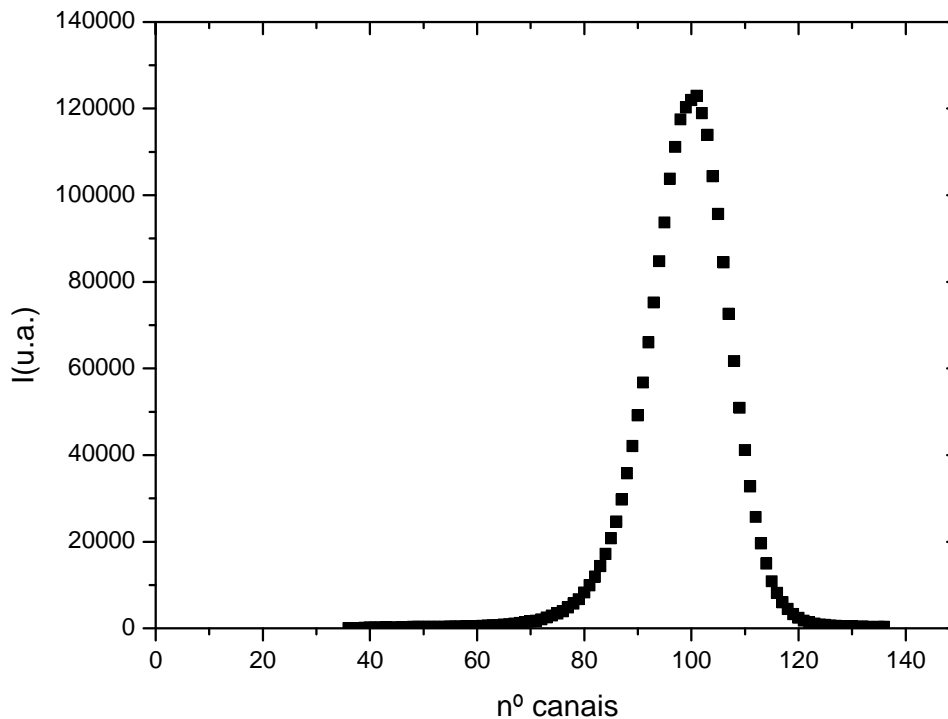


**Figura 13:** Gráfico do perfil horizontal do feixe. Forma trapezoidal do perfil comprimento para a correção geométrica, perpendicular em relação a q.

**Tabela II:** Valores obtidos para a construção do gráfico do perfil horizontal do feixe.

<b>Posição detector (mm)</b>	<b>Intensidade do feixe</b>	<b>Nº do canal</b>
150	0	0
148	179	96
146	2560	95
144	5585	97
142	7459	99
140	8221	99
138	9158	99
136	9598	99
134	9905	102
132	10086	106
130	10110	104
128	10405	107
126	10779	107
124	10286	108
122	10132	109
120	10592	108
118	10232	108
116	10616	109
114	10495	109
112	7923	109
110	5265	110
108	3082	110
106	0	0

Como citado acima, o perfil comprimento tem a forma geométrica de um trapézio, isto pode ser observado na Figura 13, e esta informação em conjunto com o perfil altura representado na Figura 14 servirá para fazer as correções necessárias para transformar o feixe, de característica linear infinito para pontual.



**Figura 14:** Gráfico do perfil do feixe vertical. Definindo a largura do feixe.

A correção do feixe só é possível através dos parâmetros AH, AW, LH e LW, que são calculados do perfil do feixe trapezoidal. A altura da fenda do detector no plano é facultado pelo parâmetro AH. LH é a altura da fenda, e similarmente os parâmetros AW e LW são a largura da fenda do detector.

Idealizando o trapézio e examinando a Figura 13 do perfil comprimento, a face superior ou o menor lado é  $(A - L)$ , e a face inferior ou o maior lado é  $(A + L)$ , ambos estão em uma direção perpendicular e paralela ao alinhamento do detector. Para o efeito da fenda superior  $(A - L)$ ,  $A = AH$ ,  $L = LH$ ; e o caso posterior ou seja a fenda inferior que representa o efeito da largura da fenda  $(A + L)$ ,  $A = AW$  e  $L = LW$ . As unidades para AH, LH, AW e LW devem ser as mesmas para o vetor de espalhamento  $\hat{A}^{-1}$ .

O primeiro passo é encontrar os valores de A e L, para isso utilizamos uma matemática simples, onde medimos a face superior e inferior do trapézio ou do perfil do feixe ao longo do seu comprimento, como segue:

$$A - L = 29,71\text{mm}$$

$$A + L = 47,35\text{mm}$$

$$2A = 77,06\text{mm}$$

$$A = \frac{77,06}{2} = 38,53\text{mm}$$

$$L = 47,35 - 38,53 = 8,82\text{mm}$$

Então os valores são:  $A = 38,53\text{mm}$  e  $L = 8,82\text{mm}$ .

Para calcular os parâmetros AH, LH, AW e LW aplicam a seguinte fórmula matemática;

$$AH = \frac{2\pi}{\lambda} \left[ \frac{AH'}{D} \right] \quad (26)$$

Como conhecemos os termos podemos reduzir a uma constante.

$$\frac{2\pi}{1,54 \cdot 210} = 0,01943 \text{ \AA}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$$

Sabemos que;

AH = perfil do feixe ao longo do seu comprimento (valor de A = largura)

LH = valor de (L), aproximadamente o tamanho da janela do detector.

AW = perfil largura do feixe.

LW = passo do detector.

Agora só temos o trabalho de multiplicar cada valor a sua referente pela constante, então temos:

$$AH = 0,01943 \cdot 38,53 = 0,7486$$

$$LH = 0,01943 \cdot 8,82 = 0,1714$$

$$AW = 0,01943 \cdot 1,0 = 0,01943$$

$$LW = 0,00201$$

Todos os resultados estão na mesma grandeza, ou seja,  $\text{\AA}^{-1}$ .

## 5. Normalização e extrapolação das curvas a concentração zero

O experimento de SAXS para proteínas é realizado em solução, isso conduz a coleta de dados da solução contendo a proteína, juntamente com a coleta de dado somente da solução tampão, esta última é chamado de branco.

Este procedimento é fundamental para obter o espalhamento apenas do material de estudo, uma simples expressão é necessária para fazer a normalização das curvas.

$$J(q) = \frac{A_p \cdot I(q)_p}{x \cdot J(q)_d \cdot \Delta t} - \frac{A_b \cdot I(q)_b}{x \cdot J(q)_d \cdot \Delta t} \quad (27.a)$$

Onde:

$A_p$  = Atenuação da amostra (proteína).

$A_b$  = Atenuação da solução tampão (branco).

$I(q)_p$  = Intensidade de espalhamento da amostra.

$I(q)_b$  = Intensidade de espalhamento do branco.

$x$  = espessura da amostra e do branco.

$J(q)_d$  = Intensidade do feixe direto.

$\Delta t$  = variação do tempo de exposição.

$J(q)$  = Curva de espalhamento normalizada, ou seja, somente o espalhamento da proteína.

Alguns termos são comuns, como o tempo de exposição, a espessura do capilar, assim pode-se rearranjar a Equação;

$$J(q) = \frac{A_p \cdot I(q)_p}{J(q)_d} - \frac{A_b \cdot I(q)_b}{J(q)_d} \quad (27.b)$$

Pode-se reduzir ainda mais essa Equação, tratando as atenuações da amostra e do branco sobre o feixe direto como constante, temos então;

$$Ak_1 = \frac{A_p}{J(q)_d}; \quad Ak_2 = \frac{A_b}{J(q)_d} \quad (27.c)$$

Assim fica;

$$J(q) = (I(q)_p \cdot Ak_1) - (I(q)_b \cdot Ak_2) \quad (27.d)$$

Os experimentos em ângulo rotatório foram feitos com tubos capilares de vidro Lyndemann de 1 mm de espessura, e os experimentos no LNLS foram feitos em porta-amostras específicos para o sistema sincrotron, com janela de mica.

As medidas em ângulo rotatório foram realizadas respeitando o tempo de exposição de 7200 segundos, e as medidas no LNLS com um tempo menor de 600 segundos.

A atenuação é definida como a razão entre a intensidade do feixe incidente pela intensidade do feixe transmitido pela amostra. Para calcular a atenuação da amostra e do branco no equipamento ânodo rotatório seguimos o seguinte procedimento: Servindo do padrão de Lupolen, e do porta amostra adaptado, obtemos os dados da curva de espalhamento do Lupolen e da amostra ao mesmo tempo, o tempo de exposição foi de 100 segundos. A determinação do feixe direto considera apenas os dados da curva de espalhamento do Lupolen sozinho, também com o tempo de exposição ao feixe de 100 segundos. A determinação da atenuação na fonte sincrotron é totalmente automatizada assim não é necessário nenhum trabalho extra, pois o sistema nos fornece esses parâmetros.

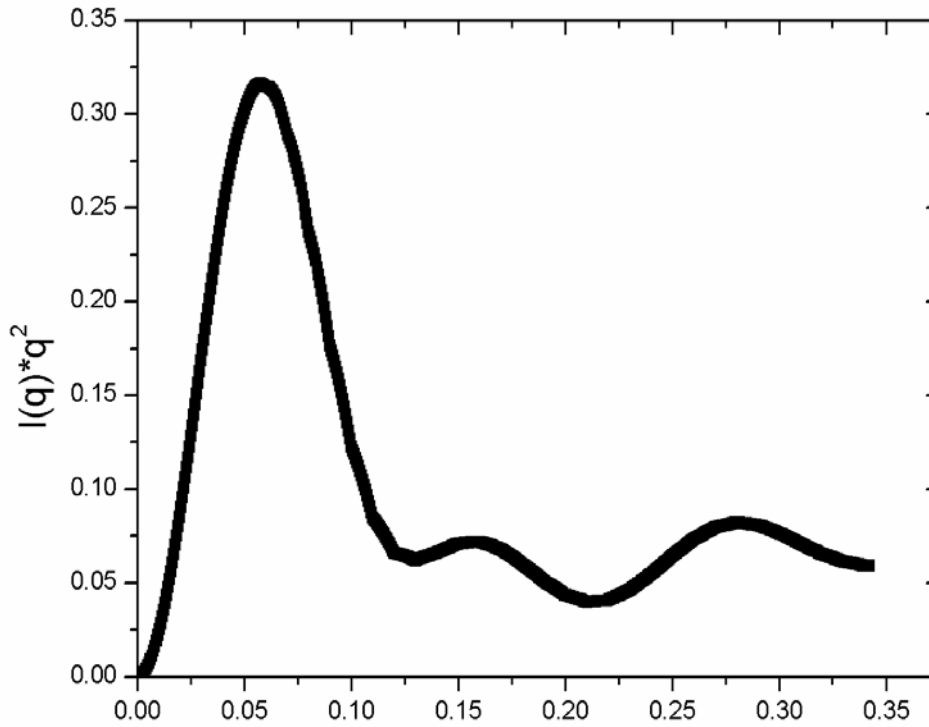
Os experimentos em SAXS devem ser realizados com variação decrescentes das concentrações das amostras, é indispensável esse processo, pois toda a teoria de espalhamento foi concebida levando-se em conta o espalhamento de uma única partícula, assim é possível realizar a extrapolação a concentração zero ou a diluição infinita.

As concentrações empregadas no ânodo rotatório foram de 15 mg/ml, 10 mg/ml e 5 mg/ml, nas fontes de radiação sincrotron foram 8 mg/ml, 5 mg/ml e 2 mg/ml.

Para a extrapolação propriamente dita à concentração zero, primeiramente normalizamos a intensidade das curvas em relação a sua própria concentração  $J(\mathbf{q})/C$ , e aplicamos o método dos mínimos quadrados.

## **6. Cálculo do volume e da superfície**

Para calcular o volume e a superfície das macromoléculas é fundamental obter o valor da invariante  $Q$ , através da integração da área do gráfico representado na Figura 15. O cálculo da invariante  $Q$  esta demonstrada na Equação 13, sendo que aqui será dada a sua solução para exemplo de sua aplicação.



**Figura 15:** Invariante Q, calculando a área da curva  $[I(q) \cdot q^2 \text{ vs } q]$  obtém-se o valor do  $Q_0$ .

$$Q = \int_0^{\infty} I(q)q^2 dq = \int_0^{q_{\text{máx}}} I(q)q^2 dq - \alpha_P \int_0^{q_{\text{Máx}}} q^2 dq + \beta_P \int_{q_{\text{Máx}}}^{\infty} \frac{dq}{q^2} \quad (28)$$

Onde:

- § A primeira integral do lado esquerdo é o valor do  $Q_0$ .
- § O  $\alpha_P$  e o  $\beta_P$  são os valores das constantes de Porod; são respectivamente o coeficiente angular da inclinação da reta e o coeficiente linear ou intersepto do eixo Y representado na Figura 20 (ver resultados).

Resolvendo as integrais acima temos:

$$Q = Q_0 - \alpha_P \frac{q_{\text{Máx}}^3}{3} + \frac{\beta_P}{q_{\text{Máx}}} \quad (29)$$

O volume da macromolécula fica:

$$V = \frac{2 \cdot \pi^2 \cdot I(0)}{Q} \quad (30)$$

A superfície da macromolécula fica:

$$S = \frac{\pi \cdot \beta_P \cdot V}{Q} \quad (31)$$

## Preparação das amostras

### 1. Bothrops Toxin I e II

A amostra foi purificada do veneno bruto da serpente **B. jararacussu** de acordo com o protocolo publicado por (Spencer, et al., 1998). As curvas de espalhamento de raios-X a baixo ângulo foram conduzidas à temperatura ambiente e obtidas na linha D11A-SAXS do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS). O comprimento de onda utilizado foi de 1,488Å. A amostra foi diluída no tampão Tris-HCL 20mM de concentração de sal e ajustado no pH 7,0. Para a extrapolação a concentração zero foram coletadas as curvas em duas concentrações 10,0 e 4,0 mg/ml. As curvas foram coletadas com o detector a gás bi-dimensional sensível à posição com 2048 canais e foi ajustado a uma distância de 660 mm da amostra, e o tempo de exposição da amostra ao raio-X foi de 600s.

### 2. Lotus tetragonolobus lectin (LTA).

A amostra de LTA foi purificada como descrito por (Moreno et al., 2006). As curvas de espalhamento foram coletadas no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS), na linha D11A-SAXS, em temperatura ambiente utilizando do detector a gás bi-dimensional sensível à posição com 2048 canais a uma distância de 831mm da amostra. A amostra de LTA foi dissolvida em tampão TRIS-HCl 10mM com uma mistura de sais  $\text{CaCl}_2$  e  $\text{MnCl}_2$  com 18mM de concentração, no pH 7,6. Para eventual extrapolação a concentração zero, foram coletadas as curvas em três concentrações 10,0, 6,0 e 3,0 mg/ml respectivamente. O comprimento de onda foi ajustado para 1,488 Å.

### 3. Corismato Sintase (CS)

As curvas de espalhamento foram coletadas no laboratório de biocristalografia do Departamento de Física da UNESP- IBILCE, utilizando de uma fonte de raios X, constituída por um ânodo rotatório de cobre da marca RIGAKU DENKY RU, com comprimento de onda característico ( $\text{CuK}_\alpha - 1,54\text{Å}$ ) e potência de operação de 4 Kw, o alinhamento do feixe de raios X é feito com um sistema de colimação por blocos, este equipamento é dotado de uma câmara de Kratky com um porta amostra adaptado no interior da câmara e assim o espalhamento da amostra é totalmente no vácuo com isso diminuindo o espalhamento parasita e a absorção de raios X pelas moléculas de ar. A amostra é colocada em um capilar de vidro Lyndemann de 1 mm de diâmetro interno e

encaixado no porta amostra na posição horizontal, a intensidade de espalhamento foram registrada através de um detector sensível a posição Tennelec PSD-1000 situado a 210 mm da amostra com 1024 canais, as intensidades foram amplificadas, discriminadas, analisadas e convertidas em contas por segundo através do sistema MCA modelo 916 da (EG&G ORTEC). As soluções de proteínas com o solvente foram expostas por um período de 2 horas diante do feixe de raios X.

A amostra de CS foi dissolvida em um tampão pH 7,5 Tris-HCl 50mM, em três diferentes concentrações 15mg/ml, 10mg/ml e 5mg/ml, com o intuito de obter a curva extrapolada a concentração zero as curvas foram coletadas em temperatura ambiente 25°C com uma faixa angular de  $0,02814 \text{ \AA}^{-1} < q < 0,2955 \text{ \AA}^{-1}$ , onde  $q$  é o vetor de espalhamento definido como  $q = 4\pi \sin\theta/\lambda$  e  $2\theta$  representa o ângulo de espalhamento.

#### 4. Crotoxina

A crotoxina foi purificada como descrito por (Hendon and Fraenkel-Conrat 1971). As curvas de espalhamento foram coletadas no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS), na linha D11A-SAXS, em temperatura ambiente utilizando do detector a gás bi-dimensional sensível à posição com 2048 canais a uma distância de 648 mm da amostra. A amostra de crotoxina foi dissolvida nos tampões: ácido cítrico/citrato de sódio concentração 20 mM e ajustado para o pH 3,5; fosfato de sódio monobásico e di-básico 20 mM e ajustado para o pH 6,6; glicina 20 mM ajustado para o pH 10,0, para extrapolar a concentração zero, foram coletadas as curvas em três concentrações 15,0, 10,0 e 5,0 mg/ml respectivamente. O comprimento de onda foi ajustado para  $1,488 \text{ \AA}$ .

#### 5. Fosfolipase e Crotapotina

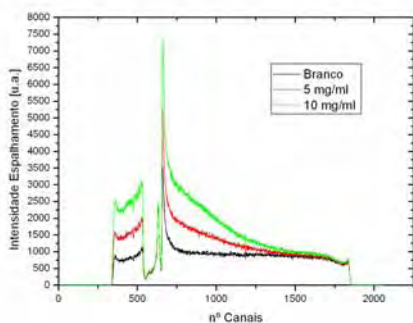
As amostras da fosfolipase e crotapotina foram isoladas do veneno bruto da serpente **Crotalus durissus terrificus** de acordo com o protocolo de (Laure, 1975). As curvas de espalhamento foram coletadas no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS), na linha D11A-SAXS, em temperatura ambiente utilizando do detector a gás bi-dimensional sensível à posição com 2048 canais a uma distância de 648 mm da amostra. A amostra foi diluída no tampão Tris-HCL 20mM e ajustado no pH 7, com adição de 25 mM de NaCl, e para a extrapolação a concentração zero foram coletadas as curvas em três concentrações 15,0, 10,0 e 5,0 mg/ml respectivamente. O comprimento de onda foi ajustado para  $1,488 \text{ \AA}$ .

## **Eletroforese**

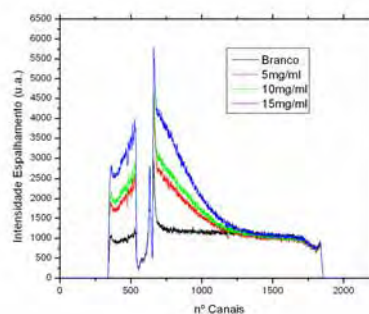
O grau de pureza da proteína foi verificado pela técnica de eletroforese descrita por (Laemmli, 1970), com gel desnaturante (SDS – PAGE) 9,5% de poliacrilamida. As condições de corrida do gel foram de 170V e 30mA. O gel foi corado com nitrato de prata (Morrissey, 1981).

## IV. RESULTADOS E DISCUSSÕES

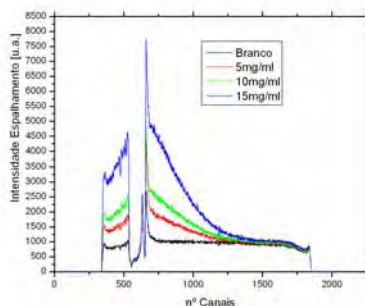
As intensidades de espalhamento de raios-X a baixo ângulo de algumas proteínas envolvidas neste trabalho, obtidas diretamente da fonte de luz síncrotron e da fonte de ânodo rotatório RIGAKU DENKY, são apresentadas na Figura 16. Essas curvas são submetidas à Equação 2.d, em que será subtraído o espalhamento da proteína e do solvente e a minimização do efeito de ruído do espalhamento parasita pelas suas respectivas atenuações. Assim, têm-se as curvas corrigidas contendo apenas o espalhamento médio da partícula que está sendo pesquisada. Posteriormente, será realizada a normalização pela concentração respectiva de cada amostra referente à sua curva de espalhamento e extrapoladas a concentração zero como descrito anteriormente (ver Materiais e Métodos E.1).



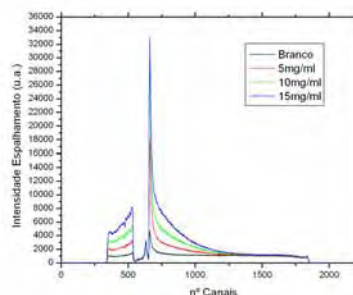
a) BthTX – I pH 7,0.



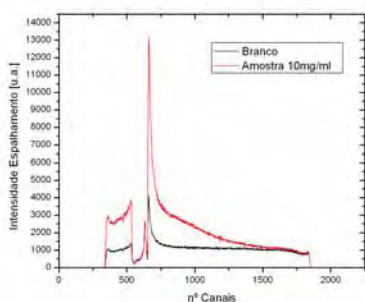
b) Crotoxina pH 3,5.



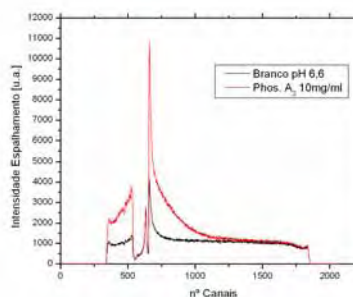
c) Crotoxina pH 6,6.



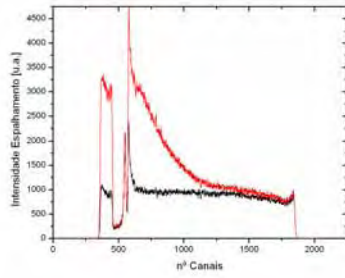
d) Crotoxina pH 10,0.



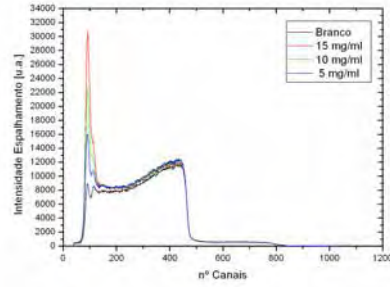
e) Crotopatina pH 7,0.



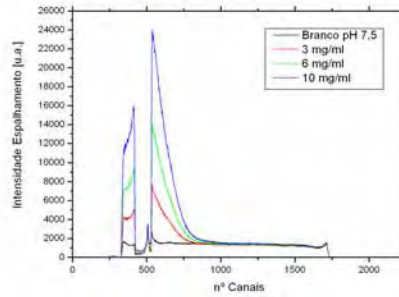
f) Fosfolipase.



g) BthTX-II



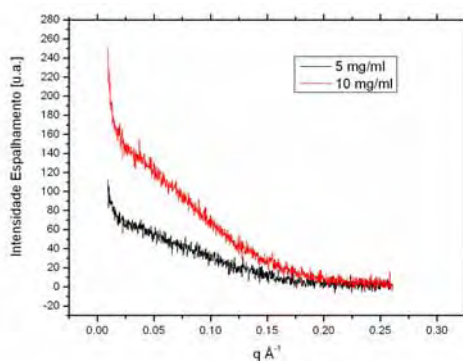
h) Corismato Sintase.



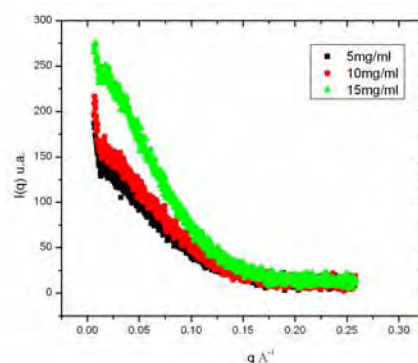
i) Lótus tetragonolobus lectin.

**Figura 16:** Medidas experimentais de SAXS realizado no LNLS e ânodo rotatório (RIGAKU DENKI) na temperatura ambiente.

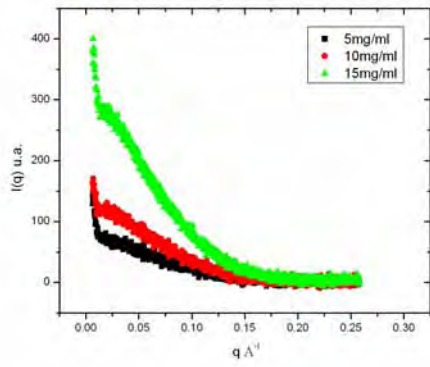
Agora, podem-se observar nas Figuras 17 e 18 as curvas normalizadas e extrapoladas e fazer nota sobre as coincidências nos finais das curvas na região dos altos ângulos (região de Porod). Isso se deve ao fato de não possuir grandes flutuações internas na densidade eletrônica.



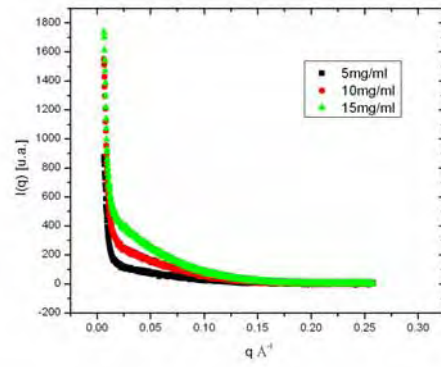
a) BthTX-I pH 7.0.



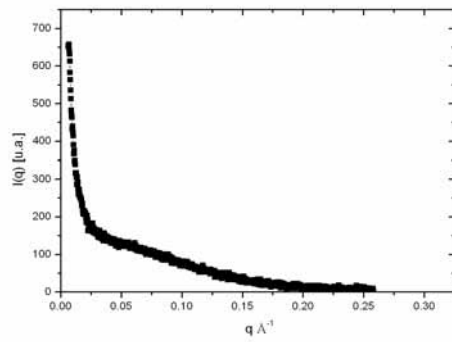
b) Crotoxina pH 3,5.



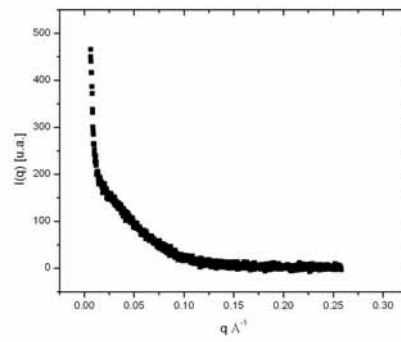
c) Crotoxina pH 6,6.



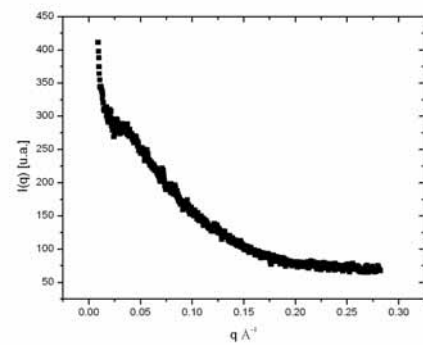
d) Crotoxina pH 10,0.



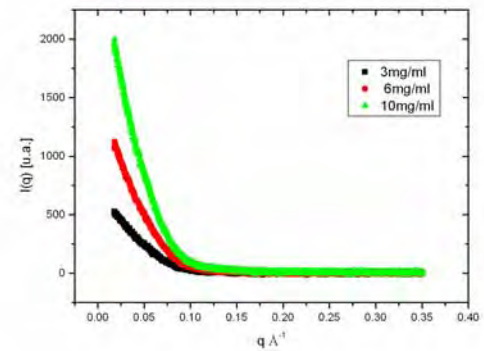
e) Crotopotina pH 7,0.



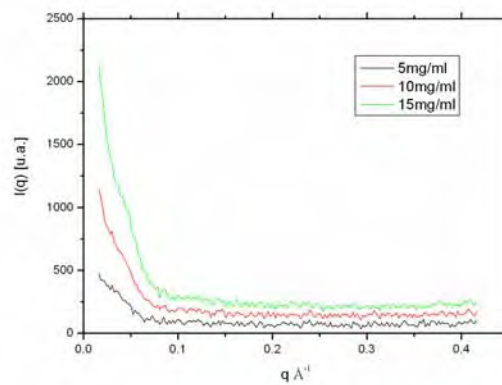
f) Fosfolipase pH 7,0



g) BthTX - II.

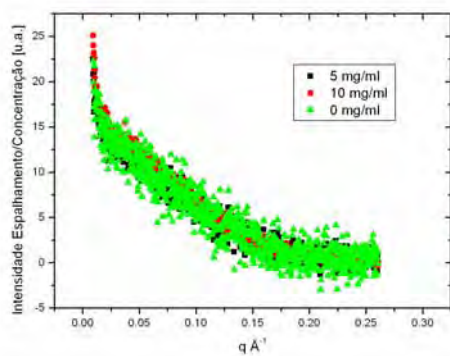


h) LTA.

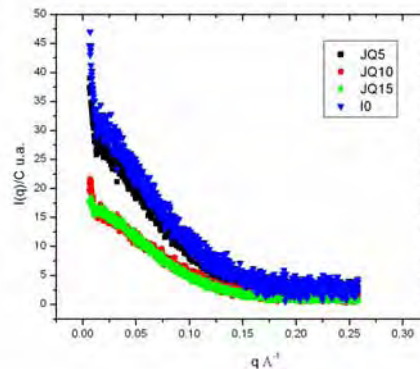


i) Corismato Sintase.

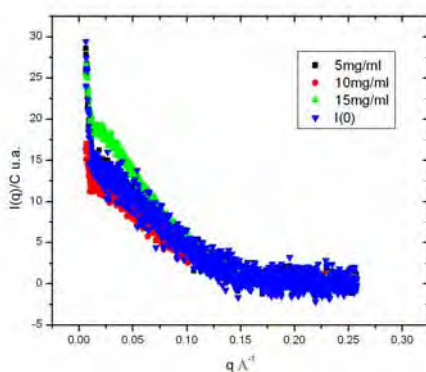
**Figura 17:** Curvas de intensidade de espalhamento das proteínas em suas respectivas concentrações corrigidas e subtraídas a intensidade de espalhamento do tampão.



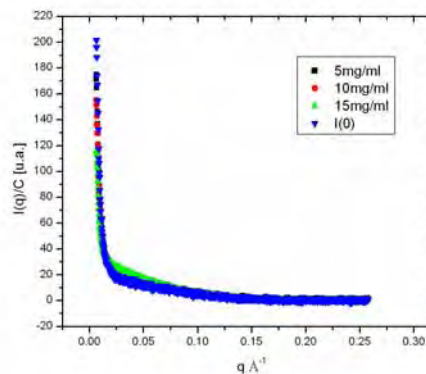
a) BthTX – I pH 7,0.



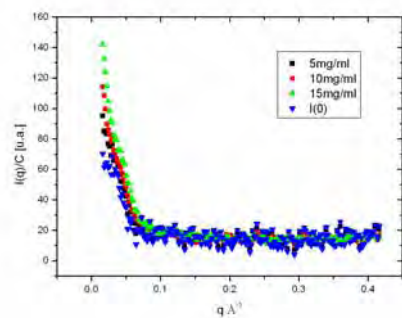
b) Crotoxina pH 3,5.



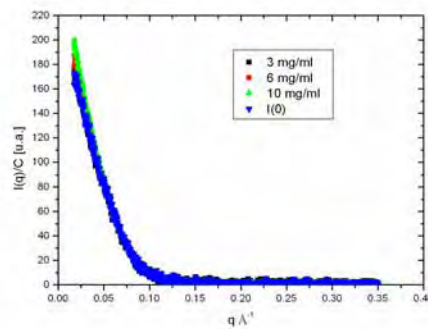
c) Crotoxina pH 6,6.



d) Crotoxina pH 10,0.



e) Corismato Sintase.

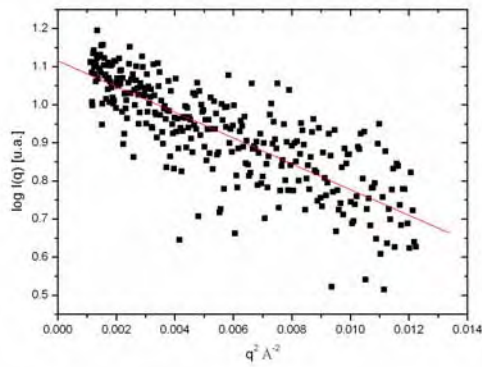


f) LTA.

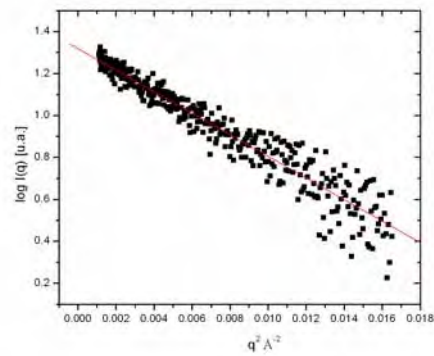
**Figura 18:** Curvas de intensidade de espalhamento das proteínas em suas respectivas concentrações normalizadas e extrapoladas a concentração 0 mg/ml.

Na Figura 19 são apresentados os gráficos da região da curva de espalhamento que representa a Lei de Guinier. Seguiu-se a teoria contida no Capítulo “Introdução: 6. Aproximação de Guinier”, mais especificamente aplica-se à Equação 19 para a aproximação do raio de giração, em que calculou-se o logaritmo da intensidade de espalhamento e elevou-se o vetor de espalhamento à segunda potência, o que forneceu uma inclinação negativa.

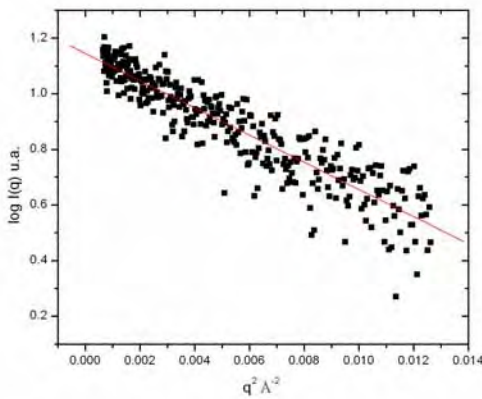
Aplicando a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, obtém-se o coeficiente angular, que é o valor de  $\alpha$  o qual será então executado na Equação 19, e que resulta no raio de giração aproximado específico para cada proteína em questão.



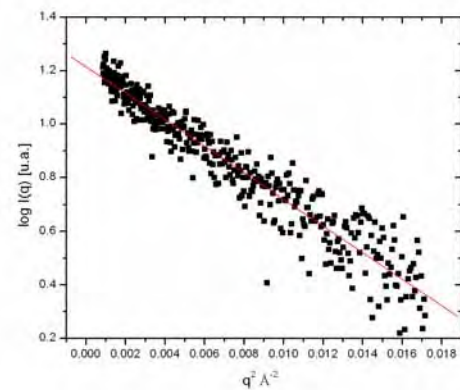
a) BthTX-I pH 7,0.



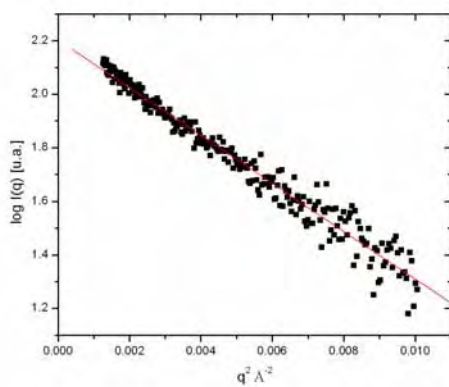
b) Crotoxina pH 3,5.



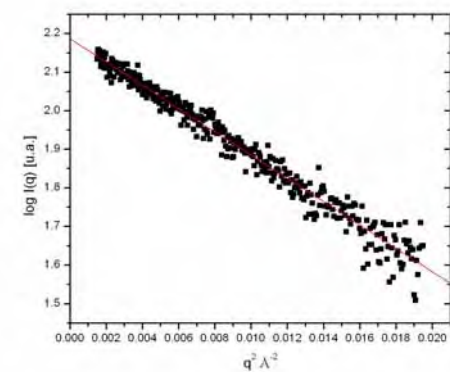
c) Crotoxina pH 6,6.



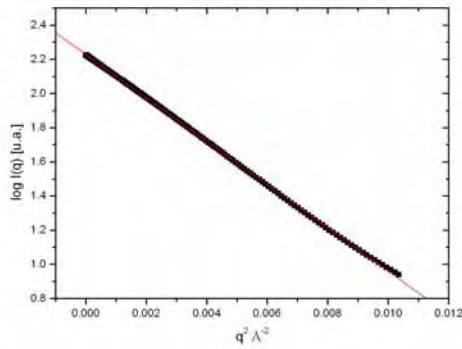
d) Crotoxina pH 10,0.



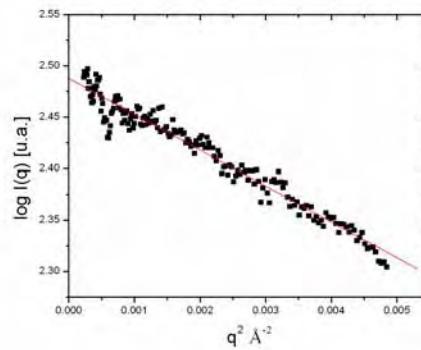
e) Fosfolipase A<sub>2</sub> pH 7,0.



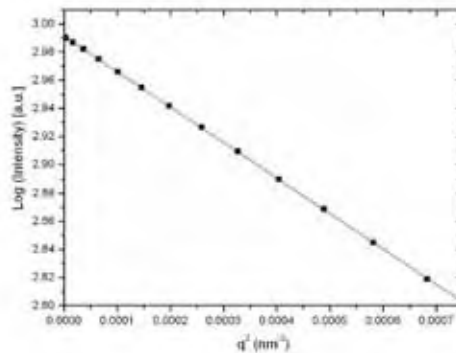
f) Crotopotina pH 7,0.



g) Lótus tetragonolobus (LTA) pH 7,6.



h) BthTX-II pH 7,0.

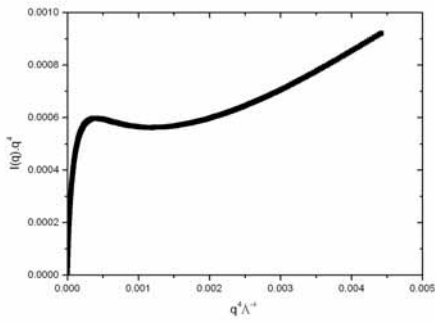


i) Corismato Sintase (CS) pH 7,5.

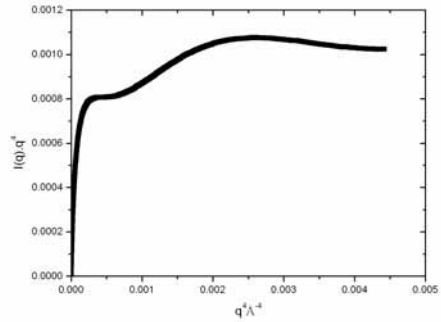
**Figura 19:** Gráfico da região de Guinier ( $\log I(q) \times q^2$ ), regressão linear para a aproximação do raio de giração.

Os gráficos da Figura 20 representam a região de Porod (ver capítulo Introdução: 7. Lei de Porod) que é válida para os altos ângulos. Para produzir os gráficos da região de Porod submeteram-se as curvas da intensidade de espalhamento corrigidas, normalizadas e extrapoladas a concentração zero ao simples cálculo de  $I(q).q^4$  vs  $q^4$ , que é válido para intensidade de espalhamento obtidas na fonte de luz síncrotron, que é uma fonte de feixe considerada pontual. O cálculo para a intensidade de espalhamento obtido por ânodo rotatório é um pouco diferente (somente aplica-se essa equação se as curvas não foram corrigidas pelo efeito do feixe) no qual faz-se  $J(q).q^3$  vs  $q^3$  onde a fonte de raios-X é tido como feixe linear infinito. Quando a molécula aproxima das condições ideais de interação total com o solvente, o que mostra um contraste de inhomogeneidade das densidades eletrônicas bem caracterizadas do solvente e do soluto, o gráfico de Porod deve apresentar quando essa interface é bem definida uma reta paralela ao eixo x, uma inclinação crescente significando que ocorreu uma ótima interação da molécula ao solvente. Um patamar, ou seja, uma inclinação

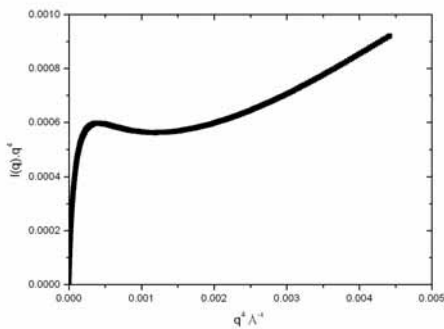
quase constante pode ser observada no Gráfico (b), Já nos Gráficos (a), (c), (d), (e), (f), (g), (h) e (i), pode-se observar uma inclinação crescente bem acentuada devido à boa interação do solvente com o soluto e que resulta em uma bem caracterizada inhomogeneidade entre as partes.



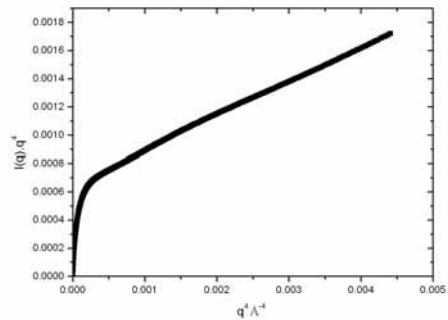
a) BthTX-I pH 7,0.



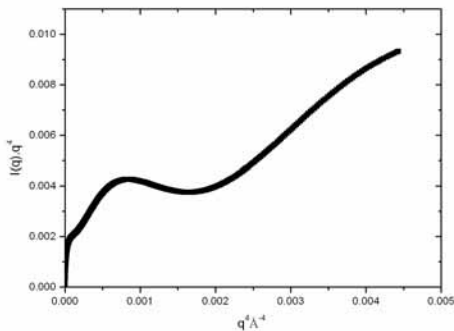
b) Crotoxina pH 3,5.



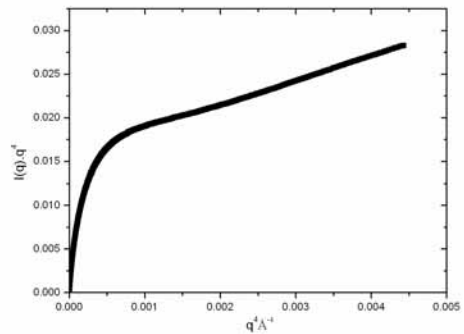
c) Crotoxina pH 6,6.



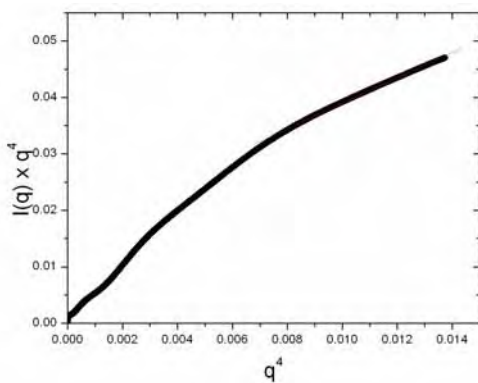
d) Crotoxina pH 10,0.



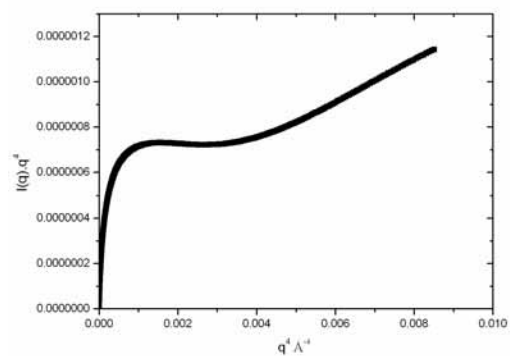
e) Fosfolipase A2 pH 7,0.



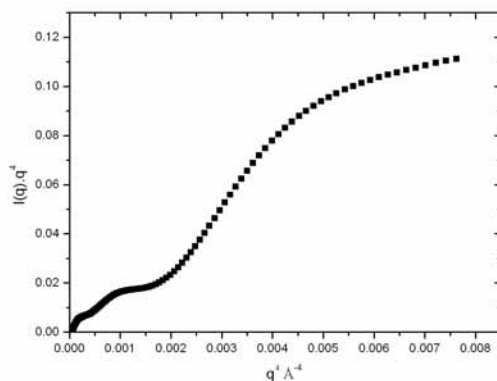
f) Crotopotina pH 7,0.



g) LTA pH 7,6.



h) BthTX-II pH 7,0.



i) Corismato Sintase (CS) pH 7,5.

**Figura 20:** Gráfico da região de Porod,  $I(q).q^4$  vs  $q^4$ .

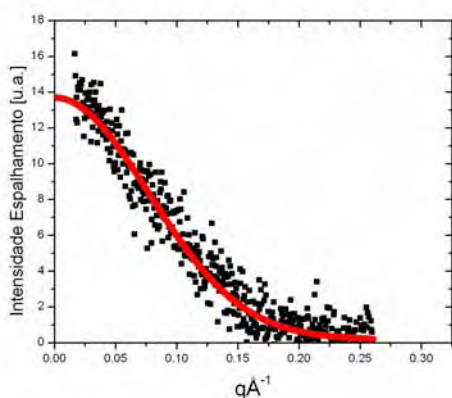
O objetivo final do tratamento dos dados de SAXS, além das características físicas da partícula, como raio de giração, máxima dimensão, superfície e volume, é o modelo **ab initio** condizente com a partícula estudada. Para isso é necessário que as curvas corrigidas sejam submetidas a um tratamento matemático da Transformada de Fourier. Com a utilização do programa GNOM (Svergun, 1992), em que se baseia na melhor solução para as curvas de SAXS por tentativa e erro, o seu aplicativo esta fundamentado no método da transformada indireta de Fourier. O valor total estimado determina a qualidade dos resultados e quanto mais próximo de 1 melhor será a solução apresentada.

O resultado da função  $p(r)$  também é apresentado pelo programa GNOM e seu gráfico pode ser visto na Figura 22. Utilizando desse recurso é fornecido dois dados importantes sobre a partícula: o raio de giração e a máxima dimensão da partícula. Aqui o raio de giração é determinado pelo método integral visto na Equação 18 (capítulo Introdução: 6. Aproximação de Guinier). O raio de giração calculado pelo método integral atinge uma maior precisão em comparação com o método dos mínimos quadrados ou aproximação de Guinier, pelo simples motivo de utilizar todos os pontos da curva de espalhamento.

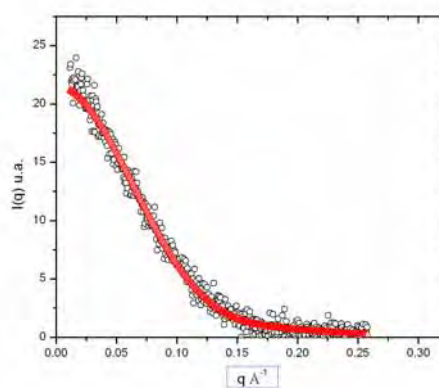
Agora com as curvas plenamente corrigidas pode-se determinar a forma **ab initio** ou forma envelope da proteína estudada a qual é fornecida pelo método de modelos de átomos dummy que esta fundamentada no programa DAMMIN (ver Teoria e Métodos Computacionais), porém, são reconstruídos no mínimo 10 modelos independentes que serão executados e avaliados pelo programa DAMAVER em que esta baseando no valor

da (NSD = **normalized spatial discrepancy**) o qual estima a similaridade entre os modelos para determinar o modelo final. A sobreposição das coordenadas atômicas da estrutura cristalográfica com o modelo **ab initio** é realizada pelo programa SUPCOMB 2.0 o qual também esta fundamentada na (NSD). Quando alcançado o valor da NSD < 1,5 indica alta correlação e complementaridade da superfície dos modelos envolvidos.

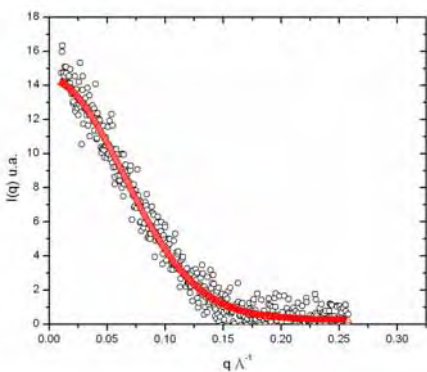
O resultado do ajuste da curva de SAXS experimental e teórica efetuado pelo programa DAMMIN são apresentados na Figura 21. Como já mencionado no Capítulo “Teoria e Métodos Computacionais”, o valor do parâmetro  $\chi^2$  quanto mais próximo de 1 melhor será a execução e determinação do modelo **ab initio** final.



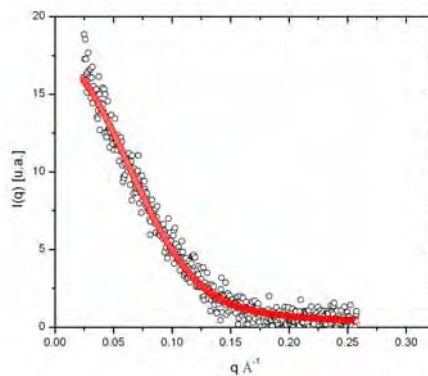
a) BthTX-I pH 7,0.



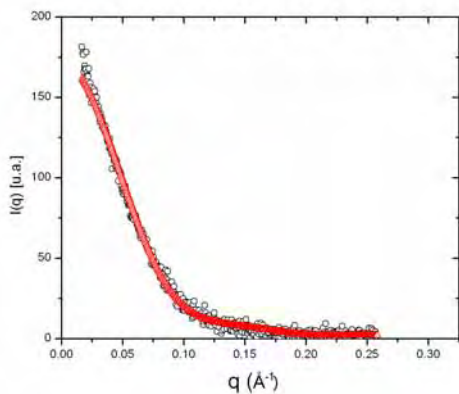
b) Crotoxina pH 3,5.



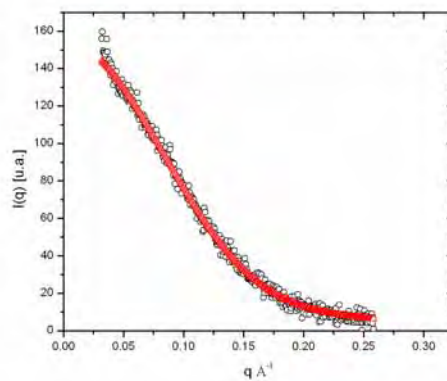
c) Crotoxina pH 6,6.



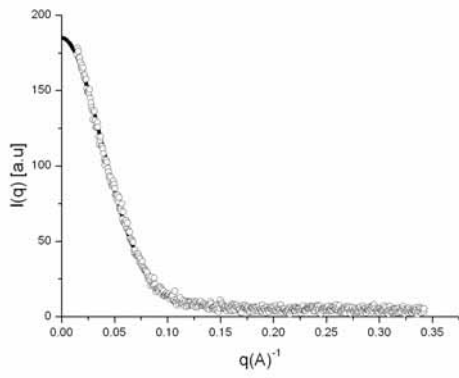
d) Crotoxina pH 10,0.



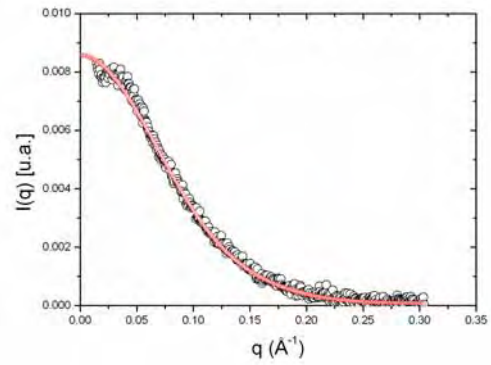
e) Fosfolipase A<sub>2</sub> pH 7,0.



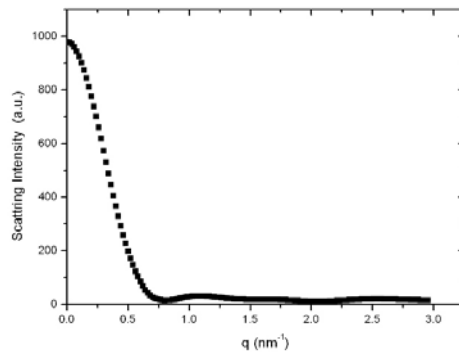
f) Crotapotina pH 7,0.



g) Lótus tetragonolubus (LTA) pH 7,6.

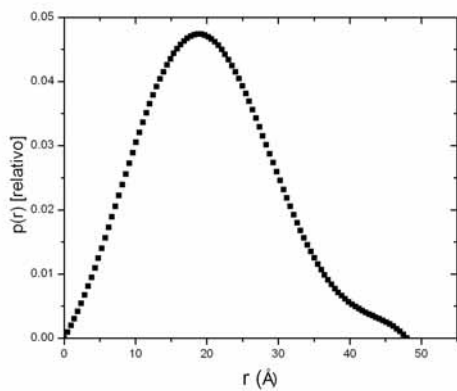


h) BThTX-II pH 7,0.

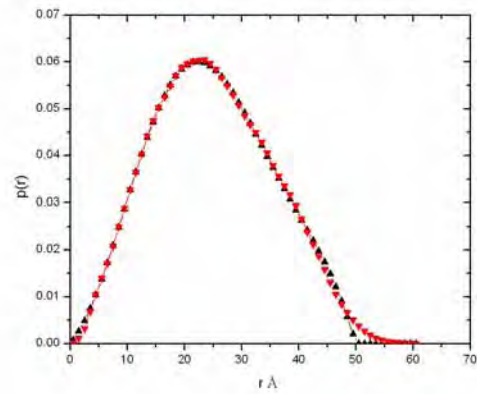


i) Corismato Sintase (CS) pH 7,5.

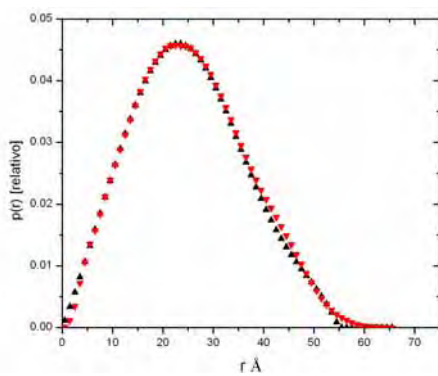
**Figura 21:** Curvas experimentais corrigidas e extrapoladas a concentração 0 mg/ml, ajustada a cura teórica calculada computacionalmente (programa DAMMIN).



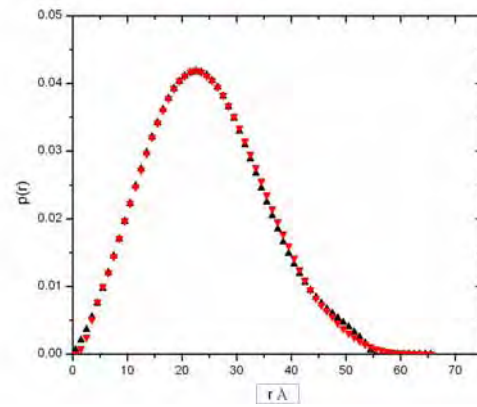
a) BthTX-I pH 7,0.



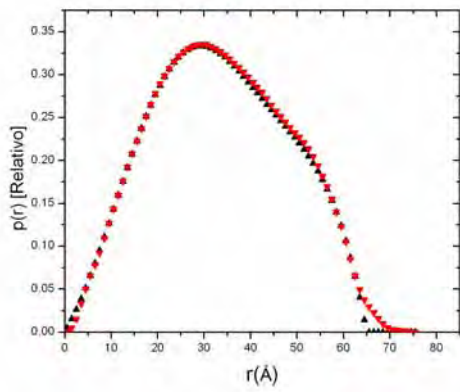
b) Crotoxina pH 3,5.



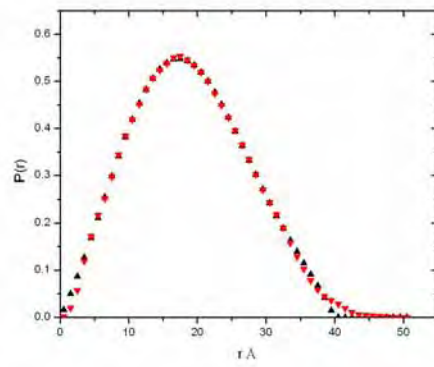
c) Crotoxina pH 6,6.



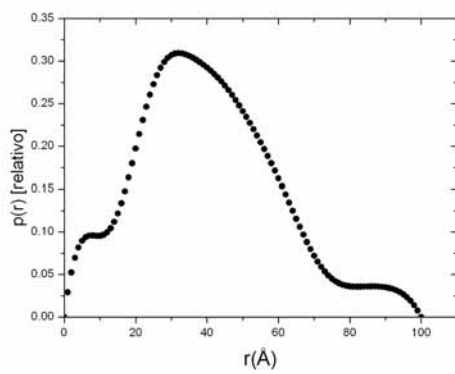
d) Crotoxina pH 10,0.



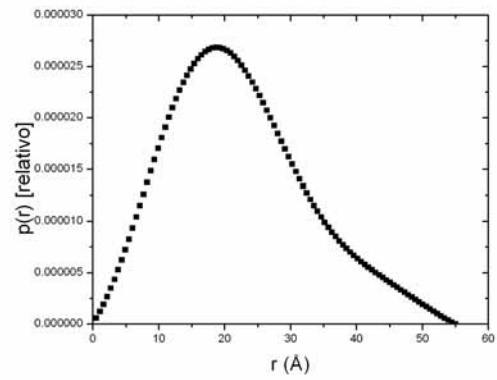
e) Fosfolipase A<sub>2</sub> pH 7,0.



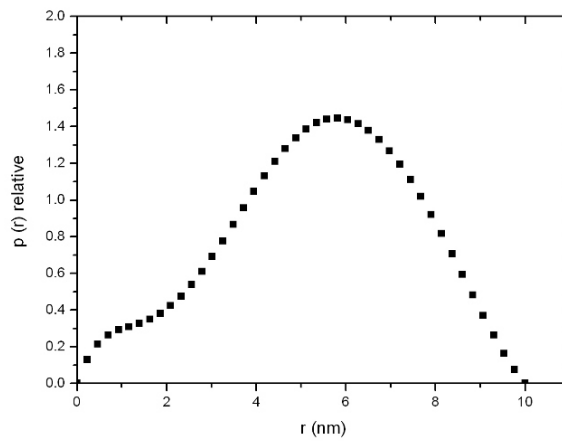
f) Crotopotina pH 7,0.



g) Lótus tetragonolubus (LTA) pH 7,6.

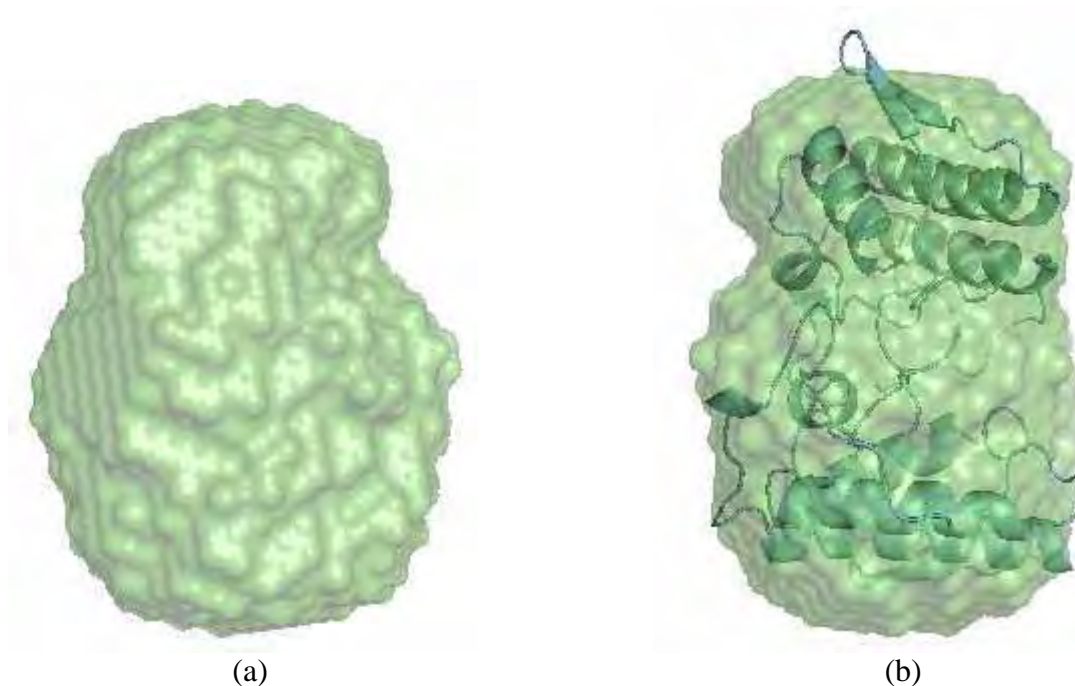


h) BthTX-II pH 7,0.



i) Corismato Sintase (CS) pH 7,5.

**Figura 22:** Gráfico da função de distribuição de distancia  $p(r)$  vs  $r$ .



**Figura 23:** (a) modelo tridimensional de átomos dummys da função envelope da estrutura quaternária da proteína BhtX-I pH 7,0 obtida das curvas experimentais de SAXS (espaço recíproco) obtido pelo programa DAMMIN. (b) sobreposição do envelope da proteína “SAXS” com a estrutura atômica determinada por cristalografia.

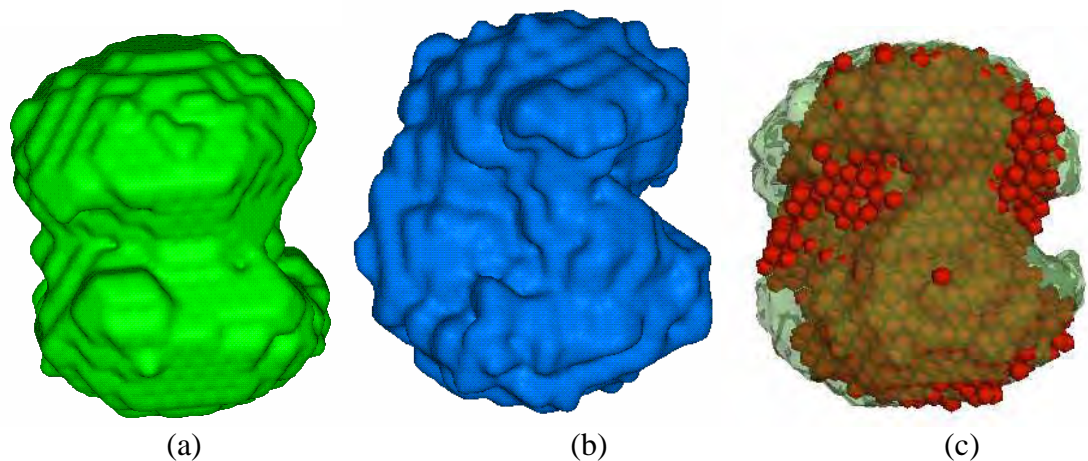
A estrutura de coordenadas atômicas determinada por cristalografia da BthTX-I resulta em um modelo final em que consiste de duas moléculas formando um homodímero, dois fragmentos de PEG-400 e 86 moléculas de água. Em ambos monômeros, o mapa de densidade eletrônica indica a presença de molécula de PEG-400 ligado ao canal hidrofóbico no qual esta situada à região do sitio ativo da PLA<sub>2</sub> (Murakami, et al., 2007).

O estado oligomérico da BthTX-I foi previamente estudado por eletroforese e técnicas espectroscópicas as quais indicam que a PLA<sub>2</sub> Lys49 homologa existe como dímero em solução (Arni, et al., 1995). Resultados preliminares de cristalografia e espectroscopia sugerem que esta molécula adota uma conformação de esfera prolato, o que é confirmado pelo experimento de SAXS, com um raio de giracão de 20,2Å, sustentado pelas interações polares formadas entre a folha  $\beta$  e a região do N-terminal da hélice  $\alpha$ , na qual esta envolvido os resíduos estritamente conservados: Gln11, Glu12, Trp77 e Lys80. Nesta conformação, o canal hidrofóbico e a superfície interfacial são expostos ao solvente (Ward, et al., 1998; da Silva-Giotto, et al., 1998). Baseado nisto, um modelo para a ruptura das membranas pela PLA<sub>2</sub> Lys49 homologa tem sido proposto (Lomonte, et al., 2003).

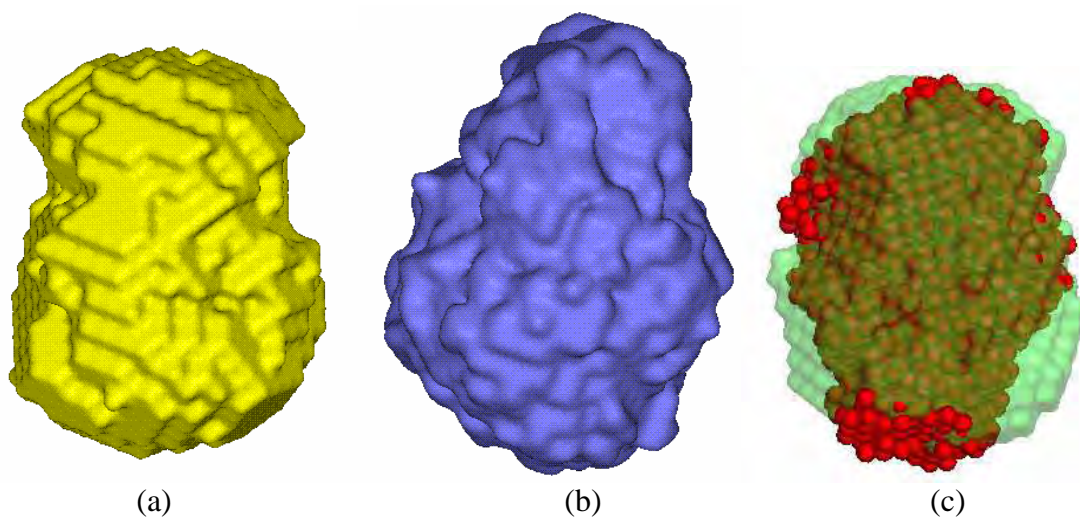
No entanto, os resultados de SAXS mostra que o raio de giração da BthTX-I é 17,5Å o seu volume é 52900Å<sup>3</sup> e sua superfície é 6540Å<sup>2</sup>, indicando que esta molécula adota uma conformação dimérica mais compacta do que observado na estrutura cristalina, porém o complexo Basp II/suramina (Murakami, et al., 2005) revela um raio de giração igual a 17,9Å.

É de conhecimento que uma proteína para cristalizar necessita perder sua camada de hidratação. Assim, diminuindo sua entropia devido aos aminoácidos hidrofóbicos contidos no interior da proteína ficarem de certa maneira mais expostos ocorrendo um “relaxamento”, no entanto, este fato pode resultar no aumento do raio de giração o que ocorre com a estrutura atômica do cristal da BthTX-I. Todavia, é plausível que o raio de giração do modelo **ab initio** seja menor, precisamente por se tratar de um experimento realizado em solução a amostra estaria mais próximo da realidade em que se encontra na natureza, em meio aquoso. O perfil das curvas de espalhamento do espaço recíproco e do espaço real ou função de distribuição de distancia p(r) da BthTX-I podem ser visto na Figuras 21(a) e 22(a) respectivamente. O modelo **ab initio** da BthTX-I resultado do experimento de SAXS esta representado na Figura 23(a). Na Figura 23(b) esta a sobreposição dos modelos **ab initio** e a estrutura de coordenadas atômicas e obteve-se um resultado da NSD de 1,21 para a forma compacta indicando alta complementaridade entre os modelos.

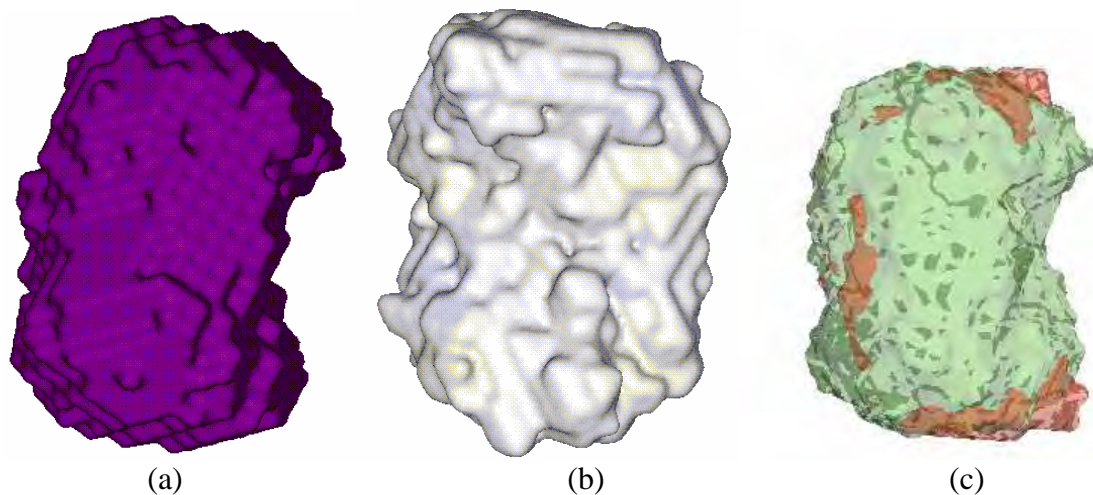
Chama-se a atenção novamente para a Figura 22(a) a função de distribuição de distância onde podemos observar a máxima dimensão da proteína BthTX-I  $D_{\text{máx}} = 48 \text{ \AA}$  e também que possui a característica de esfera prolato, confirmando os resultados dos experimento de espectroscopia e eletroforese realizados anteriormente por (Arni, et al., 1995).



**Figura 24:** (a) Modelo tridimensional de átomos dummies da função envelope da estrutura quaternária da proteína Crotoxina pH 3,5 obtida das curvas experimentais de SAXS (espaço recíproco) gerado pelo programa DAMMIN. (b) Modelo tridimensional do espaço real função  $p(r)$  gerado pelo programa GASBOR. (c) Sobreposição dos modelos tridimensionais (vermelho) modelo gerado pelo programa DAMMIN, (verde) modelo gerado pelo programa GASBOR, realização da sobreposição pelo programa SUPCOMB.



**Figura 25:** (a) Modelo tridimensional de átomos dummies da função envelope da estrutura quaternária da proteína Crotoxina pH 6,6 obtida das curvas experimentais de SAXS (espaço recíproco) gerado pelo programa DAMMIN. (b) Modelo tridimensional do espaço real função  $p(r)$  gerado pelo programa GASBOR. (c) Sobreposição dos modelos tridimensionais (verde) modelo gerado pelo programa DAMMIN, (vermelho) modelo gerado pelo programa GASBOR, realização da sobreposição pelo programa SUPCOMB.



**Figura 26:** (a) Modelo tridimensional de átomos dummies da função envelope da estrutura quaternária da proteína Crotoxina pH 10,0 obtida das curvas experimentais de SAXS (espaço recíproco) gerado pelo programa DAMMIN. (b) Modelo tridimensional do espaço real função  $p(r)$  gerado pelo programa GASBOR. (c) Sobreposição dos modelos tridimensionais (verde) modelo gerado pelo programa DAMMIN, (vermelho) modelo gerado pelo programa GASBOR, realização da sobreposição pelo programa SUPCOMB.

A proteína crotoxina e seus constituintes (fosfolipase A e crotapotina) foram caracterizadas e adequadamente estudadas pela técnica de espalhamento de raios-X a baixo ângulo. O experimento foi efetuado em três distintos pH (3,5; 6,6; 10,0) para a crotoxina e apenas no pH 6,6 para a fosfolipase A e a crotapotina. Os modelos **ab initio** referentes aos seus respectivos pH's da crotoxina podem ser observados nas Figuras 24, 25 e 26 o modelo **ab initio** da fosfolipase e da crotapotina podem ser vistos na Figuras 28 e 29 respectivamente.

O estudo por SAXS desta proteína e seus constituintes já havia sido realizado por (H. Paradies and H. Breithaupt 1975), porém os seus resultados são complementados posteriormente por (Mascarenhas, et al., 1992; Abrego, et al., 1993), contudo o nosso trabalho esta em bom acordo com estes resultados obtidos anteriormente, apenas com algumas divergências devido à limitação computacional da época em que foram realizados.

Paradies e Breithaupt realizaram um estudo de caracterização hidrodinâmica e reportaram as propriedades físico-químicas do complexo crotoxina e seus constituintes fosfolipase A e crotapotina, e obtiveram os resultados do raio de giração para o complexo crotoxina de 16,5 Å, fosfolipase A 32,4 Å e crotapotina 12,4 Å, e que suas

estruturas podem ser representadas da seguinte forma: para o complexo crotoxina um elipsóide prolato, a fosfolipase A por um cilindro e a crotapotina por um elipsóide oblato, sugeriram também que a fosfolipase A em solução apresenta um equilíbrio reversível entre dímero e tetrâmero.

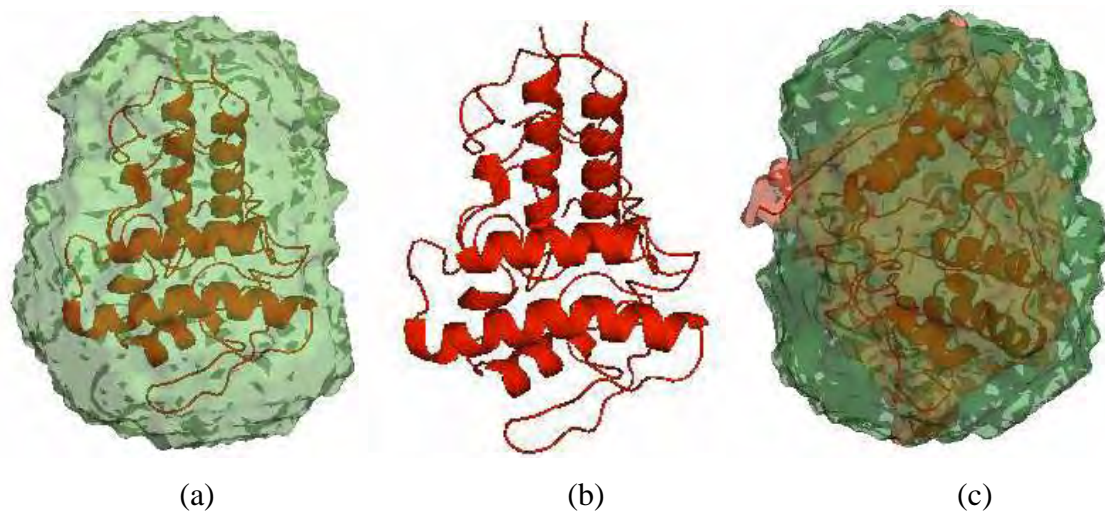
Entretanto, este equilíbrio entre dímero e tetrâmero não foi observado nos resultados deste trabalho, e a fosfolipase A se mostrou apenas como um dímero, possuindo a forma de esfera simétrica estendida prolato. O complexo crotoxina e a crotapotina podem ser exibidas com uma forma esférica oblato no experimento realizado no pH 6,6, portanto nos respectivos pH 3,5 e 10,0 o complexo crotoxina se apresenta com uma forma esférica prolato, portanto mais alongada, podendo ser devido as cargas  $[H^+]$  e  $[OH^-]$  livres existentes na solução tampão, caracterizando assim em uma configuração “open / close”, estes resultados foram possíveis de serem obtidos devido a disposição dos modernos sistemas computacionais existentes como por exemplo ATSAS - um pacote computacional elaborado por Svergun e colaboradores.

Os resultados conseguidos por (Mascarenhas, et al., 1992; Beltran, et al., 1993) após a realização dos experimentos de SAXS com o complexo crotoxina e com a crotapotina obtiveram os valores para o raio de giração e máxima dimensão, que foram os seguintes: raio de giração do complexo crotoxina 16,6 Å e máxima dimensão 52,0 Å experimento foi realizado em solução tampão ajustado para o pH 3,0; o raio de giração da crotapotina é 13,4 Å e a máxima dimensão 46,0 Å, esses resultados estão coerentes com os resultados obtidos no trabalho anterior.

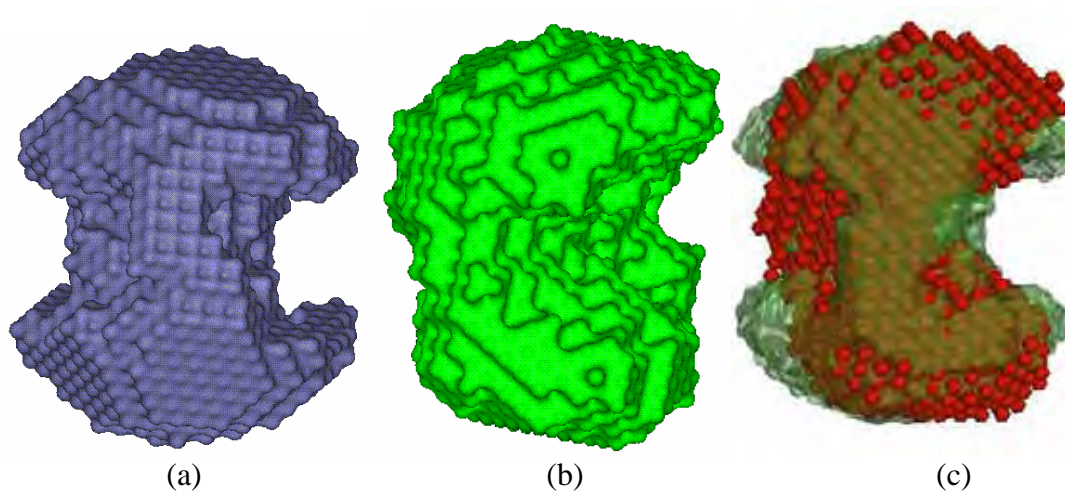
Na realização deste estudo com o complexo crotoxina e seus constituintes (fosfolipase A e crotapotina) chegou-se aos resultados do raio de giração e máxima dimensão representados pelas Figuras 19(b, c, d, e f) que são referentes ao método da aproximação de Guinier os valores encontrados foram: para o complexo crotoxina no tampão ajustado para o pH 6,6; pH 3,5 e pH 10,0,  $R_g = 18,4 \text{ \AA}$ ,  $R_g = 18,85 \text{ \AA}$  e  $R_g = 18,50 \text{ \AA}$  respectivamente, e para a fosfolipase A,  $R_g = 24,83 \text{ \AA}$  e crotapotina  $R_g = 14,43 \text{ \AA}$ , o raio de giração obtido pelo método de integração “GNOM” foi para a crotoxina pH 6,6; pH 3,5 e pH 10,0;  $R_g = 18,8 \text{ \AA}$ ;  $R_g = 19,0 \text{ \AA}$  e  $R_g = 19,40 \text{ \AA}$  respectivamente e para a fosfolipase A,  $R_g = 25,70 \text{ \AA}$  e crotapotina 14,50 Å, e mostra que os dois métodos estão em bom acordo com a realização das nossas análises. A máxima dimensão obtida diretamente da análise da função de distribuição de distância  $p(r)$  representado na Figura 22 (b, c, d, e, f), do complexo crotoxina nos tampões ajustados para o pH 3,5; pH 6,6 e

pH 10,0, foram  $D_{\text{máx}} = 50,0 \text{ \AA}$ ,  $D_{\text{máx}} = 55,0 \text{ \AA}$  e  $D_{\text{máx}} = 55,0 \text{ \AA}$  respectivamente, e para a fosfolipase A e crotapotina no tampão ajustado para o pH 7,0, foram:  $D_{\text{máx}} = 65,0 \text{ \AA}$  e  $D_{\text{máx}} = 40,0 \text{ \AA}$ .

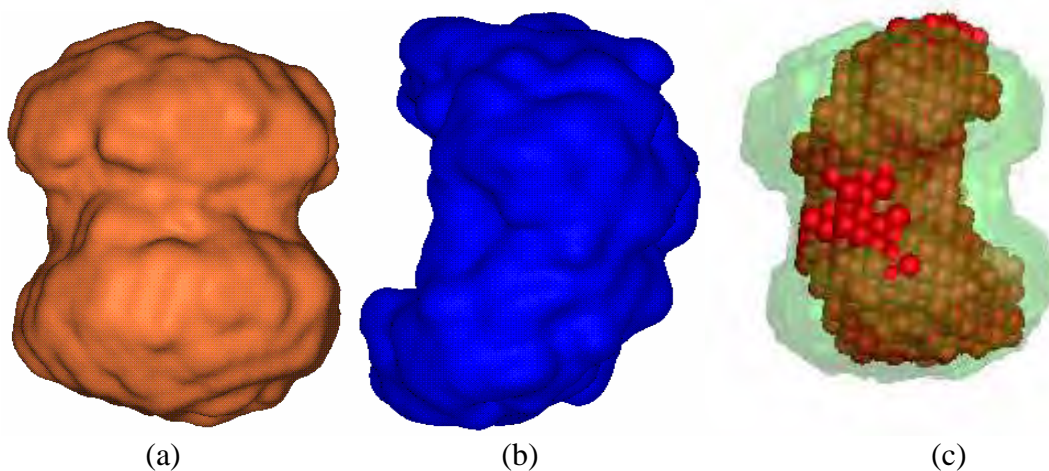
De acordo com o procedimento para a determinação do volume e da superfície, aproximou-se dos seguintes valores: para a crotoxina no pH 3,5 o  $V_h = 64500 \text{ \AA}^3$  e  $S = 7589 \text{ \AA}^2$ ; crotoxina pH 6,6,  $V_h = 78310 \text{ \AA}^3$  e  $S = 8676 \text{ \AA}^2$ ; crotoxina pH 10,0,  $V_h = 76340 \text{ \AA}^3$  e  $S = 8425 \text{ \AA}^2$ ; para a fosfolipase o  $V_h = 132100 \text{ \AA}^3$  e  $S = 12080 \text{ \AA}^2$ ; para a crotapotina o  $V_h = 35200 \text{ \AA}^3$  e a  $S = 5081 \text{ \AA}^2$ , os quais estão coerentes com os resultados do raio de giração e máxima dimensão.



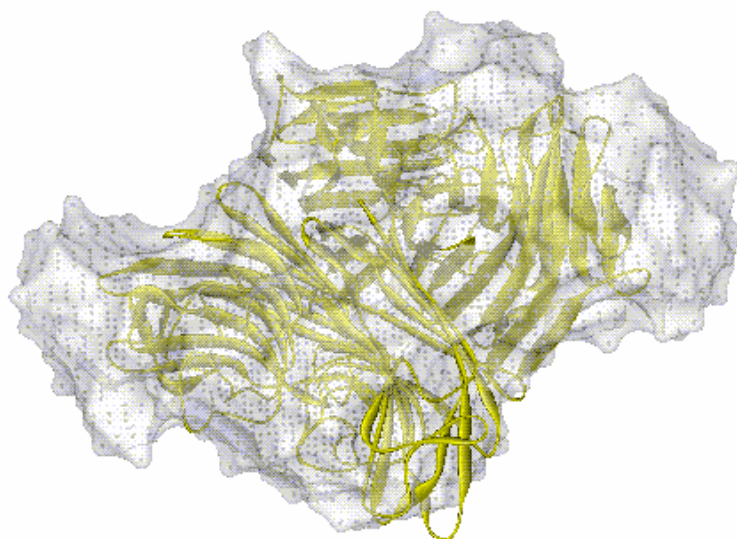
**Figura 27:** (a) Sobreposição do modelo da função envelope determinado por SAXS e a estrutura modelada da crotoxina no pH 6,6. (b) A estrutura modelada da crotoxina. (c) Sobreposição dos modelos com uma visão de preenchimento.



**Figura 28:** (a) Modelo tridimensional de átomos dummies da função envelope da estrutura quaternária da proteína Fosfolipase A<sub>2</sub> pH 7,0 obtida das curvas experimentais de SAXS (espaço recíproco) gerado pelo programa DAMMIN. (b) Modelo tridimensional do espaço real função  $p(r)$  gerado pelo programa GASBOR. (c) Sobreposição dos modelos tridimensionais (verde) modelo gerado pelo programa DAMMIN, (vermelho) modelo gerado pelo programa GASBOR, realização da sobreposição pelo programa SUPCOMB.



**Figura 29:** (a) Modelo tridimensional de átomos dummies da função envelope da estrutura quaternária da proteína Crotapotina pH 7,0 obtida das curvas experimentais de SAXS (espaço recíproco) gerado pelo programa DAMMIN. (b) Modelo tridimensional do espaço real função  $p(r)$  gerado pelo programa GASBOR. (c) Sobreposição dos modelos tridimensionais (verde) modelo gerado pelo programa DAMMIN, (vermelho) modelo gerado pelo programa GASBOR, realização da sobreposição pelo programa SUPCOMB.



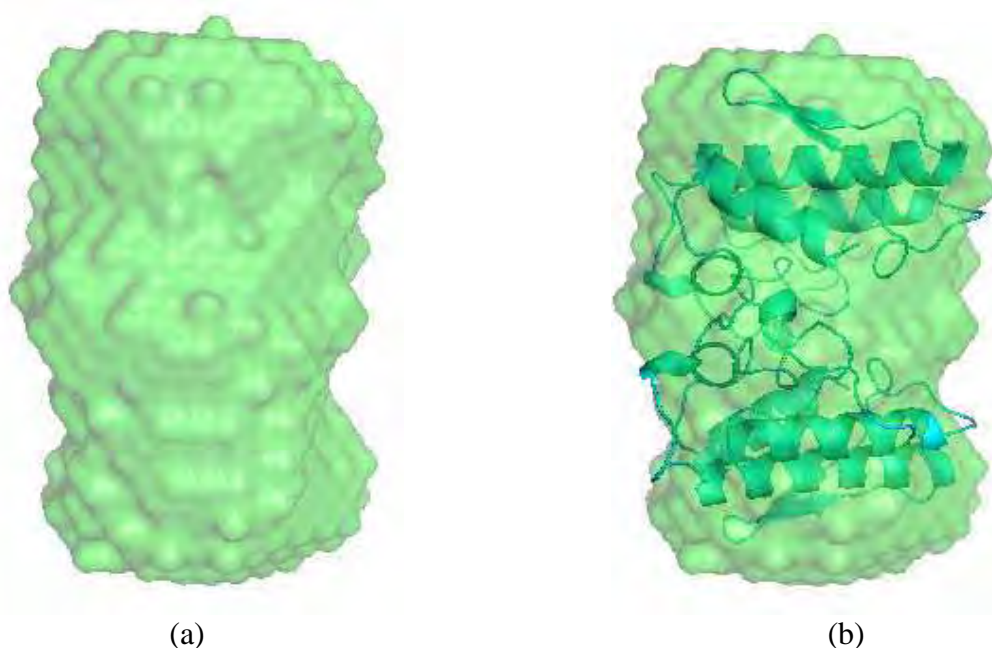
**Figura 30:** Sobreposição dos modelos tridimensionais da estrutura quaternária da proteína LTA pH 7,5; (Amarelo) estrutura quaternária determinada por cristalografia, sobreposta ao envelope da proteína (Branco) gerado pelo tratamento das curvas de SAXS do espaço recíproco  $I(q) \times q$ .

As coordenadas atômicas da estrutura cristalina da (LTA) **Lótus tetragonolobus** revela um novo arranjo dos dímeros que formam o tetrâmero desta lectina. Esta estrutura consiste de um homotetrâmero composto por duas “costa com costa” dos dímeros da (GS-IV) **Griffonia simplicifolia** lectina IV. Utilizou-se a técnica de SAXS para investigar a estrutura quaternária da LTA em solução e comparar com a estrutura cristalina. Disponibilizando, assim, mais um estudo essencial para o entendimento do pouco conhecido mecanismo de reconhecimento e ligação da LTA e o complexo bivalente carboidrato L-fucosil (Moreno et al., 2007).

Resultados da estrutura cristalina da LTA revelam que existem quatro monômeros por unidade assimétrica e pertencem à simetria do grupo espacial  $P2_1$ , mostrando assim uma disposição diferente destes monômeros o qual mostra um novo tetrâmero fundamentalmente necessário. Primeiramente, esta diferença pode ser possível pelo empacotamento cristalográfico e segundo diversas proteínas podem assumir formas estruturais que não é observado em ambientes biologicamente aquosos (Filgueira de Azevedo, et al., 2003).

Finalmente, para determinar definitivamente como a LTA se apresenta em solução aquosa e confirmar as suposições sobre a estrutura quaternária recorreremos à técnica de espalhamento de raios X a baixo ângulo SAXS. Partindo das coordenadas cristalográficas, analisando a máxima dimensão ( $D_{máx}$ ), superfície externa (S) e volume

de hidratação ( $V_h$ ) os valores resultantes estão em bom acordo com os obtidos pelo experimento de SAXS. A análise das curvas de espalhamento nos forneceu o raio de giração de  $33,2 \text{ \AA}$ ,  $D_{\text{máx}} = 100 \text{ \AA}$ ,  $S = 30 \times 10^3 \text{ \AA}^2$  e  $V_h = 138 \times 10^3 \text{ \AA}^3$ . A Figura 30 mostra a sobreposição da estrutura da coordenada atômica com o **ab initio** resultando no valor da NSD de  $0,614 \pm 0,038$  o qual esta em bom acordo com a teoria, também é revelado o tetrâmero da LTA o qual é representado por uma forma laminar ortorrômbica semelhante ao observado na estrutura cristalina, podendo assim ser observado a disposição dos monômeros e como estão ligados entre si. No entanto, informações qualitativas sobre a superfície de contorno da LTA contidas na função  $p(r)$  Figura 25(g) exibe um padrão assumido por esta função o qual corresponde a uma partícula com a aparência de uma lamela com a dimensão máxima de  $100 \text{ \AA}$  e que reforça a coerência dos resultados.



**Figura 31:** (a) modelo tridimensional de átomos dummies da função envelope da estrutura quaternária da proteína BthTX-II pH 7,0 obtida das curvas experimentais de SAXS (espaço recíproco) obtido pelo programa DAMMIN. (b) sobreposição do envelope da proteína “SAXS” com a estrutura atômica determinada por cristalografia.

O resultado do modelo **ab initio** construído dos dados de SAXS da BthTX-II é apresentado na Figura 31. Tanto a BthTX-II como a BthTX-I são proteínas isoladas do veneno da serpente sul-americana **Bothrops jararacussu** e suas diferenças foram explanadas no Capítulo “Introdução Geral”.

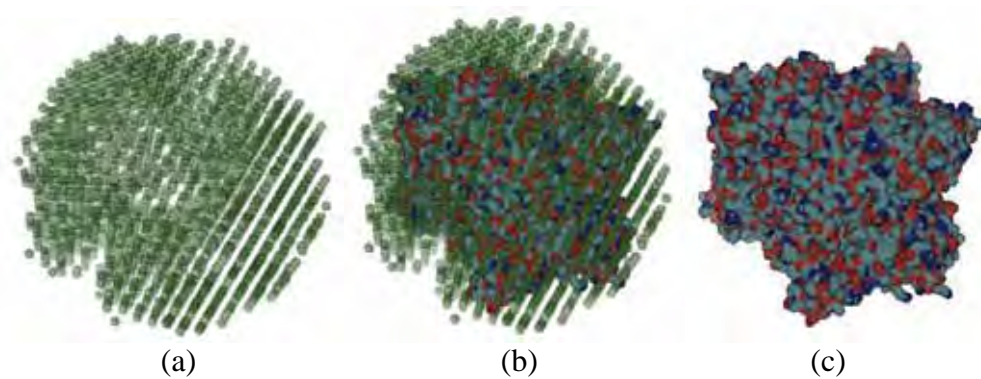
Uma investigação estrutural e bioquímica da BthTX-II foi realizada por um grupo de pesquisadores na qual a colaboração deste trabalho foram os resultados estruturais obtidos do experimento de SAXS. Porém, a estrutura das coordenadas atômicas desta proteína não foi obtida por difração de cristais e sim por modelagem molecular, a qual pode ser validada por dinâmica molecular e experimento de espalhamento de raios-X. O trabalho se ateve apenas a este último. Observando-se os resultados estruturais das curvas de espalhamento como raio de giração, máxima dimensão, NSD, volume e superfície, pode-se caracterizar e validar a modelagem molecular.

Para a modelagem molecular da proteína BthTX-II utilizou-se das coordenadas atômicas das estruturas homólogas da **Bothrops asper** miotoxina II (código de acesso ao PDB: 1Y4L) e BthTX-I (código de acesso ao PDB: 2H81).

Os resultados de SAXS indicam um raio de giração de 15,46 Å, extraído do cálculo da aproximação de Guinier Figura 19(h), o qual esta em bom acordo com o raio de giração calculado teoricamente 15,75 Å. O raio de giração calculado pelo método integral resultado do programa GNOM foi de 15,7 Å. Nas Figuras 21(h) e 22(h) são apresentadas as curvas de espalhamento do espaço recíproco “I(q) vs q” e a função de distribuição de distâncias “p(r) vs r”, respectivamente. Observando-se o gráfico da função de distribuição de distâncias, percebe-se que a máxima dimensão desta molécula que é de 55,0 Å.

A modelagem da estrutura de coordenadas atômicas da proteína BthTX-II foi sobreposta ao modelo **ab initio** obtido dos dados de SAXS e obteve-se um valor resultante da NSD de 0,526, que indica uma excelente correlação entre o envelope e a estrutura modelada.

Comparando os raios de giração das proteínas BthTX-I e II observamos que a BthTX-II tem uma conformação mais compacta, porém possui uma máxima dimensão mais alongada cerca de 7 Å podendo ser mais um cilindro que uma esfera prolato assimétrica, como já visto nas Figuras 23 e 31.



**Figura 32:** (a) Modelo Corismato Sintase (CS) pH 7,5 **ab initio** obtido por SAXS (fonte de raios-X ânodo rotatório). (b) Sobreposição dos modelos **ab initio** SAXS com o modelo das coordenadas cristalográficas. (c) Modelo tetramérico das coordenadas cristalográficas.

A estrutura das coordenadas atômicas da Corismato Sintase (CS) foi resolvida por (Dias, et al., 2006). A complexa via do chiquimato, o qual sintetiza os aminoácidos aromáticos em bactérias, fungos, plantas e parasitas já foram brevemente ilustrados no Capítulo “Introdução Bioquímica”. A CS é a última enzima a ser sintetizada da via chiquimato, que é composta por sete etapas. Por essa razão, a CS é uma boa candidata para o desenvolvimento de novas terapias contra doenças infecciosas tais como tuberculose (Azevedo, et al., 2002). Dias e co-autores acessaram quatro estruturas de coordenadas atômicas da CS complexado com flavina mononucleotideo (FMN), que é um co-fator essencial tipicamente encontrado em muitas reações de redox em sistemas biológicos, foram três estruturas da CS de bactérias e uma de levedura: a CS da *Streptococcus pneumoniae* complexado com FMN e EPSP (Maclean and Ali, 2003); CS da *Helicobacter pylori* complexada com FMN (Ahn, et al., 2004); CS nativa da *Aquiflex aelicus* (Viola, et al., 2004); e a CS nativa da levedura *Saccharomices cerevisiae* (Quevillon-Cheruel, et al., 2004); seus códigos de acesso PDB: 1QXO, 1UMO, 1Q1L e 1R53 respectivamente), em todas essas estruturas observaram que a CS se apresenta como tetrâmero composto por dois dímeros. Porém, Dias e co-autores realizaram estudos utilizando das técnicas de ultracentrifugação analítica e filtração em gel, e os seus resultados sugerem que a CS da *Mycobacterium tuberculosis* (MtCs) seja predominantemente dímero em solução apresentando um equilíbrio entre a forma tetramérica.

Os resultados apresentados por essas duas técnicas, filtração em gel que foi utilizada para determinar a massa molecular da **MtCS**, revelaram que esta proteína existe como dímero em solução, e a ultracentrifugação analítica cujo valor do resultado do coeficiente de sedimentação apresentado é relativo a uma molécula que tem massa molecular de 80 kDa aproximadamente, tendo em vista que a massa molecular de um monômero da **MtCS** é de 41,7 Kda, porém a técnica de ultracentrifugação sugere que esta molécula apresenta um equilíbrio entre dímero e tetrâmero em solução (Dias, et al., 2006). Uma hipótese para explicar esse comportamento da **MtCS** é um rápido equilíbrio entre dímero e tetrâmero, o qual deve ser dependente da concentração (Laue, 2001). Dias e co-autores obtiveram resultados ambíguos, onde a cristalografia resulta em um tetrâmero formado pelos monômeros A/D ou B/C, o que não está de bom acordo com os resultados do coeficiente de sedimentação e com a filtração em gel. Assim, esses resultados propõem que, em solução, o dímero da **MtCS** é altamente diferente do dímero cristalográfico (Dias, et al., 2006).

No entanto, os resultados deste trabalho, em que foi utilizada a técnica de SAXS, para o estudo de macromoléculas em solução, mostrou que a molécula **MtCS** tem a forma de um tetrâmero em solução e que está de bom acordo com os resultados cristalográficos. Lança-se, assim, mais luz a questão do comportamento desta proteína.

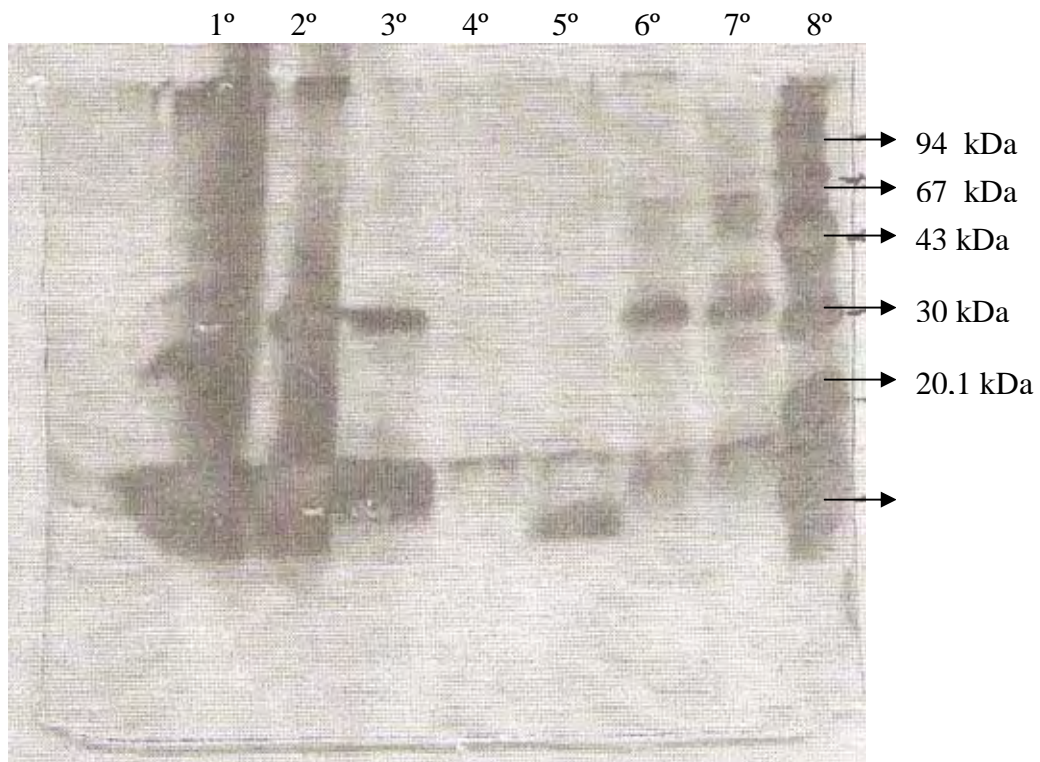
Através da técnica de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS), estudou-se a proteína Corismato Sintase (CS) em solução, com o intuito de obter um modelo tridimensional e, assim, determinar a caracterização e o comportamento desta proteína em solução. Analisando as curvas de espalhamento obtidas por SAXS, calculou-se os seguintes parâmetros geométricos da proteína: máxima dimensão ( $D_{\text{máx}} = 100,00 \text{ \AA}$ ), raio de giração ( $R_g = 41,67 \text{ \AA}$ ), superfície da molécula ( $S = 42140 \text{ \AA}^2$ ) e o volume hidratado ( $V_h = 210 \times 10^3 \text{ \AA}^3$ ). Estes parâmetros indicam que esta proteína se apresenta em solução sobre a forma de um tetrâmero. Esses resultados estão em bom acordo com os parâmetros calculados computacionalmente para o modelo cristalográfico tetramérico onde ( $R_g = 40,97 \text{ \AA}$ ) volume ( $V = 199184 \text{ \AA}^3$ ), superfície ( $S = 39702 \text{ \AA}^2$ ) e a máxima dimensão ( $D_{\text{máx}} = 92,94 \text{ \AA}$ ) foram averiguados utilizando do programa CRY SOL (Svergun, et al., 1995). Foi gerado computacionalmente o modelo do tetrâmero a partir das coordenadas cristalográficas do monômero e assim sobreposto ao modelo obtido por SAXS, e observou-se uma sobreposição muito boa que é uma indicação de que realmente a proteína (CS) encontra-se sob a forma de um tetrâmero em solução.

Na Figura 19(i) é apresentado o gráfico da região de Guinier, que mostra claramente que o sistema estudado é caracterizado como monodisperso e que não foi observada a condição de equilíbrio entre dímero e tetrâmero, o qual representaria um estado polidisperso caracterizado no gráfico da aproximação de Guinier por duas inclinações na regressão linear. A função de distribuição de distâncias  $p(r)$  esta representada na Figura 22(i) e mostra um perfil típico de uma proteína com a forma de um esferóide achatado similar a um elipsóide oblato. Finalmente, a sobreposição da função envelope obtida pelo método **ab initio** e o modelo tetramérico cristalográfico não deixa dúvidas que a proteína corismato sintase está de acordo com a forma de um tetrâmero em solução e resultou no valor da NSD = 1,156. As sobreposições do modelo **ab initio** com as coordenadas cristalográficas estão representados na Figura 32.

**Tabela III:** Resumo dos valores resultantes dos experimentos de SAXS.

Proteína	pH	$R_g(\text{Guinier}) \text{ \AA}$	$R_g(\text{Gnom}) \text{ \AA}$	$D_{\text{Máx}} \text{ \AA}$	Volume $\text{\AA}^3$	Superfície $\text{\AA}^2$	NSD
BthTx-I	7,0	17,5 $\pm$ 0,2	17,50 $\pm$ 0,2	48,00 $\pm$ 2,40	52900 $\pm$ 4232	6540 $\pm$ 523	1,21 $\pm$ 0,023
BthTx-II	7,0	15,46 $\pm$ 0,2	15,70 $\pm$ 0,2	55,00 $\pm$ 2,75	46900 $\pm$ 3719	6112 $\pm$ 489	0,526 $\pm$ 0,015
Crotoxina	3,5	18,85 $\pm$ 0,2	19,00 $\pm$ 0,2	50,00 $\pm$ 2,50	64500 $\pm$ 5160	7589 $\pm$ 607	0,576 $\pm$ 0,011
Crotoxina	6,6	18,40 $\pm$ 0,2	18,80 $\pm$ 0,2	55,00 $\pm$ 2,75	78310 $\pm$ 6264	8676 $\pm$ 694	0,560 $\pm$ 0,013
Crotoxina	10,0	18,50 $\pm$ 0,2	19,40 $\pm$ 0,2	55,00 $\pm$ 2,75	76340 $\pm$ 6107	8425 $\pm$ 674	0,559 $\pm$ 0,027
Fosfolipase	7,0	14,83 $\pm$ 0,2	25,70 $\pm$ 0,2	65,00 $\pm$ 3,25	132100 $\pm$ 10568	12080 $\pm$ 966	0,621 $\pm$ 0,032
Crotapotina	7,0	14,43 $\pm$ 0,2	14,50 $\pm$ 0,2	40,00 $\pm$ 2,00	35200 $\pm$ 2816	5081 $\pm$ 406	0,447 $\pm$ 0,014
LTA	7,5	33,20 $\pm$ 0,2	31,60 $\pm$ 0,2	100,00 $\pm$ 5,0	138000 $\pm$ 11040	30000 $\pm$ 2400	0,614 $\pm$ 0,038
CS	7,5	41,67 $\pm$ 0,2	41,40 $\pm$ 0,2	100,00 $\pm$ 5,0	210000 $\pm$ 16800	42140 $\pm$ 3371	1,156 $\pm$ 0,034

## ELETROFORESE



**Figura 33:** Gel de eletroforese.

1° - Fosfolipase. 2° - Crotoxina. 3° - Crotoxina. 4° - Crotapotina. 5° - Crotapotina.  
6° - Convulxina. 7° - Convulxina. 8° - Padrão.

## V. CONCLUSÃO

O desenvolvimento deste trabalho revela o avanço tecnológico e computacional em que a técnica de SAXS se encontra nos dias atuais, revelando-se uma potente e indispensável ferramenta ao estudo de macromoléculas biológicas em solução, alcançando parâmetros físicos estruturais como raio de giração, máxima dimensão, volume, superfície e o modelo **ab initio** ou função envelope, os quais se mostram extremamente superiores aos que foram exibidos décadas atrás.

Os resultados conseguidos das proteínas BthTx-I e BthTx-II revelaram que foram caracterizadas como moléculas diméricas, e estão em bom acordo como os modelos de coordenadas atômicas fornecidas por cristalografia e modelagem molecular. Estas proteínas são homólogas em suas seqüências primárias. Porém, possuem alguns aminoácidos diferentes, em vista disso, revelaram uma divergência em seus resultados estruturais. Ou seja, ocorreu uma mudança de conformação no enovelamento destas proteínas homólogas, o que é bem caracterizado pelos resultados de SAXS, os quais comprovam as teorias bioquímicas sobre o enovelamento de proteínas.

Nos experimentos realizados com as proteínas crotoxina e seus constituintes fosfolipase A<sub>2</sub> e crotapotina, observou-se a caracterização dessas macromoléculas. A crotoxina foi experimentada em três pH distintos, variando do ácido ao básico, passando pelo neutro, mostrando, assim, uma configuração “open/close” observado nos modelos **ab initio**. Porém, os dados estruturais como raio de giração, volume, superfície e máxima dimensão, não tiveram uma extrema mudança, podendo-se concluir que essa proteína é extremamente rígida e estavel dentro do contexto da execução deste trabalho. A fosfolipase A<sub>2</sub> e a crotapotina, quando isoladas, tendem a formar dímero em solução. Isto foi observado nos valores dos dados estruturais obtidos das curvas de SAXS, e também da configuração do modelo da função envelope. Os resultados dos parâmetros geométricos estruturais destas macromoléculas estão em bom acordo com os resultados conseguidos anteriormente por outros autores, embora eles não possuíssem os recursos atuais. Por esse motivo, não foi apresentado anteriormente os modelos **ab initio** dos quais nós propomos e o fizemos revelar. Isto pode se confirmar pela estrutura de coordenada atômica, que é sugerida pela modelagem molecular, e pelos valores alcançados pela NSD.

Este trabalho contribuiu com a coleta e tratamento dos dados das curvas de espalhamento da proteína LTA, colaborando, assim, com o grupo de cristalografia, para confirmar novo homotetrâmero composto por quatro domínios de lectina de leguminosa. Os resultados encontrados das condições aquosa do experimento de SAXS estão em bom acordo com os obtidos por cristalografia, os quais podem ser observados na sobreposição dos modelos da função envelope com a estrutura de coordenada atômica, ao lado do valor da NSD disposto das diferentes fontes dos modelos.

A corismato sintase CS foi experimentada, analisada e estudada por SAXS em solução aquosa e chegou-se aos resultados apresentados no capítulo “Resultados e Discussões”. Essa proteína tem o comportamento de um tetrâmero monodisperso em solução. Os dados obtidos estão em bom acordo com os conseguidos por cristalografia, e podem ser avaliados na sobreposição dos modelos **ab initio** com a coordenada atômica e o valor da NSD.

Neste trabalho foram atingidos os objetivos propostos primordialmente, em empregar a técnica de SAXS para macromoléculas biológicas e em adequar os novos métodos de análise computacional dos dados provenientes do experimento de SAXS.

## VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrego, J. R., Craievich, A. F., Mascarenhas, Y. P., Laure, C. J. (1993). SAXS study of crotopotina at low pH. **Biophys. J.** **64**, 560-564.
- Ahn, H.J., Yoon, H.J., Lee, B., Suh, S.W. (2004). Crystal structure of chorismate synthase; a novel FMN – binding protein fold and functional insights. **J.Mol. Biol.** **336**, 903-915.
- Arni, R. K., Ward, R. J., Gutiérrez, J. M., Tulinsky, A. (1995a). Structure of a calcium-independent phospholipase-like myotoxic protein from **Bothrops asper** venom. **Acta Cryst.** **D51**, 311-317.
- Arruda, E. Z., Silva, N. M., Moraes, R. A., Melo, P. A. (2002). Effect of suramin on myotoxicity of some crotalid snake venoms. **Braz. J. Med. Biol. Res.** **35**, 723-726.
- Azevedo Jr., W. F., Canduri, F., Oliveira, J. S., Basso, L. A., Palma, M. S., Pereira, J. H., Santos, D. S. (2002). Molecular model of shikimate kinase from **Mycobacterium tuberculosis**. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **295**, 142-148.
- Basso, L.A., Silva, L.H.P., Fett-neto, A.G., Azevedo Jr., W.F., Moreira, I.S., Calixto, J. B., Astolfi Filho, S., Santos, R.R., Soares, M.B.P., Santos, D. S. (2005). The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases – A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** **100 (6)**, 475-506.
- Bentley, R., (1990). The shikimate pathway – metabolic tree with many branches. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.** **25**, 307-384.
- Bevigton, P. R. (1969). Data reduction and error analysis for the physical sciences. **New York: McGraw-Hill.** P. 85.
- Berg, J.M.; Tymoczko, J.L.; Stryer, L. **Bioquímica.** 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2004.
- Bon, C., Changeux, J. P., Jeng, T. W., Fraenkel-Conrat, H. (1979). Postsynaptic effects of crotoxina and of its isolated subunits. **Eur. J. Biochem.** **99**, 471-481.
- Bornemann, S., Lowe, D.J., Thorneley, R.N. (1996). The transient kinetics of **Escherichia coli** chorismate synthase: substrate consumption, product formation, phosphate dissociation, and characterization of a flavin intermediate. **Biochemistry** **35(30)**, 9907-9916.
- Brazil, O. V., Franceschi, J. P., Waisbich, E. (1966). Pharmacology of crystalline crotoxin. I. Toxicity. **Mem. Inst Butantan.** **33(3)**, 973-980.

- Breithaupt, H. (1976). Enzymatic characteristics of crotalus phospholipase A2 and the crotoxin complex. **Toxicon**. **14**, 221-233.
- Breithaupt, H., Rübsamen, K., Habermann, E. (1974). Biochemical analysis of crotopotina and the basic Crotalus phospholipase A. **Eur. J. Biochem.** **49**, 333-345.
- Brinda, K. V., Surolia, A., Vishveshwara, S. (2005). Insights into the quaternary association of proteins through structure graphs: a case study of lectins. **Biochem. J.** **391**, 1-15.
- Burch, T. A., Ashburn, L. L. (1951). Experimental therapy of onchocerciasis with suramin and hetrazan; results of a three years study. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **31**, 617-623.
- Butters, T. D. and Hughes, R. C. (1978). Lectin binding to mosquito aedes-aegyptti and human kb cells – structural comparisons of membrane oligosaccharides. **Carbohydr. Res.** **61**, 159-168.
- Chacón, P., Díaz, J. F., Morán, F., Andreu, J. M., (2000). Reconstruction of protein form with X-ray solution scattering and a genetic algorithm. **Journal of Molecular Biology**. Vol. **299**, nº 5, p. 1289-1302.
- Chacón, P., Morán, F., Díaz, J. F., Pantos, E., Andreu, J. M. (1998). Low-resolution structures of proteins in solution retrieved from X-ray scattering with a genetic algorithm. **Biophys. J.**, Vol. **74**, nº 6, p.2760-2775.
- Cintra, A. C. O., Marangoni, S., Oliveira, B., Giglio, J. R. (1993). Bothropstoxin-I: Amino acid sequence and Funtion. **J. Protein Chem.** **12**, 57-64.
- Cintra, A. C. O., Sampaio, S. V., Arni, R. K., Giglio, J. R. (2001). Assignment of the disulfide bridges in bothropstoxin-I, a myonecrotic Lys49 PLA2 homolog from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Journal of Protein Chemistry**, **20**, 377-382.
- Da Silva Giotto, M. T., Garrat, R. C., Oliva, G., Mascarenhas, Y. P., Giglio, J. R., Cintra, A. C. O., Azevedo, W. F., Arni, R. K., Ward, R. J. (1998). Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: conformational changes in bothropstoxin I, a dimeric Lys49-phospholipase A2 homologue. **Proteins Struct. Func. Genet.** **30**, 442-454.
- Davidsson, P., Karlsson, B., Svennerholm, L. (1987). Glycoprotein pattern in human-brain tumors studied using lectin binding after sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis and protein blotting. **Brain Res.** **412**, 254-260.
- Debye, P. (1915). Dispersion of Röntgen rays. **Ann. Physik.**, 46, p. 809-823.
- Debye, P., and Bueche, A. M. (1949). Scattering by an inhomogeneous solid. **J. Appl. Phys.**, **20**, 518.
- Delatorre, P., Rocha, B. A., Souza, E. P., Oliveira, T. M., Bezerra, G. A., Moreno, F.

- B., Freitas, B. T., Santi-Gadelha, T., Sampaio, A. H., Azevedo, Jr. W. F., Cavada, B. S. (2007). Structure of a lectin from *Canavalia gladiata* seeds: new structural insights for old molecules. **BMC Struct. Biol.** **7**, 52.
- Dias, M. V. B., Borges, J. C., Ely, F., Pereira, J. H., Canduri, F., Ramos, C. H. I., Frazzon, J., Palma, M. S., Basso, L. A., Santos, D. S., de Azevedo Jr., W. F. (2006). Structure of chorismate synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Structural Biology.** **154**, 130-143.
- dos Santos, G. C.. Estudos das estruturas terciárias e quaternária de proteínas por espalhamento de raios X a baixo ângulo. 2003. Tese Doutorado – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.
- Dos Santos, J. R. A. Estudo das variações conformacionais do complexo crotoxina e suas subunidades por espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) e difração circular (CD). 1997. Dissertação – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.
- Dosselaere, F. and Vanderleyden, J.A. (2001). A metabolic node in action: chorismate – utilizing enzymes in microorganisms. **Crit. Rev. Microbiol.** **27**, 75-131.
- Duncan, K., (2004). Identification and validation of novel drug targets in tuberculosis. **Curr. Pharm. Des.** **10 (26)**, 3185-3194.
- Fedorov, B. A., Ptitsyn, O. B., Voronin, L. A. (1972). X-ray diffuse scattering of globular protein solutions: Consideration of the solvent influence. **FEBS lett.** **28**, 188-190.
- Filgueira de Azevedo, Jr. W., dos Santos, G. C., dos Santos, D. M., Olivieri, J. R., Canduri, F., Silva, R. G., Basso, L. A., Renard, G., da Fonseca, I. O., Mendes, M. A., Palma, M. S., Santos, D. S. (2003). Docking and small angle X-ray scattering studies of purine nucleoside phosphorylase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **309**, 923-928.
- Finne, J., Castori, S., Feizi, T., Burger, M. M. (1989). Lectin-resistant variants and revertants of mouse melanoma-cells-differential expression of a fucosylated cell-surface antigen and altered metastasizing capacity. **Int. J. Cancer** **43**, 300-304.
- Gandy, M. and Zumla, A. (2002). The resurgence of disease: social and historical perspectives on the ‘new’ tuberculosis. **Soc. Sci. Med.** **55 (3)**, 385-396.
- Glatter, O. (1977). A new method for the evaluation of small-angle scattering data. **J. Appl. Cryst.** **10**, 415-421.
- Glatter, O., and Kratky, O. (1982). Small-angle X-ray scattering. Academic Press INC. (London) LTD.
- Griffiths, D. W. R. and Stephenson, T. J. (1988). Lectin agglutinins-a comparative-

- study of *Lotus tetragonolobus* and *Ulex europaeus*-1 as markers of vascular endothelium in follicular thyroid-carcinoma. *Med. Lab. Sci.* **45**, 45-51.
- Guinier, A. (1939). Point-by-point chemical analysis by X-ray spectroscopy. *Ann. Phys.*, **12**, 161.
- Guinier, A., and Fournet, G. (1955). Small-angle Scattering of X-rays. New York. John Wiley & Sons, Inc.
- Gurd, J. W. (1979). Molecular and biosynthetic heterogeneity of fucosyl glycoproteins associated with rat-brain synaptic junctions. *BBA*, **555**, 221-229.
- Gutiérrez, J. M., Lomonte, B. (1995). Phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon.*, **33**, 1405-1424.
- Gutiérrez, J. M., Nunez, J., Diaz, C., Cintra, A. C. O., Homsí-Brandenburg, M. I., Giglio, J. R. (1991). Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothrotoxin II, a phospholipase A<sub>2</sub> isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. *Expl. Molec. Path.* **55**, 217-229.
- Haselhorst, T., Weimar, T., Peters, T. (2001). Molecular recognition of sialyl Lewis(x) and related saccharides by two lectins. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 10705-10714.
- Hendon, R. A., Fraenkel-Conrat, H. (1971). Biological roles of the two components of crotoxin. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **68**, 1560-1563.
- Holland, D. R., Clancy, L. L., Muchmore, S. W., Ryde, T. J., Einspahr, H. M., Finzel, B. C., Heinrickson, R. L., Watenpaugh, K. D. (1990). The crystal structure of a lysine 49 phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of the cottonmouth snake at 2.0 Å resolution. *J. Biol. Chem.* **265**, 17649-17656.
- Homsí-Brandenburg, M. I., Queiroz, L. S., Santo-Neto, H., Rodriguez-Simioni, L., Giglio, J. R. (1988). Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothrotoxin. *Toxicon.* **26**, 615-627.
- Horst, J., Hendon, R. A., Fraenkel-Conrat, H. (1972). The active components of crotoxin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **46**, 1042-1047.
- Imura, J. et al.,. (2004). Multilocular cystic renal cell carcinoma: a clinicopathological, immuno- and lectin histochemical study of nine cases. *Apmis* **112**, 183-191.
- Jeng, T. W., Hendon, R. A., Fraenkel-Conrat, H. (1978). Search for relationships among the hemolytic, phospholipolytic, and neurotoxic activities of snake venoms. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **75**, 600-604.
- Johnson, E. K., Ownby, C. L. (1993). Isolation of a myotoxin from the venom of *Agkistrodon contortrix laticinctus* (broadbanded copperhead) and pathogenesis of myonecrosis induced by it in mice. *Toxicon.* **31**, 243-255.

- Kalb, A. J. (1968). Separation of 3 L-fucose-binding protein of *Lotus tetragonolobus*. **BBA** **168**, 532.
- Kini, R. M. (1997). In *Venom phospholipase A2 enzyme structure, function and mechanism* (Kini, R. M., Ed.), Wiley, Chichester, U. K., pp. 1-28.
- Kirkpatrick, S., Gelatt, C. D. Jr., Vecchi, M. P. (1983). Optimization by simulated annealing. **Science**. **220**: 671-680.
- Kitzing, K., Auweter, S., Amrhein, N., Macheroux, P. (2004). Mechanism of chorismate synthase. Role of the two invariant histidine residues in the active site. **J. Biol. Chem.** **279**(10), 9451-9461.
- Koch, B. et al., (1983). The binding of different lectins on peripheral-blood mononuclear-cells from patients with chronic inflammatory and malignant diseases. **Immunobiology**. **164**, 99-109.
- Konami, Y., Yamamoto, K., Osawa, T. (1990). The primary structure of the *Lotus tetragonolobus* seed lectin. **FEBS Lett.** **268**, 281-286.
- Kozin, M. B., and Svergun, D. I. (2001). Automated matching of high and low resolution structural models. **J. Appl. Cryst.** **34**, 33-41.
- Kratky, O. and Pilz, I. (1978). A comparison of X-ray small-angle scattering results to crystal structure analysis and other physical techniques in the field of biological macromolecules. **Quarterly Reviews of Biophysics**. **11**, 39-70.
- Laemmli, U. K. (1970). **Nature**. **227** 680-685.
- LaRocca, R. V., Cooper, M. R., Uhrich, M., Danese, R., Walther, M. M. Linehan, W. R., Laskowski, R. A., Moss, D. S., Thornton, J. M. (1993). Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. **J. Mol. Biol.** **231**, 1049-1067.
- Laue, T. M. (2001). Biophysical studies by ultracentrifugation. **Curr. Opin. Struct. Biol.** **11**, 579-583.
- Lomonte, B., Angulo, Y., Calderon, L. (2003). Na overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, **42**, 885-901.
- Lomonte, B., Gutiérrez, J. M. (1989). A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**. **27**, 725-733.
- Macheroux, P., Bornemann, S., Ghisla, S., Thorneley, R. N. (1996). Studies with flavin analogs provide evidence that a protonated reduced FMN is the substrate – induced transient intermediate in the reaction of *Escherichia coli* chorismate synthase. **J. Biol. Chem.** **271**(42), 25850-25858.

- Macheroux, P., Schonbrunn, E., Svergun, D. I., Volkov, V. V., Koch, M. H., Bornemann, S., Thorneley, R. N. (1998). Evidence for a major structural change in *Escherichia coli* chorismate synthase induced by flavin and substrate binding. **Biochem, J.** **335**, 319-327.
- Macheroux, P., Schmid, J., Amrhein, N., Schaller, A., (1999). A unique reaction in a common pathway; mechanism and function of chorismate synthase in the shikimate pathway. **Planta** **207**, 325-334.
- Maclean, J. and Ali, S. (2003). The structure of chorismate synthase reveals a novel flavin binding site fundamental to a unique chemical reaction. **Structure** **11**, 1499.
- Mascarenhas, Y. P., Stouten, P. F. W., Beltran, J. R., Laure, C. L., Vriend, G. (1992). Structure-function relationship for the highly toxic crotoxin from *Crotalus durissus terrificus*. **European Biophysics Journal** **21**, 199-205.
- Mayliepfenninger, M. F. and Jamieson, J. D. (1979). Distribution of cell-surface saccharides on pancreatic cells. 2. Lectin-labeling patterns on mature guinea-pig and rat pancreatic cells. **J. Cell. Biol.** **80**, 77-95.
- Miettinen, H. H. A. et al., (1983). Cellular-origin and differentiation of renal carcinomas-a fluorescence microscopic study with kidney-specific antibodies, antiintermediate filament antibodies, and lectins. **Lab. Invest.** **49**, 317-326.
- Mittelbach, P. and Porod, G. (1965). **Kolloid-Z. u. Z. Polymere** **202**,40-49.
- Moreno, F. B. M. B., Martil, D. E., Cavada, B. S., de Azevedo, W. F. (2006). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of na anti-H(O) lectin from *Lotus tetragonolobus* seeds. **Acta Crystallogr. F** **62**, 680-683.
- Moreno, F. M. M. B., de Oliveira, T. M., Martil, D. E., Viçoti, M. M., Bezerra, G. A., Abrego, J. R. B., Cavada, B. S., de Azevedo, W. F. (2008). Identification of a new quaternary association for legume lectins. **J. Structural Biology.** **161(2)**, 133-143.
- Morrissey, J. H. (1981). Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Anal. Biochem**, **117**, 307-310.
- Murakami, M. T., Arruda, E. Z., Melo, P. A., Martinez, A. B., Calil-Elias, S., Tomaz, M. A., Lomonte, B., Gutiérrez, J. M., Arni, R. K. (2005). Inhibition of myotoxic activity of *Bothrops asper* myotoxin II by the anti-trypanosomal drug suramin. **J. Mol. Biol.** **350**, 416-426.
- Murakami, M. T., Viçoti, M. M., Abrego, J. R. B., Lourenzoni, M. R., Cintra, A. C. O., Arruda, E. Z., Tomaz, M. A., Melo, P. A., Arni, R. K. (2007). Interfacial surface charge and free accessibility to the PLA2-active site-like region are essential requirements for the activity of Lys49 PLA2 homologues. **Toxicon.** **49**, 378-387.

- Napier, P. W., Everhart, D. L., Grundbac, F. J. (1974). Characterization of a human saliva antigen precipitated by a lectin from *Lotus tetragonolobus*. *Vox Sang.* **27**, 447-458.
- Ninio, J., Luzzati, V., Yaniv, M. (1972). Comparative small-angle x-ray scattering studies on unacylated, acylated and cross-linked *Escherichia coli* transfer RNA I Val. *J. Mol. Biol.* **71**, 217-229.
- Ownby, C. L., Selistre de Araujo, H. S., White, S. P., Fletcher, J. E. (1999). Lysine 49 phospholipase A<sub>2</sub> proteins. *Toxicon.* **37**, 441-445.
- Paradies, H. H. and Breithaupt H. (1975). On the subunit structure of crotoxin: hydrodynamic and shape properties of crotoxin, phospholipase A and crotapotin. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* Vol **66**, n° 2: 496 – 504.
- Pereira, J. H., Canduri, F., Oliveira, J. S., Silveira, N.J.F., Basso, L.A, Palma, M.S., Azevedo Jr., W.F. Santos, D.S. (2003). Structural bioinformatics study of EPSP synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **312(3)**, 608-614.
- Pereira, J.H., Oliveira, J.S., Canduri, F., Dias, M.V.B., Palma, M.S., Basso, L.A., Santos, D.S., Azevedo Jr., W.F. (2004). Structure of shimimate kinase from *Mycobacterium tuberculosis* reveals the binding of shikimic acid. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **60 (Pt.12, Pt2)**, 2310-2319.
- Pereira, M. F., Novello, J. C., Oliveira, B., Giglio, J. R., Cintra, A. C. O., Marangone, S. (1995). The primary structure of bothropstoxin-II. *Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular.* Abstr. **M143**. p. 176.
- Pereira, M. F., Novello, J. C., Cintra, A. C., Giglio, J. R., Landucci, E. T., Oliveira, B., Marangoni, S. (1998). 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(4)**, 381-386.
- Porod, G. (1948). Multiple diffuse small angle scattering of X-ray. *Acta Physica Austriaca.*, **2**, 133.
- Porod, G. (1951). *Kolloid-Z.* **124**, 83.
- Quevillon-Cheruel, S., Leulliot, N., Meyer, P., Graille, M., Bremang, M., Blondeau, K., Sorel, I., Poupon, A., Janin, J., van Tilbeurgh. (2004). Crystal structure of the bifunctional chorismate synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **279**, 619-625.
- Raedler, A., Schmiegel, W. H., Readler, E., Arndt, R., Thiele, H. G. (1983). Lectin-defined cell-surface glycoconjugates of pancreatic-cancer cells and their nonmalignant counterparts. *Exp. Cell. Biol.* **51**, 19-28.

- Raju, G. C. and Lee, Y. S. (1988). Lectin expression in carcinoid-tumors of the gastrointestinal-tract. *J. Pathol.* **154**, 263-268.
- Rosemberg, P. (1990). In handbook of toxinology (Shier, W. T., and Mebs. D., eds.), Dekker, New York, pp. 67-277.
- Rübsamen, K., Breithaupt, H., Habermann, E. (1971). Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex, I. Subfractionation and recombination of the crotoxin complex. *Naunyn. Schmiedebergs Arch Pharmakol.* **270(3)**, 274-288.
- Sagan, Z., Olszewska, I., Pawlus, M. (1963). Research on phytoagglutinin from the seeds of *Lotus tetragonolobus* L. and some other plants. *Acta Pol. Pharm.* **20(20)**, 83-88.
- Scott, D. L., Achari, A., Vidal, J. C., Singler, P. B. (1992). Crystallographic and biochemical studies of the (inactive) lys-49 phospholipase A2 from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*. *J. Biol. Chem.* **267**, 22645-22657.
- Silveira, N.J.F., Uchôa, H.B., Pereira, J.H., Canduri, F., Basso, L.A., Palma, M.S., Santos, D.S., Azevedo Jr., W.F. (2005). Molecular models of protein targets from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Mol. Model.* **11 (2)**, 160-166.
- Staudacher, E., Altmann, F., Wilson, I. B.H., Marz, L. (1999). Fucose in N-glycans: from plant to man. *BBA Gen. Subj.* **1473**, 216-236.
- Svergun, D. I. (1992). Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *J. Appl. Cryst.* **25**, 495-503.
- Svergun, D. I. (1999). Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophysical Journal.* **76**, 2879-2886.
- Svergun, D. I., and Koch, M. H. J. (2003). Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution. *Rep. Prog. Phys.* **66**, 1735-1782.
- Svergun, D. I., Semenyuk, A. V., Feigin, L. (1988). A. Small-angle-scattering-data treatment by the regularization method. *Acta Crystallographica.* **A44**, 244-250.
- Svergun, D. I., Volkov, V. V., Kozin, M. B., Stuhrmann, H. B. (1996). New developments in direct shape determination from small-angle scattering. *Acta Cryst.*, **A52**, 419-426.
- Svergun, D., Barberato, C., Koch, M. H. J. (1995). CRY SOL- a program to evaluate X-ray solution scattering of Biological macromolecules from atomic coordinates. *J. Appl. Cryst.* **28**, 768-773.

- Thomas, C. J., Surolia, A. (2000). Mode of molecular recognition of L-fucose by fucose-binding legume lectins. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **268**, 262-267.
- Tikhonov, A. N., and Arsenin, V. A. (1977). Solution of ill-posed problems. New York: Wiley.
- Turner, G. A., Goodarzi, M. T., Thompson, S. (1995). Glycosylation of alpha-1-proteinase inhibitor and haptoglobin in ovarian cancer-evidence for 2 different mechanisms. **Glycoconj. J.** **12**, 211-218.
- Ulrich, W., Horvat, R., Krisch, K. (1985). Lectin histochemistry of kidney tumours and its pathomorphological relevance. **Histopathology.** **9 (10)**, 1037-1050.
- Van Oosterom, A. T., ten Bokkel Huinink, W. W., van der Burg, M. E., Vermorken, J. B., Willemse, P. H. Neijt, J. P. (1991). Phase II clinical trial of doxifluridine in patients with advanced ovarian cancer. **Eur. J. Cancer,** **27**, 747-749.
- Vigil, D., Gallagher, S. C., Trehwella, J., Garcia, A. E. (2001). Functional dynamics of the hydrophobic cleft in the N-domain of calmodulin. **Biophys. J.** Vol. **80**, n° 5. p. 2082-2092.
- Viola, C. M., Saridakis, V., Christendant, D. (2004). Crystal structure of chorismate synthase from *aquifex aecolicus* reveals a novel beta alpha beta sandwich topology. **Proteins:Struct. Funct. Genet.** **54**, 166-169.
- Volkiv, V. V., and Svergun, D. I. (2003). Uniqueness of **ab initio** shape determination in small-angle scattering. **J. Appl. Cryst.** **36**, 860-864.
- Walker, R. A. (1984). The binding of peroxidase-labelled lectins to human breast epithelium. III-Altered fucose-binding patterns of breast carcinomas and their significance. **J. Pathol.** **144(2)**, 109-117.
- Walther, D., Cohen, F. E., Doniach, S. (2000). Reconstruction of low-resolution three-dimensional density maps from one-dimensional small-angle X-ray solution scattering data for biomolecules. **J. Appl. Cryst.** **33**, p.350-363.
- Ward, R. J., de Azevedo, W. F., Arni, R. K. (1998). At the interface: crystal structures of phospholipases A2. **Toxicon,** **36**, 1623-1633.
- Welch, G. R., Cole, K. W., Gaertner, F. H. (1974). Chorismate synthase of *Neurospora crasser*: a flavoprotein. **Arch. Biochem. Biophys.** **165**, 505-518.
- WHO. (2004). World Health Organization. **WHO Report, Geneva, Switzerland.** WHO/CDS/TB/2004.331.
- Williamson, J., Desowitz, R. S. (1956). Prophylactic activity of suramin complexes in animal trypanosomiasis. **Nature.** **177**, 1074-1075.

## TRABALHOS PUBLICADOS

- Murakami, M.T., Lourenzoni, M.R., Arruda, E.Z., Tomaz, M.A., Viçoti, M.M., Abrego, J.R., Melo, P.A, Arni, R.K. (2008). Biochemical and structural investigations of Bothropstoxin-II, a myotoxic Asp49 phospholipase A2 from *Bothrops jararacussu* venom. **Protein Pept. Lett.** **15(9)**: 1002-8.
- Moreno, F.B.M.B., de Oliveira, T.M., Martil, D.E., Viçoti, M.M., Bezerra, G.A., Abrego, J.R.B., Cavada, B.S., de Azevedo Jr, W.F. (2008). Identification of new quaternary association for legume lectins. **Journal of Structural Biology.** **161**. 133-143.
- Murakami, M. T., Viçoti, M.M., Abrego, J.R.B., Lourenzoni, M.R., Cintra, A.C.O., Arruda, E.Z., Tomaz, M.A., Melo, P.A., Arni, R.K. (2007). Interfacial surface charge and free accessibility to the PLA<sub>2</sub>-active site-like region are essential requirements for the activity of Lys49 PLA<sub>2</sub> homologues. **Toxicon.** **49**. 378-387.

## **ANEXO**

## Biochemical and Structural Investigations of Bothropstoxin-II, a Myotoxic Asp49 Phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops jararacussu* Venom

Mário T. Murakami<sup>1,2</sup>, Marco R. Lourenzoni<sup>3</sup>, Emerson Z. Arruda<sup>4</sup>, Marcelo A. Tomaz<sup>4</sup>, Magno M. Viçoti<sup>2</sup>, José R. B. Abrego<sup>2</sup>, Paulo A. Melo<sup>4</sup> and Raghuvir K. Arni<sup>2,5,\*</sup>#

<sup>1</sup>Center for Structural Molecular Biology, Brazilian Synchrotron Light Laboratory, LNLs, Campinas, SP, Brazil; <sup>2</sup>Center for Structural and Molecular Biology, Department of Physics, IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brazil; <sup>3</sup>Associated Researcher, São Carlos, SP, Brazil; <sup>4</sup>Department of Basic and Clinical Pharmacology, ICB, CCS, UFRJ, RJ, Brazil; <sup>5</sup>Center for Applied Toxinology, Butantan Institute, São Paulo, SP, Brazil

**Abstract:** Bothropstoxin-II a calcium-dependent enzyme from *Bothrops jararacussu* venom causes tissue damage and several haemostatic disorders including platelet aggregation. In order to elucidate the structural determinants of its multiple pharmacological activities, we have studied the effects of suramin on Bothropstoxin-II and present details concerning the mode of binding.

**Keywords:** Phospholipases A<sub>2</sub>, suramin, pharmacological activities, structural studies.

**#Author Profile:** Prof. Raghuvir K. Arni, Head, Center for Structural and Molecular biology, PhD Free University Berlin/ Technical University Berlin, Research Associate European Molecular Biology Laboratory (Heidelberg). Visiting Adjunct Professor Michigan State University. Full Professor: Department of Physics, IBILCE/UNESP, Brazil. www.crystallography.ibilce.unesp.br



### INTRODUCTION

Phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>, E.C. 3.1.1.4, phosphatide *sn*-2 acylhydrolases) are ubiquitous enzymes which catalyze the hydrolysis of the *sn*-2; ester bond of phospholipids releasing fatty acids, lysophospholipids and arachidonic acid, a precursor of eicosanoids, which is implicated in triggering inflammatory reactions [1, 2]. PLA<sub>2</sub>s are often membrane associated and are involved in phospholipid metabolism, signal transduction, inflammatory process, hemostatic system and a number of diseases such as atherosclerosis, schizophrenia, Alzheimer's disease and apoptosis [3].

Snake venoms are an abundant source of PLA<sub>2</sub>s, which exhibit a wide range of pharmacological activities that include hemorrhagic, myotoxic, hemolytic, edema formation, hypotensive, presynaptic and postsynaptic neurotoxicity, cardiotoxic, platelet aggregation and convulsant [3-7]. Some of these activities can be correlated with enzymatic activity whereas, others such as myotoxicity are independent of enzymatic activity [8, 9]. It has been suggested that some specific molecular sites are responsible for the pharmacological and toxic actions, which include anticoagulant and platelet aggregation activities [8].

The venom from *Bothrops* sp. has been extensively studied and three PLA<sub>2</sub>s have been identified: two catalytically-active, an acidic Asp49 PLA<sub>2</sub> (BthA-I) [10], a basic Asp49 PLA<sub>2</sub> (Bothropstoxin-II; BthTX-II) [11] and a catalytically-inactive basic Lys49 PLA<sub>2</sub> (Bothropstoxin-I, BthTX-I) [12].

BthTX-II displays myotoxic and anticoagulant effects, however it is catalytically 4-fold less active than BthA-I [13-14]. Recently, it has been shown BthTX-II induces platelet aggregation and secretion through multiple signal transduction pathways [15, 16].

In order to elucidate the structural determinants of its multiple pharmacological activities, we describe the effects of suramin on BthTX-II and present details concerning the mode of binding of suramin assessed by modeling and molecular dynamics.

### MATERIALS AND METHODS

#### Purification and Biochemical Characterization

Crude desiccated *Bothrops jararacussu* venom was obtained from a local serpentarium and BthTX-II was purified by gel filtration and cationic exchange chromatography following the published protocol [17]. The purity of the samples were confirmed by SDS-PAGE [18] and the protein concentrations were determined using the Beer-Lambert law based on the molar extinction coefficient at 280 nm (22,775 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>).

#### Creatine-Kinase (CK) Determination

CK activity was determined by using a diagnostic kit (Sigma Chemical Co., USA). The rate of CK release from the isolated muscles was expressed as an increase of the CK release compared to control values. Basal release rate refers to the enzyme loss from the muscles into the PSS media, during the equilibrating period of perfusion (one hour) starting just after the preparation had been mounted in the sam-

\*Address correspondence to this author at the Department of Physics, IBILCE/UNESP, Cristovão Colombo 2265, São José do Rio Preto, SP, 15054-000, Brazil; Tel: 00-55-17-3221-2460; Fax: 00-55-17-3221-2247; E-mail: arni@ibilce.unesp.br

ple-collecting unit. The CK activity was expressed as International Units, where 1 U is the amount that catalyzes the transformation of 1  $\mu\text{mole}$  of substrate at 25 °C. The rate of CK release from the isolated muscle was expressed as enzyme units released into the medium per gram per hour of collection ( $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{hr}^{-1}$ ) in accordance with previously published results [19, 20].

#### **In Vivo Myotoxic Assay**

BthTX-I or -II, was dissolved in a physiological saline solution (PSS; 0.1 ml) and injected i.m. into the thigh of Swiss mice (20-25 g). In accord with each protocol, the amount of toxin or suramin administered was adjusted taking into account the weight of each animal and injected in a dose of 2.5  $\mu\text{g/g}$  for the toxin and 1.0  $\mu\text{g/g}$  for suramin. Previous studies demonstrated that i.m. injection of 0.1 ml PSS has no effect on plasma CK release levels [19, 20]. In this experimental protocol, the toxins alone or each toxin plus suramin were incubated for 15 minutes at 37 °C, and then injected i.m. into each animal, and the final volume of toxin injection, either alone or toxin plus suramin, was 0.1 ml. The animals were lightly anesthetized with diethyl ether immediately before and 2 hours after the injection of the toxins for the collection of blood in accord of guidelines for care and use of laboratory animals [19, 21]. Plasma was separated by centrifugation and stored at 4 °C for subsequent determination of the CK activity. The procedure for measurement of CK activity has been described previously [19, 20]. Enzyme activity was expressed as international Units per liter (U/L), where 1 U is the amount that catalyzes the transformation of 1  $\mu\text{mol}$  of substrate at 25°C.

#### **Small Angle X-ray Scattering Data Acquisition and Analysis**

Small angle X-ray scattering (SAXS) measurements were conducted at room temperature utilizing the D11A-SAXS beamline at the Brazilian National Synchrotron Light Source (LNLS) where the wavelength was set to 1.488 Å. The distance of the detector was set to 855.1 mm. A sample concentration of 4 – 10 mg/ml in a 20 mM, pH 7.0 Tris-HCl buffer was used and serial dilutions were prepared to permit the extrapolation of the SAXS curves to zero concentration. Data acquisitions were performed by exposing several frames for 600 s for each sample. Data fitting was performed using the GNOM program [22] and the radius of gyration ( $R_g$ ) of the protein in solution was determined from the lowest  $q$  values using the Guinier approximation [23]. The *ab initio* shape determination was performed by the dummy atom model method; using the program DAMMIN [24] and the independent *ab initio* reconstructions were averaged with program DAMAVER. The shape reconstruction and the crystallographic atomic coordinates were superimposed (SUPC-OMB 2.0) [25]. The superpositioning was assessed by normalized spatial discrepancy (NSD or parameter  $d$ ), which estimates the similarity between two different three-dimensional objects. NSD values < 1.5 indicate high correlation of the surface complementarity and are typical for the comparisons between an atomic model and the corresponding DAMMIN model. The theoretical SAXS pattern based on the atomic coordinates was calculated using the program CRY SOL [26].

#### **Molecular Modeling**

The atomic coordinates of *Bothrops asper* myotoxin II (PDB accession code: 1Y4L) [27] and BthTX-I (PDB accession code: 2H8I) [28] served as the initial models for obtaining a structural model of BthTX-II based on restraint-based modeling as implemented in the MODELLER program [29]. The overall model was improved enforcing the proper stereochemistry using spatial restraints and CHARMM energy terms, followed by conjugate gradient simulation based on the variable target function method. The loops were optimized using ModLoop [30] based on the satisfaction of spatial restraints, without relying on a database of known protein structures. The final model was submitted under energy minimization simulations to check stability and consistency of the model using GROMACS program [31]. The overall stereochemical quality of the final model was assessed by the program PROCHECK [32]. The structural analysis and superpositioning were carried out using COOT [33].

#### **Molecular Dynamics**

Explicit solvent molecular dynamics (MD) simulations were carried out using GROMACS 3.2 software package [31] and the GROMOS-96 (43a1) force field [34]. The system was composed of  $\text{PLA}_2$  and suramin immersed in a NaCl saline solution. The topology of suramin was obtained from the Dundee PRODRG Server ([http://davap1.bioch.dundee.ac.uk/cgi-bin/prodrgr\\_beta](http://davap1.bioch.dundee.ac.uk/cgi-bin/prodrgr_beta)). The initial sets of atomic coordinates of BthTx-II in contact with suramin were modeled based on the crystal structure of the complex *Bothrops asper* myotoxin II and suramin (PDB accession code: 1Y4L) [27]. All MD simulations were performed in isothermal-isobaric ensemble, using the “leapfrog” algorithm [35] to integrate the equations of motion with a time step of 2.0 fs over a total time of 5.0 ns. The LINCS algorithm [36] was used to constrain protein covalent bonds involving hydrogen atoms, and the SETTLE algorithm [37] was used to constrain water molecules. The short and long-range interactions, van der Waals and electrostatic, were calculated with a cutoff of 1.4 nm. The simulations of the complex were performed in three phases. In the first phase, the short simulation was performed to equilibrate the system for 100 ps, restraining the positions of the protein atoms. In the second phase, in order to relax the proteins structures, only the  $\text{PLA}_2$  in water was simulated. This approach was used to optimize the  $\text{PLA}_2$ -suramin binding in aqueous solution and relax the system. In the last phase, the  $\text{PLA}_2$  and suramin simulation was performed and root mean square deviation (RMSD) and electrostatic binding energy were computed.

## **RESULTS & DISCUSSION**

#### **Myotoxicity In Vivo**

Intramuscular injections of BthTX-I or II alone increased plasma CK activity (Figs. 1A and 1B). These data show that i.m. injection of both toxins (2.5  $\mu\text{g/g}$ ) induced a significant increase in plasma CK activity compared to PSS. This i.m. toxin injection increased CK levels from  $85.16 \pm 7.16$  U/L (mean  $\pm$  SEM,  $N = 6$ ) to  $2619.90 \pm 112.03$  U/L ( $N = 6$ ) for BthTX I or to  $2016.25 \pm 197.42$  U/L ( $N = 6$ ) after 2 h. The PSS and myotoxic agents values of plasma CK activity observed are in accordance with previous observations [38]. Pre-

incubation with suramin significantly ( $P < 0.05$ ) inhibited the increase in plasma CK activity induced by BthTX-I to a maximum of  $1650 \pm 53$  U/L (Fig. 1A). In this way, BthTX-II, a basic Asp49 PLA<sub>2</sub>, increases the plasma CK levels up to  $2100 \pm 139$  U/L (Fig. 1B). However, the preincubation of BthTX-II with suramin for 15 min does not affect the increase of plasma CK levels (Fig. 1B). Previous results have demonstrated effective inhibition of the myotoxic activity by suramin of basic Lys49 PLA<sub>2</sub>s as reported for ACL myotoxin [38], BthTX-I [39] and Basp-II [27]. Increase of the suramin concentration 2-5 fold did not alter the inhibition levels (results not shown).

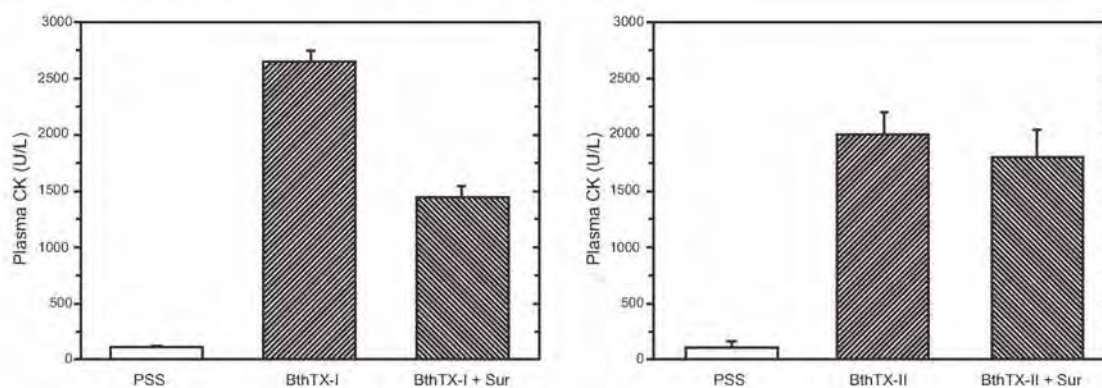
### Small Angle X-Ray Scattering

The SAXS results indicate a radius of gyration (Rg) of 15.46 Å for BthTX-II derived from the lowest q values using the Guinier approximation [23], which is in agreement with the theoretical Rg calculated (15.75 Å) for a dimer formed by hydrophobic contacts between the interfacial faces or sites as previously described by Murakami *et al.* [28]. The SAXS data indicating the scattering profile and distance distribution function  $p(r)$  are presented in Figs. (2A and 2B), respectively. The envelope obtained from the SAXS data

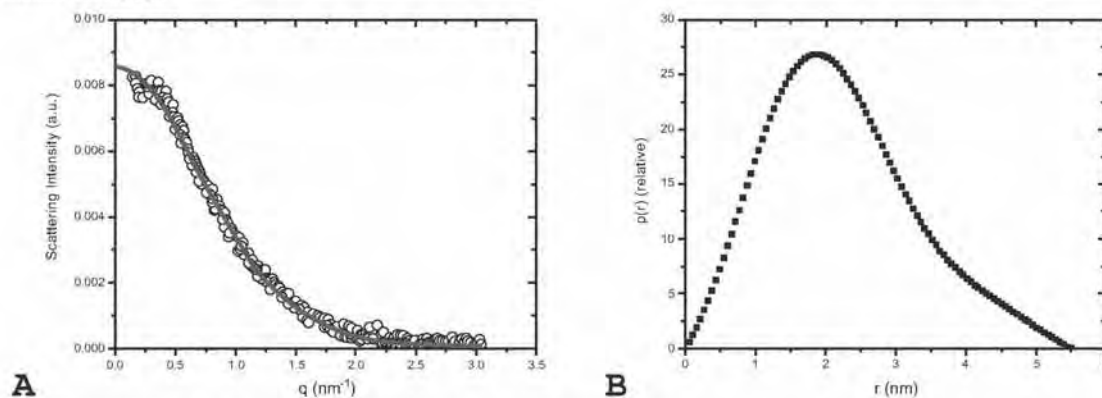
was compared with the dimer formed by two molecules of BthTX-II resulting in a NSD value of  $0.526 \pm 0.015$  that indicates excellent correlation between the envelope and modeled structure (Fig. 3).

### Overall Structure Description

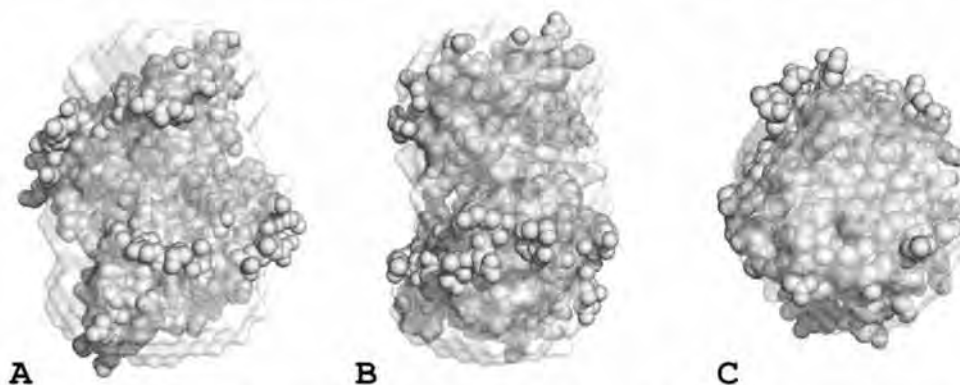
The Ramachandran plots for the final model indicates that over 95 % of the amino acid residues are located in the favorable and permitted regions, and structural quality assessed by PROCHECK, VERIFY3D and COOT strongly indicate that the model is coherent. The molecular topology of BthTX-II conserves all the main structural features of snake venom PLA<sub>2</sub>s containing a N-terminal  $\alpha$ -helix (H1) (residue 2 to residue 12) and the two long anti-parallel disulfide linked  $\alpha$ -helices (H2 from residue 40 to residue 55 and H3 from residue 86 to residue 103) with a mean distance of 10 Å between the helical axes and two short helical turns (residues 19-22; SH4 and 108-110; SH5) [6]. The  $\beta$ -wing region (residues 74-84) is structurally conserved and a disulfide bridge preserves its relative orientation. The active site residues His48, Asp99, Tyr52 and Tyr73 in complement with Asp49 and calcium ion form the "catalytic" H-bonding network.



**Figure 1.** Effect of plasma CK release upon intramuscular injection of BthTX I (panel A) and BthTX II (panel B) (2.5 mg/kg) alone or plus suramin (1.0 mg/kg).



**Figure 2.** Experimental X-ray scattering intensity (A) and  $p(r)$  distribution (B) curves.



**Figure 3.** (A) Superpositioning of the atomic coordinates (represented by gray spheres) of the BthTX-II dimer on the SAXS *ab initio* envelope (light gray transparent surface). Panels B and C are rotated by 90° around the Y-axis and the X-axis, respectively.

Superpositioning of BthTX-II on BthTX-I resulted in a RMSD of 3.2 Å with major displacements in the C-terminus,  $\beta$ -wing and N-terminal  $\alpha$ -helix, with a maximum RMSD of 7 Å. In BthTX-II, the C-terminus is completely different adopting an extended conformation, which perturbs the calcium-binding loop and consequently modifies the suramin-binding site, besides the overall surface charge is favorable to suramin binding (Figs. 4B and 4D). N-terminal  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -wing, that are structurally close, also display large differences in comparison with BthTX-I.

Superpositioning of the C $\alpha$  atoms of the BthTX-II on BthA-I resulted in an RMSD of 3.4 Å with significant differences in the calcium-binding loop. Surface charge analysis indicates that the charge distribution profiles along the interfacial faces are different, being predominantly negatively charged in BthA-I and positively charged in BthTX-II (Figs. 5A, 5B and 5C), and likely plays a key role in the ability of these proteins to bind phospholipids.

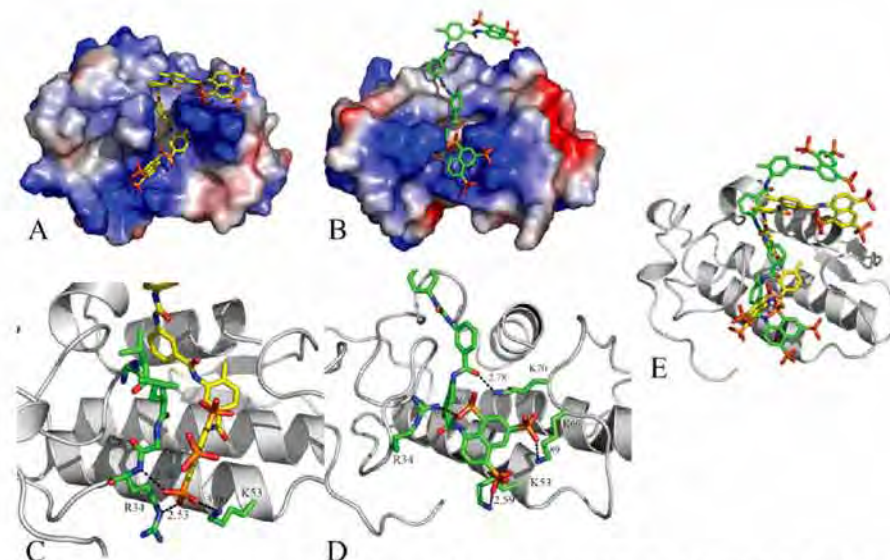
#### Suramin Interactions

In the MD simulations of BthTX-II with suramin, the structural stability was monitored by the RMSDs of the protein atoms in phases II and III, which undergo small positional shifts (around 2.1 Å, Fig. 6A) and a corresponding reduction in the IIP from -72 to -115 Kcal.mol<sup>-1</sup> (Fig. 6B), indicating that the hydrated structure of BthTX-II is similar to that obtained by homology based molecular modeling. The resulting BthTX-II/suramin complex model obtained from the MD simulations resulted in a different conformation as that observed in the crystal structure of the Basp-II/suramin complex (Fig. 4E). In the Basp-II/suramin complex, the residues Arg34 and Lys53 play key roles in the interaction with the sulfonated naphthalene ring (Fig. 4C) and the central phenyl rings embrace the calcium-binding loop (Fig. 4A) whereas the short helical turn (SH4) shields the whole hydrophobic surface, inducing a drastic change in the overall charge of the interfacial recognition face of the protein [27,40]. In BthTX-II, the polysulfonated naphthalene ring is still anchored by Arg34 and Lys53 with additional hydrogen bonds with Lys69 and Lys70, however it is flipped

to the opposite side (Fig. 4D) and the intimate contacts between the central aromatic rings with the calcium-binding loop are lost due to the different extended C-terminal conformation (Fig. 4B), without forming the characteristic knuckle observed in basic snake venom PLA<sub>2</sub>s, which provokes structural changes in the calcium-binding loop and consequently hinders suramin binding. Moreover, the slight changes in the surface electrostatic profile in the vicinity of the suramin-binding site and the presence of Asp at position 49 instead of Lys at the bottom of the anchoring point of the naphthalene ring could contribute to the different orientation of the suramin tail. In the other extremity, the second sulfonated naphthalene ring is also displaced due to the altered conformations of the N-terminal  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -wing (Fig. 4E). In conclusion, the number of hydrophobic contacts are significantly reduced, mainly between the medial and distal regions that hinders suramin binding resulting in reduced inhibition of myotoxicity.

#### Catalytic and Pharmacological Sites of BthTX-II

The electrophile calcium, is an essential multifunctional cofactor for the catalytic activity of PLA<sub>2</sub>s by stabilizing the oxy-anion of the tetrahedral intermediate during the hydrolytic reactions [41]. The substitution of calcium by other divalent ions such as barium or cadmium results in a significant reduction of activity [42]. Typically, bipyramidal metal ion coordination with seven ligands is observed in group I/II PLA<sub>2</sub>s. However, a different conformation where the calcium ion is penta-coordination by a distorted pyramidal cage formed by backbone atoms has been reported [43]. In the absence of calcium, this loop assumes a different conformation, particularly in the region formed by residues 31 and 32. These structural distortions in the calcium-binding loop in the absence of calcium have been observed in the piratoxin-III and BthA-I crystal structures [43, 44]. In the modeled BthTX-II structure, the calcium-binding loop displays a structural displacement induced by the large steric volume occupied by the indole side chain of Trp31 and the extended C-terminus conformation that comprises a novel orientation for the calcium-binding loop due to the intimate contacts maintained by the hyperpolarized carbonyl oxygen Cys29-



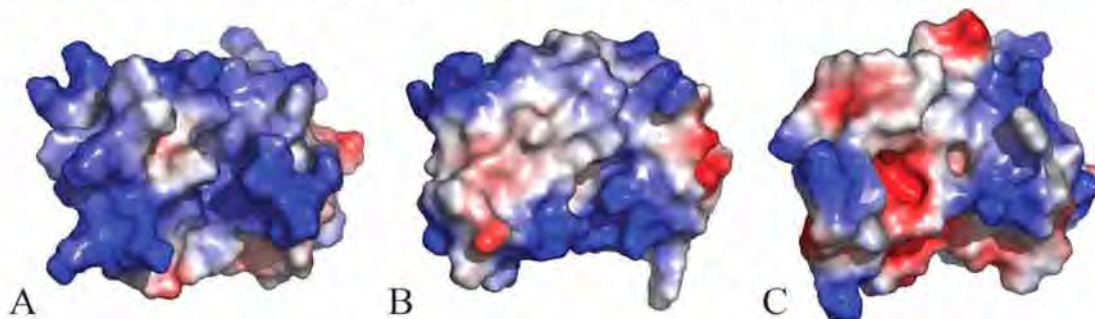
**Figure 4.** Surface charge distribution representations and binding of suramin in BthTX-I (A) and BthTX-II (B). Bond distances and interactions of the naphthalene ring of suramin in BthTX-I (yellow) (C) and BthTX-II (green) (D). (E) Ribbon representation of BthTX-II displaying the different conformations adopted by suramin upon binding to BthTX-I (yellow) and BthTX-II (green).

Gly30 bond by the Lys122N $\zeta$  atom and additional stabilized by the disulphide bridge between Cys27 and Cys125. These structural changes observed in BthTX-II and the charge distribution discussed earlier could explain the low catalytic activity of BthTX-II in comparison with BthA-I.

In addition to the catalytic activity, BthTX-II exhibits an anticoagulant activity via a non-enzymatic mechanism that blocks the formation of coagulation complexes through interactions with procoagulant phospholipids [45]. A systematic and direct comparison of the amino acid sequences of strong, weak and non-anticoagulant enzymes indicate that the anticoagulant site is comprised of regions around residues 53 and 78, which form the  $\beta$ -wing [43]. This region is positively charged in the strongly anticoagulant enzymes and a pair of lysine residues is present at both ends of the site [46]. The location of this anticoagulant site is supported by chemical modifications as well as by using site-directed

mutagenesis experiments and the use of synthetic peptides [47-49]. BthTX-II also displays four positive charged residues Lys53, Lys69, Arg72 and Arg77, two of them located at either end of this segment, which supports these observations. The negatively charged residue Asp71, which forms the anticoagulant site, is also conserved in BthTX-II as well as BthA-I and others PLA<sub>2</sub>s that exhibit anticoagulant activity. All residues of this segment are located on the protein surface and can potentially interact with phospholipids.

The structural determinants for myotoxic activity of basic snake venom PLA<sub>2</sub>s is still a paradigm for researchers in this area, besides the use of different strategies, such as chemical modification, sequence comparison analyses, interaction with neutralizing molecules, synthetic peptide studies, and site-directed mutagenesis analyses have attempted to elucidate the molecular basis for myotoxicity. Recent studies with polyanionic and polyethylene derivatives have demonstrated



**Figure 5.** Surface charge distribution around the interfacial face of BthTX-I (A), BthTX-II (B) and BthA-I (C). Blue, white and red colors represent basic, neutral and acidic surface.

the importance of surface electrostatic charge in the development of myotoxic effects [6, 27, 43]. The analysis of three PLA<sub>2</sub>s found in *Bothrops jararacussu* venom shown that BthTX-II is less myotoxic than BthTX-I or BthA-I. Surface charge distribution analysis suggests close correlation between the myotoxic activity and the positive charge on the interfacial face, where BthTX-I, BthTX-II and BthA-I display a strong positive charge, weak positive charge and negative charge on the interfacial surface (Figs. 5A, 5B and 5C) respectively, which is in agreement with the levels of myotoxic activity exhibited.

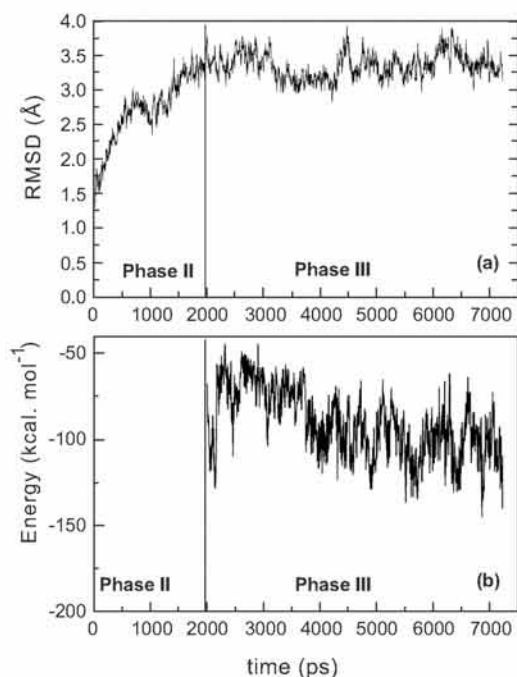


Figure 6. (A) RMSD and (B) IIP values during phases II and III of the MD simulations of BthTX-II-suramin complex.

Results of previous studies with Lys49 PLA<sub>2</sub> homologues, although controversial, indicate that overall surface charge and the free accessibility to the active site are essential for myotoxic activity for Lys49 PLA<sub>2</sub>s homologues [28]. This suggests a different mechanism for the expression of myotoxicity between Asp49 and Lys49 PLA<sub>2</sub>s. In conclusion, the positive surface charge is essential for myotoxicity whereas, the role of the conserved putative active site is still an enigma that is yet to be clarified.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful for financial support provided by FAPESP/DFG, CNPq, CAPES/DAAD and CAT/CEPID.

ABBREVIATIONS

PLA<sub>2</sub> = Phospholipase A<sub>2</sub>

BthTX-I	=	<i>Bothrops jararacussu</i> bothropstoxin-I
BthTX-II	=	<i>Bothrops jararacussu</i> bothropstoxin-II
BthA-I	=	Acid Asp49 phospholipase A2 from <i>Bothrops jararacussu</i> venom
ACL myotoxin	=	<i>Agkistrodon contortrix laticinctus</i> myotoxin
Basp-II	=	<i>Bothrops asper</i> myotoxin II
CK	=	Creatine kinase
MD	=	Molecular dynamics
RMSD	=	Root mean square deviations
IIP	=	Intermolecular interaction potential

REFERENCES

- [1] van Deenen, L.L.M. and de Haas, G.H. (1963) *Biochem. Biophys. Acta*, 70, 538-553.
- [2] Kudo, I., Murakami, M., Hara, S. and Inoue, K. (1993) *Biochim. Biophys. Acta*, 117, 217-231.
- [3] Mukherjee, A.B., Miele, L. and Pattabiraman, N. (1994) *Biochem. Pharmacol.*, 48, 1-10.
- [4] Harris, J.B. (1991) in *Snake Toxins* (Harvey, A.L., Ed), pp. 91-121. Pergamon Press, New York.
- [5] Chioato, L. and Ward, R.J. (2003) *Toxicon*, 42, 869-83.
- [6] Murakami, M.T. and Arni, R.K. (2003) *Toxicon*, 42, 903-13.
- [7] Kini, R.M. (2005) *Toxicon*, 45, 1147-61.
- [8] Kini, R.M. and Evans, H.J. (1989) *Biochemistry*, 28, 9209-9216.
- [9] Soares, A.M and Giglio, J.R. (2004) *Toxicon*, 42, 855-868.
- [10] Ketelhut, D.F., de Mello, M.H., Veronese, E.L., Esmeraldino, L.E., Murakami, M.T., Arni, R.K., Giglio, J.R., Cintra, A.C. and Sampaio, S.V. (2003) *Biochimie*, 85, 983-91.
- [11] Pereira, M.F., Novello, J.C., Cintra, A.C.O., Giglio, J.R., Landucci, E.C.T., Oliveira, B. and Marangoni, S. (1998) *J. Protein Chem.*, 17, 381-386.
- [12] Cintra, A.C., Marangoni, S., Oliveira, B. and Giglio, J.R. (1993) *J. Protein Chem.*, 12, 57-64.
- [13] Andrião-Escarso, S.H., Soares, A.M., Fontes, M.R., Fuly, A.L., Corrêa, F.M., Rosa, J.C., Greene, L.J. and Giglio, J.R. (2002) *Biochem. Pharmacol.*, 64, 723-32.
- [14] Magro, A.J., Murakami, M.T., Marcussi, S., Soares, A.M., Arni, R.K. and Fontes, M.R. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 323, 24-31.
- [15] Fuly, A.L., Soares, A.M., Marcussi, S., Giglio, J.R. and Guimarães, J.A. (2004) *Biochimie*, 86, 731-739.
- [16] Gutiérrez, J.M., Núñez, J., Díaz, C., Cintra, A.C., Homsí-Brandeburgo, M.I. and Giglio, J.R. (1991) *Exp. Mol. Pathol.*, 55, 217-29.
- [17] Homsí-Brandeburgo, M.I., Queiroz, L.S., Santo-Neto, H., Rodrigues-Simioni, L. and Giglio, J.L. (1988) *Toxicon*, 26, 615-627.
- [18] Laemmli, U.K. (1970) *Nature*, 227, 680-685.
- [19] Melo, P.A. and Suarez-Kurtz, G. (1988a) *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 21, 548-558.
- [20] Melo, P.A. and Suarez-Kurtz, G. (1988b) *Toxicon*, 26, 87-95.
- [21] Melo, P.A. and Ownby, C.L. (1999) *Toxicon*, 37, 199-215.
- [22] Semenyuk, A.V. and Svergun, D.I. (1991) *J. Appl. Crystallogr.*, 24, 537-540.
- [23] Guinier, A. and Fournet, G. (1955) *Small Angle Scattering of X-rays*, first ed. Wiley, New York, pp. 17-19.
- [24] Svergun, D.I. (1999) *Biophys. J.*, 76, 2879-2886.
- [25] Kozin, M.B. and Svergun, D.I. (2001) *J. Appl. Crystallogr.*, 34, 33-41.
- [26] Svergun, D.I., Barberato, C. and Koch, M.H. (1995) *J. Appl. Crystallogr.*, 28, 768-773.
- [27] Murakami, M.T., Arruda, E.Z., Melo, P.A., Martinez, A.B., Calil-Elias, S., Tomaz, M.A., Lomonte, B., Gutierrez, J.M. and Arni, R.K. (2005) *J. Mol. Biol.*, 350, 416-426.
- [28] Murakami, M.T., Viçoti, M.M., Abrego, J.R., Lourenzoni, M.R., Cintra, A.C., Arruda, E.Z., Tomaz, M.A., Melo, P.A. and Arni, R.K. (2007) *Toxicon*, 49, 378-87.
- [29] Fiser, A. and Sali, A. (2003a) *Methods Enzymol.*, 374, 461-491.

- [30] Fiser, A. and Sali, A., (2003b) *Bioinformatics*, 19, 2500-2501.
- [31] Lindahl, E., Hess, B. and van der Spoel, D.L. (2001) *J. Mol. Model.*, 7, 306-317.
- [32] Laskowski, R.A., Moss, D.S. and Thornton, J.M. (1993) *J. Mol. Biol.*, 231, 1049-1067.
- [33] Emsley, P. and Cowtan, K. (2004) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 60, 2126-2132.
- [34] van Gunsteren, W.F., Billeter, S.R., Eising, A.A., Hunenberger, P.H., Kruger, P., Mark, A.E., Scott, W.R.P. and Tironi, I.G. (1996) in (Lindahl, E., Ed), pp. 1-95. BIOMOS, Zurich.
- [35] Hockney, R.W. and Goel, S.P. (1974) *J. Comput. Phys.*, 14, 148-158.
- [36] Hess, B., Becker, H., Berendsen, H.J. and Fraaije, J.G.E.M. (1997). *J. Comput. Chem.* 18, 1463-1472.
- [37] Miyamoto, S. and Kollman, P.A. (1992) *J. Comput. Chem.*, 13, 952-962.
- [38] Melo, P.A., Nascimento, M.C., Mors, W.B. and Ownby, G. (1994) *Toxicon*, 32, 595-603.
- [39] de Oliveira, M., Cavalcante, W. L., Arruda, E. Z., Melo, P. A., Dal-Pai Silva, M. and Gallacci, M. (2003) *Toxicon*, 42, 373-379.
- [40] Murakami, M.T., Gava, L.M., Zela, S.P., Arruda, E.Z., Melo, P.A., Gutierrez, J.M. and Arni, R.K. (2004) *Biochim. Biophys. Acta*, 1703, 83-85.
- [41] Thunnissen, M.M., Kalk, K.H., Drenth, J. and Dijkstra, B.W. (1990) *J. Mol. Biol.*, 216, 425-439.
- [42] Yu, B.Z., Berg, O.G. and Jain, M.K. (1993) *Biochemistry*, 32, 6485-6492.
- [43] Murakami, M.T., Gabdoulkhakov, A., Genov, N., Cintra, A.C., Betzel, C. and Arni, R.K. (2006) *Biochimie*, 88, 543-549.
- [44] Rigden, D.J., Hwa, L.W., Marangoni, S., Toyama, M.H. and Polikarpov, I. (2003) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 59, 255-262.
- [45] Evans, H.J. and Kini, R.M. (1997) in *Venom Phospholipase A2 Enzymes: Structure, Function and Mechanism* (Kini, R.M., Ed). pp. 97-128. John Wiley & Sons, Chichester.
- [46] Kini, R.M. and Evans, H.J. (1997) in *Venom Phospholipase A2 Enzymes: Structure, Function and Mechanism* (Kini, R.M. Ed). pp. 369-388. John Wiley & Sons, Chichester.
- [47] Inada, M., Crowl, R.M., Bekkers, A.C., Verheij, H. and Weiss, J. (1994) *J. Biol. Chem.*, 269, 26338-26343.
- [48] Mounier, C.M., Luchetta, P., Lecut, C., Koduri, R.S., Faure, G., Lambeau, G., Valentin, E., Singer, A., Ghomashchi, F., Béguin, S., Gelb, M.H. and Bom, C. (2000) *Eur. J. Biochem.*, 267, 4960-4969.
- [49] Mounier, C.M., Hackeng, T.M., Schaeffer, F., Faure, G., Bon, C. and Griffin, J.H. (1998) *J. Biol. Chem.*, 273, 23764-23772.



## Identification of a new quaternary association for legume lectins

Frederico Bruno Mendes Batista Moreno <sup>a</sup>, Taianá Maia de Oliveira <sup>b</sup>,  
Daiana Evelin Martil <sup>a</sup>, Magno Massolino Viçoti <sup>a</sup>, Gustavo Arruda Bezerra <sup>b</sup>,  
José Ramon Beltran Abrego <sup>a</sup>, Benildo Sousa Cavada <sup>b,\*</sup>, Walter Filgueira de Azevedo Jr. <sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> *Curso de Pós-graduação em Biofísica Molecular, Departamento de Física, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, R. Cristóvão Colombo, 2265, Nazareth, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil*

<sup>b</sup> *Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Biomol-LAB, Campus do Pici S/N, Fortaleza, Ceará, Brazil*

<sup>c</sup> *Faculdade de Biociências-PUCRS, Av. Ipiranga, 6681, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil*

Received 27 June 2007; received in revised form 27 September 2007; accepted 4 October 2007

Available online 15 October 2007

### Abstract

*Lotus tetragonolobus* lectin (LTA) is a fucose-specific legume lectin. Although several studies report a diverse combination of biological activities for LTA, little is known about the mechanisms involved in L-fucosyl oligosaccharide recognition. The crystal structure of LTA at 2.0 Å resolution reveals a different legume lectin tetramer. Its structure consists of a homotetramer composed of two back-to-back GS4-like dimers arranged in a new mode, resulting in a novel tetramer. The LTA N-linked carbohydrate at Asn4 and the unusual LTA dimer–dimer interaction are related to its particular mode of tetramerization. In addition, we used small angle X-ray scattering to investigate the quaternary structure of LTA in solution and to compare it to the crystalline structure. Although the crystal structure of LTA has revealed a conserved metal-binding site, its L-fucose-binding site presents some punctual differences. Our investigation of the new tetramer of LTA and its fucose-binding site is essential for further studies related to cross-linking between LTA and complex divalent L-fucosyl carbohydrates.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** *Lotus tetragonolobus* lectin (LTA); Crystal structure; L-Fucosyl

### 1. Introduction

Plant lectins are a group of proteins of non-immune origin that recognize and bind to carbohydrates without modifying them. It comprises a heterogeneous class of (glyco)proteins that play a range of crucial roles in many cell–cell recognition events such as host defense, fertilization, development, parasitic infection, tumor metastasis and plant defense against parasites. Although they encompass different members that are similar in their primary and tertiary structures, several differences have been reported with regard to their mode of quaternary association (Brinda et al., 2005). In general, legume lectins are essen-

tially dimers of dimers, and the different modes of tetramerization are a consequence of a diverse combination of dimeric interfaces seen in these quaternary structures (Moreno et al., 2006; Delatorre et al., 2007). Additionally, the mode of tetramerization of legume lectins is closely related to their affinity for complex oligosaccharides. Differences in the carbohydrate cross-linking properties of some lectins in cellular recognition and signal transduction processes are reflected in biological properties (Dam et al., 2005). Thus, a detailed understanding of biological interaction mechanisms between lectins and complex carbohydrates is a key feature for establishing the chemical basis of important logical recognition functions performed by plant lectins.

Legume lectins are known to exist mainly as homodimers and homotetramers. They show considerable differences in their quaternary associations and modes of

\* Corresponding authors. Fax: +55 51 3320 3629.

E-mail addresses: [bscavada@ufc.br](mailto:bscavada@ufc.br) (B.S. Cavada), [walter.junior@puers.br](mailto:walter.junior@puers.br) (W. Filgueira de Azevedo).

monomer organizations in the dimeric/tetrameric assemblage. Most structural studies of Leguminosae lectins have involved members of Papilionoideae subfamily, where the majority is composed of three sets of  $\beta$ -sheets interconnected by loops, commonly designated as “jelly roll” or “ $\beta$ -sandwich motif”. In general, the term legume lectin refers exclusively to lectins from the Leguminosae family, but some of them are not considered to belong to the legume lectin class. For example, some chitinases and the ricin-like lectins (*Ricinus communis* lectin and *Abrus precatorius* lectin) are classified as chitin-binding and type-2 RIP lectins, respectively (Van Damme et al., 1998).

On the basis of their overall quaternary structure, legume lectins from the Papilionoideae subfamily have been classified into nine types, which are composed of seven different dimeric interfaces. The seven different dimeric types include the canonical dimer type-II (Concanavalin A, from *Canavalia ensiformis*) and its non-canonical interface, the *Dolichos biflorus* seed lectin, EcorL (*Erythrina corallodendron* lectin), GS-I and GS-IV (*Griffonia simplicifolia* lectins 1 and 2, respectively) and the unusual interface of PNA (Chandra et al., 2001; Loris et al., 1998; Brinda et al., 2005).

Phytoagglutinins from *Lotus tetragonolobus* seeds were first investigated in 1963 (Sagan et al., 1963). Further studies revealed the existence of three fuclectins present in the seeds of *L. tetragonolobus* and provided biochemical and sugar specificity characterization (Yariv et al., 1967; Kalb, 1968). To date, the primary structure of only one isolectin from *L. tetragonolobus* seeds (LTA) has been determined, showing that LTA was composed of about 240 amino acids with a molecular mass of 26273.17 Da (Konami et al., 1990). Furthermore, LTA was shown to be specific for L-fucose and also for mono- and biantennary oligosaccharides containing L-fucosyl residues. Results from NMR and Surface Plasmon Resonance indicate that LTA recognizes diverse L-fucosyl oligosaccharides including the Le<sup>x</sup> antigenic determinant and its divalent form (difucosyllacto-N-neohexaose—Fuc-octa). Interestingly, fucosylated sugars are widely distributed in nature, from plant to man, and play a variety of roles in biology, particularly in recognition processes. Several studies have reported that L-fucosyl oligosaccharides are often expressed on cells during differentiation or metastatic stages; also they have been correlated with metastatic potential in some types of tumors, particularly in neuroblastomas and adenocarcinomas (Kalb, 1968; Staudacher et al., 1999).

In addition, due to its particular biological property of recognizing L-fucosyl oligosaccharides present in glycoprotein and glycolipid receptors on cells, LTA has been used as a tool in various biochemical studies: (i) in the characterization of antigens and insect cells (Thomas and Surolia, 2000; Napier et al., 1974; Butters and Hughes, 1978) (ii) in examinations of surface saccharide composition in different cells (Mayliepfenninger and Jamieson, 1979; Gurd, 1979) and mainly (iii) in lectin his-

tochemistry of malignant cells for the purpose of investigating anomalous membrane oligosaccharides and differentiating carcinomas (Raedler et al., 1983; Koch et al., 1983; Miettinen et al., 1983; Walker, 1984; Ulrich et al., 1985; Davidsson et al., 1987; Griffiths and Stephenson, 1988; Raju and Lee, 1988; Finne et al., 1989; Imura et al., 2004; Turner et al., 1995).

A striking feature is that although LTA has been extensively used in various experiments as an L-fucose-binding lectin, its affinity for complex L-fucosyl oligosaccharides is not well understood. Previous results revealed that the affinity for various L-fucosyl oligosaccharides is predominantly related to the LTA fucose-binding pocket. Consequently, some of these results also showed that binding affinity decreased with increasing complexity of these saccharides (Haselhorst et al., 2001), which suggests that no extended binding site was present for LTA, in contrary to what was described earlier for other lectins (Moothoo and Naismith, 1998). Moreover, Electron Microscopy and X-ray diffraction studies suggested that LTA, when cross-linked with Fuc-octa, is arranged in a tetramer form (Cheng et al., 1998), but there has been no other experimental elucidation of its mode of oligomerization. Brinda and co-workers investigated LTA by computational methods with the aim of finding a relationship between its primary sequence and the nature of its quaternary association, but their data showed only that the LTA oligomer was likely different from the other known legume lectins (Brinda et al., 2004).

In a previous article, we reported on the crystallization and preliminary X-ray analysis of LTA in the native form (Moreno et al., 2006). In the present study, we have investigated the quaternary structure and oligomerization state of LTA using a combination of Protein Crystallography and small angle X-ray scattering (SAXS) techniques. Our investigation shows that this homotetrameric lectin adopts a novel quaternary structure resulting from the assembly of two GS4-related dimers through a newly described interface. In addition, our data provide new insights into the structural basis for the recognition on L-fucosyl saccharides, lectin molecular evolution and diverse biological applications of LTA.

## 2. Results and discussion

### 2.1. Overall crystallographic structure of LTA

LTA consists of a homotetramer composed of two different dimer-dimer interfaces as shown in Fig. 1. Each monomer consists of a standard legume-like lectin (“jelly roll motif”) complexed with calcium and manganese, as previously established for several legume lectins (Van Damme et al., 1998). Each monomer is composed of 234 residues and presents a glycosylation located at Asn4. The statistics of refinement data are presented in Table 1 and the pdb entry is 2EIG. Although legume lectin tetramers exist mainly as homotetramers with an internal

Table 1  
Statistics of data collection, refinement and quality of the structure

	Overall resolution data set	Highest resolution data set
<i>Data collection</i>		
Total number of observations	225,127	30,889
Total number of unique observations	61,847	8835
$R_{\text{merge}}$	0.095	0.459
Highest resolution limit (Å)	2.00	2.00
Lowest resolution limit (Å)	40.42	2.11
Completeness (%)	99.4	97.9
Multiplicity	3.6	3.5
$I/\sigma(I)$	10.8	2.6
Wavelength (Å)	1.431	
Space group	P2 <sub>1</sub>	
Cell parameters (Å)	$a = 68.89$ , $b = 65.83$ , $c = 102.53$	
<i>Refinement</i>		
Resolution range (Å)	2.00–34.46	
$R_{\text{factor}}$ (%)	18.81	
$R_{\text{free}}$ (%)	25.08	
Number of non-hydrogen atoms in protein structure	7876	
Number calcium ions	04	
Number of manganese ions	04	
Number of water molecules	597	
<i>RMS deviations from ideal values</i>		
Bond lengths (Å)	0.021	
Bond angles (degrees)	2.201	
<i>Temperature factors</i>		
Average $B$ value for main chains (Å <sup>2</sup> )	21.00	
Average $B$ values for water molecules (Å <sup>2</sup> )	27.94	
<i>Ramachandran plot</i>		
Residues in most favored regions	700 (86.6%)	
Residues in additional allowed regions	90 (11.1%)	
Residues in generously allowed regions	10 (1.2%)	
Residues in disallowed regions	8 (1.0%)	

hydrophobic cavity as described for the lectins from the Diocleinae subtribe (ConA-like lectins), *D. biflorus*, *G. simplicifolia* and peanut seeds, the LTA tetramer showed a different internal cavity resultant from its particular mode of tetramerization.

Several steps of molecular refinement were performed to obtain the LTA tetramer at 2.0 Å resolution. The  $2F_o - F_c$  final density map contoured at  $1\sigma$  showed that a few residues were not well fitted in the electron density map when using the LTA primary sequence previously established. Consequently, with the aim of solving the complete LTA structure, we used our electron density map to decipher the missing residues.

The LTA structure contains a covalently bound glycan at Asn4 which corroborates preliminary results of Konami and co-workers (Konami et al., 1990). The first carbohydrate position (GlcNac) was fitted correctly in three of the four monomers. Residual and poor densities were found surrounding the first Asn4 *N*-linked glycan residue, but there were no sufficient data to correctly model the remaining sugar residues.

## 2.2. Ion-binding sites

The carbohydrate-binding activity of legume lectins depends on the presence of calcium and a transition metal ion, usually manganese. Each LTA monomer contains two binding sites for calcium and manganese as described for several other legume lectins. These ions are coordinated directly by Glu118, His135, Asp120, His122, Asn124 and Asp127 and indirectly by hydrogen bonds between residues Ser145, Ile143, Gly100, Asp80, Trp126 and four water molecules. The LTA ion-binding site is conserved compared to other legume lectins, with exception of residue His122, which interacts directly with the calcium ion through the oxygen from its backbone. This difference does not seem to be relevant enough to consider LTA ion-binding site as a new folding arrangement. Moreover, the structure of LTA in the presence of Ca<sup>+2</sup> and Mn<sup>+2</sup> displayed the *cis*-Asp80 in a “locked” conformational state as described for the *cis*-Asp208 in concanavalin A. On the other hand, the side chain of His122 is located at the opposite side of the calcium ion, in the vicinity of the LTA carbohydrate-binding site, and its position suggests that this residue plays a significant role in the recognition of L-fucosyl residues by LTA.

Since there was no other particular structural difference observed in the LTA ion-binding site, it is reasonable to conclude that only evolutionary changes in the carbohydrate-binding site of LTA are related to its specificity for L-fucosyl.

## 2.3. Dimer–dimer interfaces

Most legume lectins, with a few exceptions, are known to exist mainly as homodimers and homotetramers, where these tetramers are dimers of dimers. To date, seven types of dimer associations have been described for legume lectins, including the canonical dimer and non-canonical interface (lectins from Diocleinae subtribe), EcorL (lectins from *E. corallodendron* and *Psophocarpus tetragonolobus*), GS-I and GS-IV (lectin IV from *G. simplicifolia*), DB58 (lectin from *D. biflorus*) and the unusual interface of PNA. Up to now, four models of quaternary associations for these dimers have been reported into tetrameric structures: the ConA-type (two canonical dimers packed against each other), the DBL-type (combination of canonical and DB58 types), the PNA-type (combination of canonical, GS-IV and an unusual type of interface, seen only in PNA) and GSL (with the GS-IV type and an unusual type of interface, seen only in *G. simplicifolia* type lectins) (Fig. 3). Furthermore, sequences from the five types of dimeric interfaces described above were investigated by bioinformatics procedures, and the results showed that for each type, a specific signature motif determines and differentiates each dimerization state (Brinda et al., 2004). On the other hand, legume lectins may exist as a monomer, dimer or tetramer under different conditions of pH and solvent; however, analysis of known dimer interfaces, using

computational sequence investigation, is not satisfactory to typify with a high level of certainty the real quaternary oligomerization state of legume lectins at different chemical environments.

Our work reports a crystallographic structure of LTA, a homotetramer not previously described for any legume lectins. Fig. 3 illustrates legume lectin tetramers, including the new tetramer of LTA. Additionally, LTA is composed of two dimer interfaces, a GS4-type, similar to that from *G. simplicifolia* (1GSL) and an unknown interface that is displayed in Fig. 1c. The *G. simplicifolia* lectin (1GSL) is essentially a tetramer with a GS4-type dimer and an unusual dimer interface. The GS4 dimer is formed by the association of the six-stranded  $\beta$ -sheets of each monomer, with the  $\beta$ -strands of one sheet being perpendicular to those of the other (Delbaere et al., 1993).

The GS4 dimers of LTA, PNA and GSL share the same spatial configuration, but while the two first show nearly equal angular arrangement of the monomers, they contrast to GSL that shows a considerable difference in the angle of association. Sequence alignment of the residues located in the GS-IV back-to-back interface revealed high identity between LTA and PNA; identity which was obtained in a much less extent when comparing both of them to GSL, as depicted in Fig. 2. This difference is likely the reason for why this angular discrepancy appears.

Other two aspects may ascribe for aforementioned discrepancy. The first one, the glycosylation at Asn4, which is located nearby the contact interface between monomers A and B (Fig. 1c), may influence the molecular arrangement, accounting for the difference seen in GS4-like dimer of LTA in contrast of that observed in GS4 of GSL. Second, crystal packing may also contribute to the spatial arrangement of LTA dimers, influencing the displacement seen in the GS4-like dimer of LTA, since this displacement

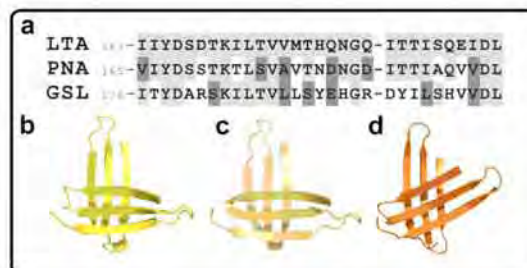


Fig. 2. (a) Sequence alignment of the residues located in the GS-IV back-to-back interface LTA, PNA and GSL. The identical residues are highlighted in light grey and the conserved residues are highlighted in dark grey. Notice the great similarity between LTA and PNA in this region. Three-dimensional representation of the interface region for the GS-IV back-to-back interface for (b) LTA, (c) PNA and (d) GSL. Observe that LTA and PNA have a nearly equal angular arrangement of the monomers, contrasting to GSL whose angle of association is distinct from the two other lectins.

could not be confirmed by the SAXS technique on account of its lower resolution range.

As reported earlier, the LTA crystal structure revealed an unknown dimer–dimer interface never described before for legume lectins. While the LTA GS4-dimer type is an association between  $\beta$ -strands of adjacent monomers, the unknown dimer interface of LTA is stabilized by hydrogen bonds and hydrophobic contacts present in inter-contacts between loops of monomers A/C and B/D. Two contact interfaces are described here for the new LTA-dimer interface, and the residues involved are shown in Fig. 4.

Brinda and co-authors (2004) used lectins with unknown three-dimensional structures until then to test the ability of their method to predict the nature of quaternary association in legume lectins given the sequence. LTA was one

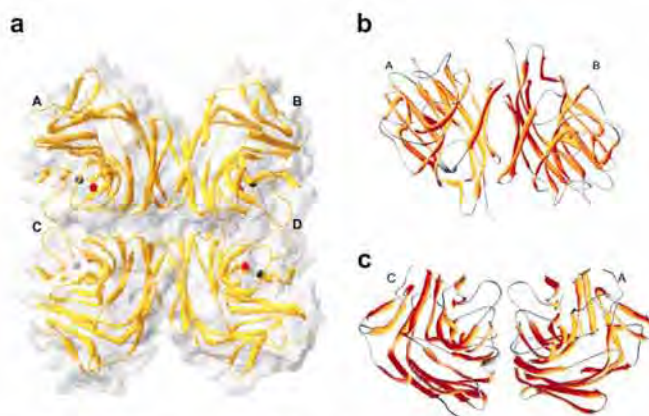


Fig. 1. Overall crystal structure of LTA. (a) The LTA homotetramer. Four identical domains are interconnected by two dimer–dimer interfaces. (b) The GS4-like dimer seen in LTA. Both monomers are interconnected by back-to-back interfaces as described for the lectin from *G. simplicifolia*. (c) The new LTA-dimer observed in LTA tetramer configuration. Both monomers are interconnected by hydrophilic interactions at external loops and a hydrophobic core. figures were generated by *Deep View*.

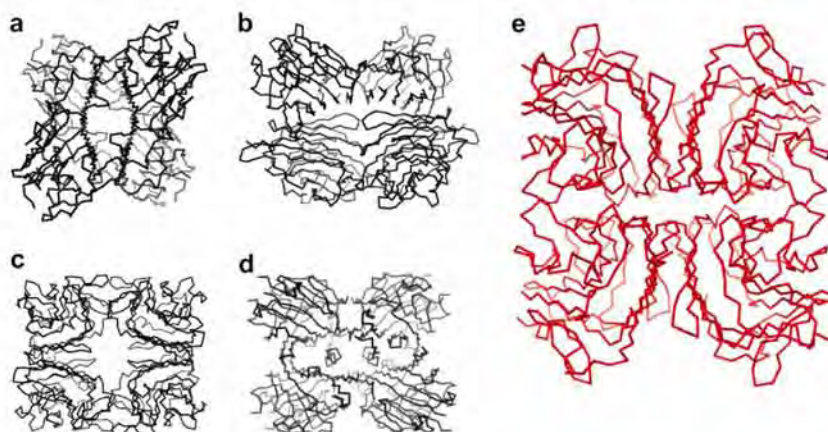


Fig. 3. Representation of the five types of tetramer associations among legume lectins. (a) Ribbon representation of a ConA-like lectin which is composed of two canonical dimers interconnected by a non-canonical interface. (b) The peanut lectin showing a tetramer composed of a canonical dimer, a back-to-back interface and an unusual type of dimer–dimer interface seen only in this case. (c) The lectin from *G. simplicifolia* which represents two back-to-back dimer interfaces and an unusual dimer interface, (d) The *D. biflorus* lectin which is composed of a canonical dimer and two DB58 dimer–dimer interfaces. (e) The LTA tetramer composed of two back-to-back interfaces interconnected by two particular LTA-dimer interfaces. The dimer–dimer interactions yielded a homoplanar tetramer. Figures were generated by *Pymol*.

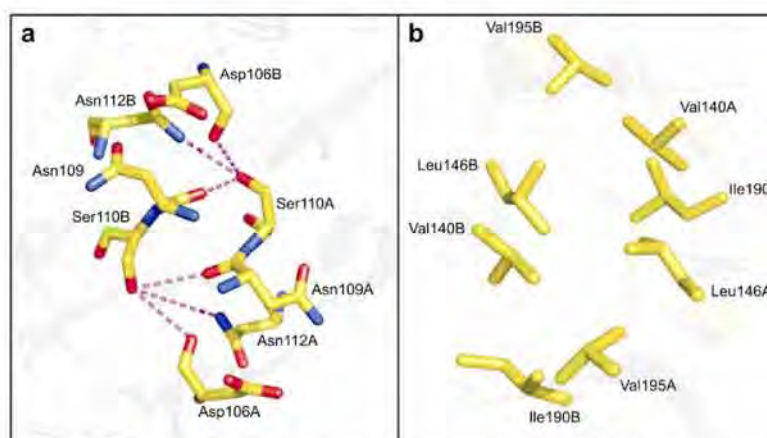


Fig. 4. The LTA-dimer interface. (a) Hydrogen bonds between loops from Asp106 to Asn112 at the surface of LTA molecule. (b) The hydrophobic residues arranged at the center of the LTA-dimer interface. Both figures are representations of the contacts at the interface between monomers A and B. Figures were generated by *Pymol*.

of the lectins used in order to do that. They concluded that all seven types of interface types were likely to be destabilized in the case of LTA. Our results prove them to be partially correct, since there is indeed a novel interface type in LTA, but there's also an already known type which is nearly identical to the one present in PNA.

The crystallographic refinement revealed, at initial stages, that the loops from residues ILE104 to GLN113 and Gly86 to ASP92 were not well defined in the electronic density map. Thus, most of the time required for converging  $R_{\text{free}}$  and  $R_{\text{factor}}$  was a consequence of amino acid mod-

eling at the loops from this new dimer interface. We named this “unknown” dimer interface the LTA-dimer, and we suggest here that these variations observed in LTA loop pattern in the LTA-dimer may be strictly related to the association of GS4-like dimers in the tetramer.

#### 2.4. Small angle X-ray scattering and the homotetramer structure of LTA

As described previously, legume lectins are basically dimers of dimers and the modes of quaternary association

is a consequence of the interactions observed between these dimers. The crystal structure of LTA belongs to the  $P2_1$  space group containing four monomers per asymmetric unit, resulting in a regular crystallographic homotetramer as arranged in Fig. 1. The initial crystallographic results showing a new tetrameric form observed for LTA needed further support. First, the differences seen in overall structure could be a consequence of crystal packing, and second, the crystal structure of diverse proteins may assume a structural form that is not observed in a biological aqueous environment (Filgueira de Azevedo et al., 2003).

The LTA tetramer is a combination of two GS4-type dimers which may assume the structural conformation seen in *G. simplicifolia* lectin depending on the space group. However, the presence of four monomers per asymmetric unit yielded the LTA homotetramer as arranged in Fig. 1a, and moreover, the symmetry operations for  $P2_1$  space group are not sufficient to configure an LTA tetramer similar to that observed for *G. simplicifolia* lectin in the crystal packing configuration. In addition, the glycan position at ASN4 is a new structural feature of LTA that is not yet associated with quaternary folding. While *G. simplicifolia* lectin possesses a non-glycosylated ASN5 placed at the center of molecule, the ASN4 of LTA is placed at the external face of the tetramer.

Studies of the non-glycosylated legume lectins ConA and PNA proposed that the variability of quaternary association in these cases is related to differences in the amino acid sequence of these proteins, since glycans were absent in both structures (Hardman and Ainsworth, 1972; Banerjee et al., 1996). Moreover, the crystal structure of the glycolectin *Erythrina cristagalli* (*N*-linked at Asn17) and its recombinant form showed that both lectins associate into identical dimers confirming that the presence of *N*-linked glycan does not influence the mode of dimerization of ECL and suggesting that intrinsic factors to the primary structure of the lectin dictate its quaternary structure (Turton et al., 2004). Thus, we come to interesting questions: were there no glycosylation at Asn4 of LTA, would this new assembly be formed? And what forces would allow LTA to assume this new spatial configuration?

Preliminary analysis of LTA and GSL showed that both are glycosylated at Asn4 and Asn18 (not at Asn5 in GSL), respectively, and that their quaternary structures present the *N*-linked glycans exposed to the surface of molecules (Fig. 5). On the other hand, symmetry operations could allow for LTA GS4-like dimers to assume a conformation similar of that of GSL; but for that, its *N*-linked glycan at Asn4 must be oriented toward the center of the tetramer, which is not a common feature observed in legume lectins. Furthermore, the position of the Asn4 glycan on the surface of the LTA tetramer is also a consequence of steric restraints, since there is no suitable chemical location to place all glycans together at the center of the molecule, and also because a favorable environment for *N*-linked carbohydrates is frequently found with solvent exposure.

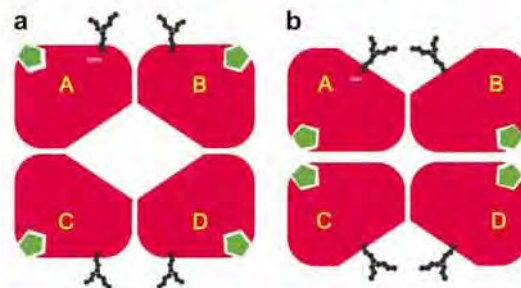


Fig. 5. Schematic representation of dimer association between lectins from *G. simplicifolia* and *L. tetragonolobus*. The red boxes represent a legume lectin monomer. The black dots represent the glycosylation pattern of each lectin and the green boxes represent the carbohydrate-binding site of each monomer. (a) Representation of the two back-to-back dimer interface of GSL. Both dimers are interconnected with an internal hydrophobic cavity of approximately 25 Å. GSL is glycosylated at Asn18 and its *N*-linked oligosaccharides are arranged at the surface of molecule. The carbohydrate-binding sites are at equivalent distances in the equatorial position of each monomer. (b) Representation of LTA tetramer which is a molecule composed of two back-to-back dimer interfaces as arranged in (a). The LTA tetramer is different from that observed for GSL. The glycan at Asn4 instead of Asn18 is a particular characteristic of LTA. As a consequence of its natural tetramerization, the LTA tetramer possesses the carbohydrate-binding sites at positions close to each other. The ability of LTA to recognize *l*-fucose and the tetramer folding are key features that determine the model of the cross-linking complexes formed by LTA.

Thus, we conclude that differences seen between the LTA tetramer's crystal packing and other legume lectins are strictly related to variations seen in primary structure. Furthermore, although we cannot conclude whether the presence of surface-exposed *N*-linked glycans is a cause for LTA new assembly, we consider it an additional evidence for the existence of LTA's novel arrangement.

Finally, to confirm our investigations on LTA quaternary structure, we have used the small angle X-ray scattering (SAXS) technique to determine definitively how LTA behaves in aqueous solution. Analyses of maximum dimension ( $D_{max}$ ), external surface area ( $S$ ) and volume of hydration ( $V_h$ ) from LTA crystal coordinates yielded values similar to that obtained with SAXS. The values of radii of gyration  $R_g = 33.2$  Å,  $D_{max} = 100$  Å,  $S = 30 \times 10^3$  Å<sup>2</sup> and  $V_h = 138 \times 10^3$  Å<sup>3</sup>, obtained from SAXS curves, showed that LTA dimensions in aqueous solution corroborate those calculated for the crystalline structure (Fig. 7). Moreover, regarding qualitative information about LTA surface contour, the  $\rho(r)$  plot displayed in Fig. 6a revealed that the pattern assumed by this function corresponds to a particle with the appearance of a lamellar shape with a maximum dimension of 100 Å (Volkov and Svergun, 2003). On the other hand, we also generated the external envelope of LTA by the *ab initio* shape determination method to compare it to the crystallographic structure and to investigate how LTA monomers are interconnected with each other. Fig. 6 shows the tetramer envelope of LTA which represents a laminar orthorhombic

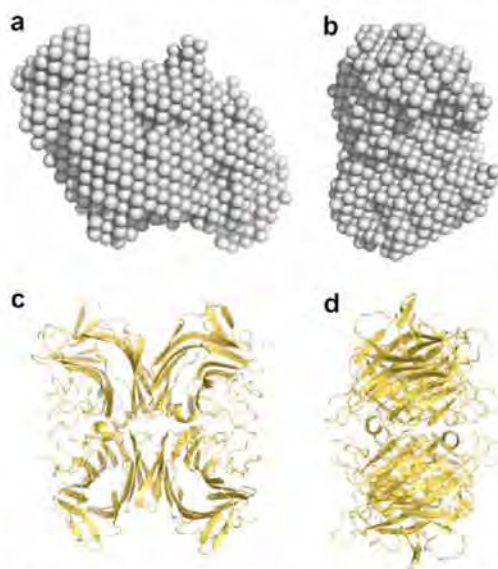


Fig. 6. Small angle X-ray scattering of LTA. (a and b) The dummy atoms. The models were generated by SUPCOMB20 using a difference of  $90^\circ$ . (c and d) The LTA tetramer as a cartoon depiction with a difference of  $90^\circ$ .

bic shape similar to that observed for the LTA crystal structure. Both GS4-like and LTA-dimers can be identified in Fig. 6a.

### 2.5. LTA carbohydrate-binding site and biological remarks

Crystallographic studies of various legume lectins have revealed the structural basis for molecular recognition of fucosyllactose, fucosylgalactose, Lewis-B and Y-human blood group determinants (*Ulex europaeus* II—1QOT, 1JXN, *E. cristagalli*—1GZ9, *G. simplicifolia*—1LED, 1GSL). Although such complexes were obtained in the presence of carbohydrates containing L-fucosyl residues or derivatives, little is known about the L-fucose monosaccharide primary site in any legume lectins. In addition, structural studies also revealed that the presence of L-fucose in these complexes cited above is not essential for the lectin to bind the whole glycan. For example, *U. europaeus* II lectin was shown to complex with fucosylgalactose and galactose but not with L-fucose, indicating that fucose by itself is not essential to inhibit UEA-II. Hence, Loris and co-workers suggested that although UEA-II possesses a promiscuous carbohydrate-binding site, its primary affinity is designed for both GlcNAc and Gal, but not for L-fucose (Loris et al., 2000). Moreover, LTA precipitating activities using L-fucosyl oligosaccharides has been investigated, and only L-fucose and L-fucosyl oligosaccharides were able to inhibit its hemagglutinating activity. Furthermore, the formation of a unique homogeneous cross-linked complex precipitate between tetrameric

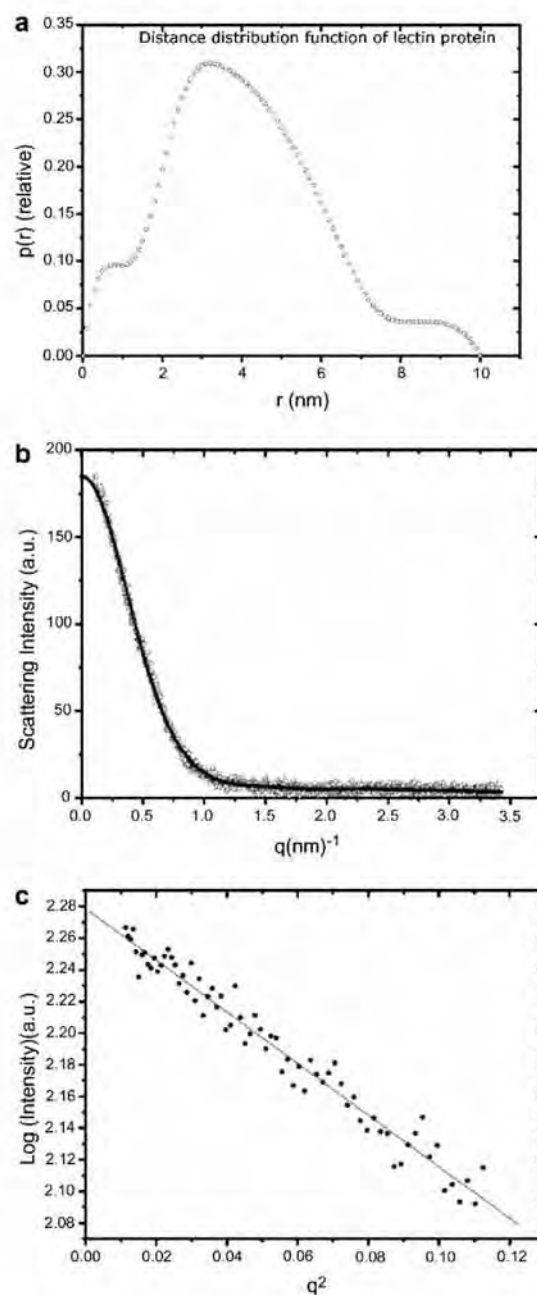


Fig. 7. Small angle X-ray scattering data of LTA. (a)  $\rho(r)$  showing the maximum dimension of scattering to be 10 nm. (b) Curve plotting intensity versus scattering angle used to create the low resolution model of LTA. (c) log intensity versus log  $q^2$  plot.

LTA and diverse biantennary L-fucosyl oligosaccharides are inhibited by 0.1 M fucose<sup>38</sup>. Thus, the experimental results described above make it clear that LTA recognizes

L-fucose at its primary site, but only superficial information about its binding mechanism is provided.

The binding site for monosaccharides in legume lectins is highly conserved; however, as consequence of molecular evolution, discrete mutations, which dictate the differences in the affinity of lectins for small carbohydrates, appear. While some amino acid residues are extensively conserved, some of them are found particularly in each type of lectin. The LTA residues ASP, ASN and GLY at positions 80, 124 and 100, respectively, are also conserved in EcorL, DB58, GSL and PNA. In LTA, these residues are structurally positioned in the same spatial configuration as equivalent residues of the above lectins. These amino acids are important in sugar-binding since they play a crucial role in stabilizing and coordinating a specific monosaccharide inside the binding pocket through hydrogen bonds, which are formed between their side chains and the hydroxyl groups of carbon-3 and carbon-4. Thus, the fucose-binding site of LTA is conserved on the face of residues Asp80, Asn124 and Gly100.

The subsequent analysis of the structural site of LTA aimed to investigate the non-conserved residues that are also involved in fucose recognition. The fucose-binding pocket of LTA is shown in Fig. 8. We placed the L-fucose monosaccharide in the conserved orientation according to the highly conserved monosaccharide site of other related legume lectins. Consequently, fucose positioning regarding the conserved monosaccharide binding turned carbon-3 and carbon-4 to equivalent positions of Asp, Asn and Gly based on that previously established for other complexes of similar lectins. This arrangement led us to investigate the role of the remaining two residues located in the area surrounding bound L-fucose.

The monosaccharide L-fucose differs from other related sugars due to the presence of a methyl group bound to carbon-5 instead of a hydroxyl. Moreover, the electron density



Fig. 8. The carbohydrate-binding site of LTA. L-Fucose is located at the conserved binding pocket of legume lectins. Residues Asp80, Gly100 and Asn124 are also at the conserved positions which interact with hydroxyls of carbon-3 and carbon-4. Trp-209 is close to the CH<sub>3</sub> group of L-fucose carbon-1 and Glu212 is a few angstroms from carbon-5.

map of Trp209 is well defined and its side chain position is a few angstroms apart from the CH<sub>3</sub> group of L-fucose, which indicates that this evolutionary punctual mutation may be involved in the stabilization of this hydrophobic contact. Finally, due to the particular conformation of the LTA tetramer, the carbohydrate-binding sites are arranged more closely than observed in other legume lectins (Fig. 5b).

## 2.6. LTA cross-linking properties

LTA showed some specific differences in its carbohydrate-binding site. Besides, the particular tetramerization model is strictly related to its ability to bind different bivalent carbohydrates and to form cross-linking interactions, since the formation of highly ordered lattices depends on the saccharide specificity and the spatial configurations of the sugar-binding sites in the whole tetramer.

ConA dimers have been used to generate all possible orientations of LTA consistent with the observed symmetry of the cross-linking pattern lattice of this lectin in the presence of divalent Lewis<sup>X</sup> oligosaccharide. The best results were obtained when the relative orientation of the two LTA dimers in a tetramer were varied relative to a range of about 20° as compared to dimers in the ConA tetramer, leaving them more parallel in relation one another.

The reason for why the best results were accomplished with this kind of manipulation is related to the novel tetramer structure described here for LTA. The LTA tetramer observed in Fig. 5 shows that the fucose-binding sites are not at equivalent distances between each other, as observed for ConA. While the carbohydrate-binding sites of LTA monomers A/C and B/D are at a distance of 30 Å, the distance observed for the sites between monomers A/B and C/D are at approximately 57 Å. The positions of the four carbohydrate-binding sites of LTA are consequence of its mode of tetramerization, since the monomers are in a planar view in contrast to that observed in ConA. On the other hand, ConA-like lectins possess the four carbohydrate-binding sites of their tetramers at equivalent distances of approximately 60 Å, which corroborates of distances between binding sites A/B and C/D of LTA.

Since Cheng and co-workers used two LTA-dimers similar of that observed for ConA to build a tetramer topology for the whole LTA and had only low resolution data available, they were not able to reach the novel tetramer structure of LTA, which successfully explains the highly organized two-dimensional cross-linked lattice which they proved to be dependent on the geometry and symmetry of the binding sites of the lectin (Cheng et al., 1998).

Hence, it seems that this angular discrepancy between the position of ConA and LTA dimers observed by Electron Microscopy are a key feature for understanding how LTA forms a specific two-dimensional type-2 cross-linked complex between divalent oligosaccharides, since changes in the orientation of its dimers corroborate our tetramer topology described in Fig. 5.

Thus, the particular quaternary structure and the new L-fucose-binding site of LTA are key features in describing the differences seen in biological activities already determined. The ability of LTA to form two-dimensional type-2 organized clusters with divalent L-fucosyl oligosaccharides (Bhattacharyya et al., 1990) may be related to the functions of similar carbohydrates as putative receptors on cell surfaces. Organized clusters mediated by cross-linking complex structures occur with LTA in the presence of diverse biantennary L-fucosyl oligosaccharides (Cheng et al., 1998; Bhattacharyya et al., 1990). These biological phenomena do not seem to be only a consequence of the LTA's affinity for L-fucose, since the evidence presented in this paper of a new LTA tetramer provides new insights into the understanding of how LTA is able to carry out signal transduction processes due to the ability to bind and cross-link specific glycoproteins and glycolipid receptors.

### 3. Conclusions

In the present paper, we showed that the lectin from *L. tetragonolobus* seeds, LTA, is a homotetramer composed of four legume lectin domains. The new tetramer was found under both crystalline and aqueous conditions, and furthermore, we observed some particular molecular features that appear to account for LTA to assume this new spatial configuration. The spatial position of the N-linked oligosaccharide at Asn4 and the LTA-dimer contacts as arranged in Fig. 4 are key features for the understanding of how LTA behaves as a homotetramer with its two GS4-like dimers arranged in an inverted position compared to the tetramer described for the *G. simplicifolia* lectin.

The present findings also provide insights into the molecular ability of LTA to recognize its specific monosaccharide. Such descriptions about its carbohydrate-binding site together with the model of tetramer oligomerization afford a structural basis for understanding the specificity of LTA for some complex bivalent L-fucosyl oligosaccharides, since this type of interaction may account for the formation of homogeneous cross-linking carbohydrate complexes that govern diverse biological signal transduction processes. Moreover, our results present new data for further studies about the evolution of binding sites and molecular oligomerization of legume lectins.

### 4. Materials and methods

#### 4.1. Crystallization, data collection and processing

*Lotus tetragonolobus* agglutinin (LTA) was purchased from Sigma–Aldrich (USA) and was crystallized as described elsewhere (Moreno et al., 2006). Small crystals were submitted to X-ray diffraction at LNLS (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas—Brazil) using a synchrotron radiation source (MX1-station). X-ray diffraction data were collected at a wavelength of 1.47 Å using a CCD detector (Mar research). Two data sets were collected at res-

olutions of 2.0 and 2.35 Å, respectively. The images were processed, indexed, integrated and scaled using the software *MOSFLM* and *SCALA* (CCP4, 1994; Leslie, 1992).

#### 4.2. Structure determination

The 2.0 Å resolution crystal data set was solved by the molecular replacement method using *MOLREP* software (Vagin and Teplyakov, 1997). We have used several legume lectin coordinates to solve the phase problem, and the best model was chosen based on the magnitude of the CC (correlation coefficient) and  $R_{\text{factor}}$ . The best model was obtained using the peanut lectin monomer as a search model (PDB code 1CR7—Ravishankar et al., 2001). Initially, rotation and translation functions yielded a tetramer according to the content of the asymmetric unit (four monomers per asymmetric unit) (Moreno et al., 2006).

The position and orientation of the four monomers (Chains A, B, C and D), as a single rigid body entity, were refined by 20 cycles with *REFMAC* (Murshudov et al., 1996) using reflections in a resolution range of 102.5–2.0 Å. Several steps of rebuilding, interspersed with restrained refinement, yielded the current model at 2.0 Å resolution. The appropriate LTA amino acids were positioned by inspection of the  $2F_o - F_c$  and  $F_o - F_c$  maps, and the stereochemistry was monitored frequently with *PROCHECK* and *PARMODEL* software (Laskowski et al., 1993; Uchoa et al., 2004). Finally, ions were arranged in the model manually, and the water molecules were positioned after several steps of restrained refinement with *ARP/WARP* and examined manually by *XTALVIEW* (CCP4, 1994; McRee, 1999).

#### 4.3. Small angle X-ray scattering data collection

The X-ray scattering data (SAXS) of LTA were collected at LNLS (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas—Brazil) using a synchrotron radiation source at the D11A-station beam line. LTA was dissolved in 10 mM Tris–HCl, pH 7.6, containing 18 mM  $\text{CaCl}_2$  and  $\text{MnCl}_2$  at three different concentrations of 10.0, 6.0 and 3.0 mg/mL. The samples were then submitted to data collection at room temperature (about 24 °C) from a distance of 831 mm to the detector. The scattering curves were recorded at a wavelength of  $\lambda = 1.48$  Å and the scattering intensities were obtained in the range of  $0.0144 \text{ \AA}^{-1} < q < 0.3423 \text{ \AA}^{-1}$ , where  $q$  is the scattering vector  $q = 4\pi \sin \theta / \lambda$  and  $2\theta$  is the scattering angle.

The SAXS data were desmearing and the distance distribution function  $p(r)$  was obtained by indirect Fourier transformation using the program *GNOM* (Svergun, 1992). The radii of gyration,  $R_g$  ( $R_g = 2.628\sqrt{-\bar{s}}$ ), was obtained from the slope,  $\alpha$ , of the linear region of  $\log I$  versus  $q^2$  plots using the Guinier's Law (Guinier and Fournet, 1955).

Parameters of volume and external area of LTA were calculated using  $V = 2\pi^2 I(0) / Q$  and  $S = \pi V \lim [I(q)q^4] / Q$ ,

respectively, for  $Q$  representing the invariance and  $I(0)$  the result from Guinier's Law, where  $e^{-\frac{R^2}{4\lambda^2}} = 1$  (Porod, 1982).

The external envelope of LTA was then generated by *ab initio* shape determination method, and 20 independent *ab initio* models were averaged for the purpose of improving the quality of shape reconstruction using DAMMIM and DAMAVER programs (Svergun, 1999). Finally, the superposition between X-ray crystallographic data (PDB) and dummy SAXS atom coordinates was carried out by SUPCOMB20 (Kozin and Svergun, 2001).

#### 4.4. Structure quality and manipulation

LTA model manipulation, analysis and the confection of figures were executed with the aid of *VMD* and *Deep View* (Guex and Peitsch, 1997; Humphrey et al., 1996). The LTA structure geometry was monitored by *PROCHECK* and Ramachandran plot. The temperature factor analysis was performed using *BAVERAGE* software to obtain graphs and data of *B-factor* versus residues for each chain and water molecules (CCP4, 1994).

#### Acknowledgments

The authors would like to thank funding from CNPq, CAPES and FAPESP. We also thank Dr. A. Leyva for English language editing of the manuscript. W.F. de Azevedo Jr. and B.S. Cavada are senior investigators of CNPq.

#### References

- Banerjee, R., Das, K., Ravishankar, R., Suguna, K., Surolia, A., Vijayan, M., 1996. Conformation, protein-carbohydrate interactions and a novel subunit association in the refined structure of peanut lectin-lactose complex. *J. Mol. Biol.* 259, 281–296.
- Bhattacharyya, L., Fant, J., Lonn, H., Brewer, C.F., 1990. Binding and precipitating activities of lotus-tetragonolobus isolectins with  $\alpha$ -fucosyl oligosaccharides—formation of unique homogeneous cross-linked lattices observed by electron-microscopy. *Biochemistry* 29, 7523–7530.
- Brinda, K.V., Mitra, N., Surolia, A., Vishveshwara, S., 2004. Determinants of quaternary association in legume lectins. *Protein Sci.* 13, 1735–1749.
- Brinda, K.V., Surolia, A., Vishveshwara, S., 2005. Insights into the quaternary association of proteins through structure graphs: a case study of lectins. *Biochem. J.* 391, 1–15.
- Butters, T.D., Hughes, R.C., 1978. Lectin binding to mosquito aedes-egyptii and human kb cells—structural comparisons of membrane oligosaccharides. *Carbohydr. Res.* 61, 159–168.
- Collaborative Computational Project, Number 4, 1994. The Cep4 suite—programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D* 50, 760–763.
- Chandra, N.R., Prabu, M.M., Suguna, K., Vijayan, M., 2001. Structural similarity and functional diversity in proteins containing the legume lectin fold. *Protein Eng.* 14, 857–866.
- Cheng, W., Bullitt, E., Bhattacharyya, L., Brewer, C.F., Makowski, L., 1998. Electron microscopy and X-ray diffraction studies of *Lotus tetragonolobus* A isolectin cross-linked with a divalent Lewis(x) oligosaccharide, an oncofetal antigen. *J. Biol. Chem.* 273, 35016–35022.
- Dam, T.K. et al., 2005. Thermodynamic, kinetic, and electron microscopy studies of concanavalin A and *Dioclea grandiflora* lectin cross-linked with synthetic divalent carbohydrates. *J. Biol. Chem.* 280, 8640–8646.
- Davidsson, P., Karlsson, B., Svennerholm, L., 1987. Glycoprotein pattern in human-brain tumors studied using lectin binding after sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis and protein blotting. *Brain Res.* 412, 254–260.
- Delatorre, P., Rocha, B.A., Souza, E.P., Oliveira, T.M., Bezerra, G.A., Moreno, F.B., Freitas, B.T., Santi-Gadella, T., Sampaio, A.H., Azevedo Jr., W.F., Cavada, B.S., 2007. Structure of a lectin from *Camavalia gladiata* seeds: new structural insights for old molecules. *BMC Struct. Biol.* 7, 52.
- Delbaere, L.T.J. et al., 1993. Structures of the lectin-Iv of *Griffonia simplicifolia* and its complex with the Lewis-B human blood-group determinant at 2.0-angstrom resolution. *J. Mol. Biol.* 230, 950–965.
- Filgueira de Azevedo Jr., W., dos Santos, G.C., dos Santos, D.M., Olivieri, J.R., Canduri, F., Silva, R.G., Basso, L.A., Renard, G., da Fonseca, I.O., Mendes, M.A., Palma, M.S., Santos, D.S., 2003. Docking and small angle X-ray scattering studies of purine nucleoside phosphorylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309 (4), 923–928.
- Finne, J., Castori, S., Feizi, T., Burger, M.M., 1989. Lectin-resistant variants and revertants of mouse melanoma-cells—differential expression of a fucosylated cell-surface antigen and altered metastasizing capacity. *Int. J. Cancer* 43, 300–304.
- Guex, N., Peitsch, M.C., 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714–2723.
- Guinier, A., Fournet, G., 1955. Small-Angle Scattering of X-rays. John Wiley & sons, NY.
- Gurd, J.W., 1979. Molecular and biosynthetic heterogeneity of fucosyl glycoproteins associated with rat-brain synaptic junctions. *BBA* 555, 221–229.
- Griffiths, D.W.R., Stephenson, T.J., 1988. Lectin agglutinins—a comparative-study of *Lotus tetragonolobus* and *Ulex europaeus*-1 as markers of vascular endothelium in follicular thyroid-carcinoma. *Med. Lab. Sci.* 45, 45–51.
- Hardman, K.D., Ainsworth, C.F., 1972. Structure of concanavalin-a at 2.4-Å resolution. *Biochemistry* 11, 4910–4919.
- Haselhorst, T., Weimar, T., Peters, T., 2001. Molecular recognition of sialyl Lewis(x) and related saccharides by two lectins. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 10705–10714.
- Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K., 1996. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* 14, 33.
- Imura, J. et al., 2004. Multilocular cystic renal cell carcinoma: a clinicopathological, immuno- and lectin histochemical study of nine cases. *Amis* 112, 183–191.
- Kalb, A.J., 1968. Separation of 3  $\alpha$ -fucose-binding proteins of *Lotus tetragonolobus*. *BBA* 168, 532.
- Koch, B. et al., 1983. The binding of different lectins on peripheral-blood mononuclear-cells from patients with chronic inflammatory and malignant diseases. *Immunobiology* 164, 99–109.
- Konami, Y., Yamamoto, K., Osawa, T., 1990. The primary structure of the *Lotus tetragonolobus* seed lectin. *FEBS Lett.* 268, 281–286.
- Kozin, M.B., Svergun, D.I., 2001. Automated matching of high- and low-resolution structural models. *J. Appl. Crystallogr.* 34, 33–41.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., Thornton, J.M., 1993. Procheck—a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* 26, 283–291.
- Leslie, A.G.W., 1992. JntCCP4/ESF-EACBM. *News. Protein Crystallogr.* 26.
- Loris, R., Hamelryck, T., Bouckaert, J., Wyns, L., 1998. Legume lectin structure. *BBA Protein Struct. Mol. Enzyme* 1383, 9–36.
- Loris, R. et al., 2000. Structural basis of carbohydrate recognition by lectin II from *Ulex europaeus*, a protein with a promiscuous carbohydrate-binding site. *J. Mol. Biol.* 301, 987–1002.
- Mayliepenninger, M.F., Jamieson, J.D., 1979. Distribution of cell-surface saccharides on pancreatic cells. 2. Lectin-labeling patterns on mature guinea-pig and rat pancreatic cells. *J. Cell Biol.* 80, 77–95.
- McRee, D.E., 1999. XtalView Xfit—a versatile program for manipulating atomic coordinates and electron density. *J. Struct. Biol.* 125, 156–165.

- Miettinen, H.H.A. et al., 1983. Cellular-origin and differentiation of renal carcinomas—a fluorescence microscopic study with kidney-specific antibodies, antiintermediate filament antibodies, and lectins. *Lab. Invest.* 49, 317–326.
- Moothoo, D.N., Naismith, J.H., 1998. Concanavalin A distorts the beta-GlcNAc-(1 → 2)-Man linkage of beta-GlcNAc-(1 → 2)-alpha-Man-(1 → 3)-[beta-GlcNAc-(1 → 2)-alpha-Man-(1 → 6)]-Man upon binding. *Glycobiology* 8, 173–181.
- Moreno, F.B.M.B., Martil, D.E., Cavada, B.S., deAzevedo, W.F., 2006. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of an anti-H(O) lectin from *Lotus tetragonolobus* seeds. *Acta Crystallogr. F* 62, 680–683.
- Murshudov, G., Vagin, A., Dodson, E., 1996. Application of maximum likelihood refinement in the refinement of protein structures. In: *Proceedings of Daresbury Study Weekend*.
- Napier, P.W., Everhart, D.L., Grundbac, F.J., 1974. Characterization of a human saliva antigen precipitated by a lectin from *Lotus tetragonolobus*. *Vox Sang.* 27, 447–458.
- Porod, G., 1982. In: Glatter, O., Kratky, O. (Eds.), *Small-Angle X-ray Scattering*. Academic Press, London, pp. 17–51.
- Raedler, A., Schmiegel, W.H., Raedler, E., Arndt, R., Thiele, H.G., 1983. Lectin-defined cell-surface glycoconjugates of pancreatic-cancer cells and their nonmalignant counterparts. *Exp. Cell Biol.* 51, 19–28.
- Raju, G.C., Lee, Y.S., 1988. Lectin expression in carcinoid-tumors of the gastrointestinal-tract. *J. Pathol.* 154, 263–268.
- Ravishankar, R., Thomas, C.J., Suguna, K., Surolia, A., Vijayan, M., 2001. Crystal structures of the peanut lectin-lactose complex at acidic pH: retention of unusual quaternary structure, empty and carbohydrate bound combining sites, molecular mimicry and crystal packing directed by interactions at the combining site. *Proteins* 43, 260–270.
- Sagan, Z., Olszewska, I., Pawlus, M., 1963. Research on phytoagglutinin from the seeds of *Lotus tetragonolobus* L. and some other plants. *Acta Pol. Pharm.* 20 (20), 83–88.
- Staudacher, E., Altmann, F., Wilson, I.B.H., Marz, L., 1999. Fucose in N-glycans: from plant to man. *BBA Gen. Subj.* 1473, 216–236.
- Svergun, D.I., 1992. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *J. Appl. Crystallogr.* 25, 495–503.
- Svergun, D.I., 1999. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophysical J* 76, 2879–2886.
- Thomas, C.J., Surolia, A., 2000. Mode of molecular recognition of L-fucose by fucose-binding legume lectins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268, 262–267.
- Turner, G.A., Goodarzi, M.T., Thompson, S., 1995. Glycosylation of alpha-1-proteinase inhibitor and haptoglobin in ovarian-cancer—evidence for 2 different mechanisms. *Glycoconj. J.* 12, 211–218.
- Turton, K., Natesh, R., Thiyagarajan, N., Chaddock, J.A., Acharya, K.R., 2004. Crystal structures of *Erythrina cristagalli* lectin with bound N-linked oligosaccharide and lactose. *Glycobiology* 14, 923–929.
- Uchoa, H.B. et al., 2004. Parmodel: a web server for automated comparative modeling of proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325, 1481–1486.
- Ulrich, W., Horvat, R., Krisch, K., 1985. Lectin histochemistry of kidney tumours and its pathomorphological relevance. *Histopathology* 9 (10), 1037–1050.
- Vagin, A., Teplyakov, A., 1997. MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Crystallogr.* 30, 1022–1025.
- Van Damme, E.J.M., Peumans, W.J., Barre, A., Rouge, P., 1998. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Crit. Rev. Plant Sci.* 17, 575–692.
- Volkov, V.V., Svergun, D.I., 2003. Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering. *J. Appl. Crystallogr.* 36, 860–864.
- Yariv, J., Kalb, A.J., Katchals, E., 1967. Isolation of an L-fucose binding protein from *Lotus tetragonolobus* Seed. *Nature* 215, 890.
- Walker, R.A., 1984. The binding of peroxidase-labelled lectins to human breast epithelium. III—Altered fucose-binding patterns of breast carcinomas and their significance. *J. Pathol.* 144 (2), 109–117.



## Interfacial surface charge and free accessibility to the PLA<sub>2</sub>-active site-like region are essential requirements for the activity of Lys49 PLA<sub>2</sub> homologues

Mário T. Murakami<sup>a</sup>, Magno M. Viçoti<sup>a</sup>, José R.B. Abrego<sup>a</sup>,  
Marco R. Lourenzoni<sup>b</sup>, Adélia C.O. Cintra<sup>c</sup>, Emerson Z. Arruda<sup>d</sup>,  
Marcelo A. Tomaz<sup>d</sup>, Paulo A. Melo<sup>d</sup>, Raghuvir K. Arni<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Physics, IBILCE/UNESP, Cristovão Colombo 2265, São José do Rio Preto, SP 15054-000, Brazil

<sup>b</sup>Associated Researchers, São Carlos, SP, Brazil

<sup>c</sup>Department of Toxicology, USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil

<sup>d</sup>Department of Basic and Clinical Pharmacology, ICB, CCS, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>e</sup>Center for Applied Toxinology, Butantan Institute, São Paulo, SP, Brazil

Received 14 August 2006; received in revised form 19 October 2006; accepted 23 October 2006

Available online 3 November 2006

### Abstract

Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> homologues are highly myotoxic and cause extensive tissue damage but do not display hydrolytic activity towards natural phospholipids. The binding of heparin, heparin derivatives and polyanionic compounds such as suramin result in partial inhibition (up to 60%) of the myotoxic effects due to a change in the overall charge of the interfacial surface. In vivo experiments demonstrate that polyethylene glycol inhibits more than 90% of the myotoxic effects without exhibiting secondary toxic effects. The crystal structure of bothropstoxin-I complexed with polyethylene glycol reveals that this inhibition is due to steric hindrance of the access to the PLA<sub>2</sub>-active site-like region. These two inhibitory pathways indicate the roles of the overall surface charge and free accessibility to the PLA<sub>2</sub>-active site-like region in the functioning of Lys49 phospholipases A<sub>2</sub> homologues. Molecular dynamics simulations, small angle X-ray scattering and structural analysis indicate that the oligomeric states both in solution and in the crystalline states of Lys49 phospholipases A<sub>2</sub> are principally mediated by hydrophobic contacts formed between the interfacial surfaces. These results provide the framework for the potential application of both clinically approved drugs for the treatment of *Viperidae* snakebites.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Lys49 phospholipases A<sub>2</sub> homologues; Myonecrosis; Suramin; Polyethylene glycol; Small angle scattering; Crystal structure and molecular dynamics

**Abbreviations:** PLA<sub>2</sub>, phospholipase A<sub>2</sub>; BthTX-I, *Bothrops jararacussu* bothropstoxin-I; ACL, myotoxin, *Agkistrodon contortrix laticinctus* myotoxin; Basp-II, *Bothrops asper* myotoxin II; CK, creatine kinase; NSD, normalized spatial discrepancy; SAXS, small angle X-ray scattering; PEG-400, polyethylene glycol 400; MD, molecular dynamics; RMSD, root mean square deviations; IIP, intermolecular interaction potential; PISA, Protein, Interfaces, Surfaces and Assemblies.

\*Corresponding author. Department of Physics, IBILCE/UNESP, Cristovão Colombo 2265, São José do Rio Preto, SP 15054-000, Brazil. Tel.: +55 17 3321 2460; fax: +55 17 3221 2247.

E-mail address: arni@ibilce.unesp.br (R.K. Arni).

## 1. Introduction

Envenomation by Viperidae snakes results in acute myonecrosis that provokes permanent tissue loss resulting in disability, amputation and in some cases, death (Gutiérrez and Lomonte, 1995). Myonecrosis is mainly caused by the direct action of catalytically inactive Lys49 phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) homologues upon the plasma membrane of muscle cells and by the indirect action of metalloproteinases and serine proteinases on the haemostatic system (Gutiérrez and Lomonte, 1995; Ownby et al., 1999). Since the widely used anti-venom serum therapy does not address myonecrosis, the inclusion of a supplementary agent for the treatment of Viperidae snakebites is therapeutically relevant.

Heparin and related polyanions are able to inhibit myonecrosis induced by snake venoms that contains myotoxins such as *Bothrops jararacussu* bothropstoxin-I (BthTX-I) (Homsí-Branderburgo et al., 1988), *Agkistrodon contortrix laticeps* myotoxin (ACL myotoxin) (Johnson and Ownby, 1993) and *Bothrops asper* myotoxin II (Basp-II), both in vivo and in vitro (Lomonte and Gutiérrez, 1989). Suramin, a polysulphonated naphthyl urea derivative used clinically in the treatment of onchocerciasis (Burch and Ashburn, 1951), African trypanosomiasis (Williamson and Desowitz, 1956) and several kinds of cancers (LaRocca et al., 1993; van Oosterom et al., 1991), is also a potential inhibitor of myotoxins both in vivo and in vitro and represents an important therapeutic agent for the treatment of Viperidae snakebites (Arruda et al., 2002; Murakami et al., 2005).

Catalytically inactive Lys49 PLA<sub>2</sub>s homologues cause membrane leakage in the absence of Ca<sup>2+</sup> ions, without concomitant hydrolysis when tested against negatively charged liposomes (Gutiérrez and Lomonte, 1995; Ownby et al., 1999). A number of studies involving different techniques, such as chemical modification, sequence comparison analyses, interaction with neutralizing molecules, synthetic peptide studies, and site-directed mutagenesis, have been used in an attempt to elucidate the structural determinants for myotoxicity of Lys49 PLA<sub>2</sub>s homologues (Ownby et al., 1999; Murakami et al., 2005).

Our studies combining small angle X-ray scattering, crystallography, molecular dynamics simulations, inhibition by suramin and polyethylene glycol and in vivo tests, reveal new features of the action

mechanism of myotoxins, suggesting a promising supplement of the current serum treatment by the inclusion of potent inhibitors that simultaneously bind both in the putative catalytic and at the interfacial recognition sites.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Purification and biochemical characterization

Crude desiccated *B. jararacussu* venom was obtained from a local serpentarium and BthTX-I was purified with minor modifications following the published protocol (Spencer et al., 1998). The purity of the samples was confirmed by SDS-PAGE (Laemmli, 1970) and the protein concentrations were determined by the Bradford method (Bradford, 1976).

### 2.2. In vivo myotoxic assay

In vivo myotoxic assays were carried out as previously described in Murakami et al. (2005) with minor modifications. In accordance with each protocol, the quantity of toxin (50 µg/g) administered was adjusted taking into consideration the individual weight of each animal and different ratios of suramin and polyethylene glycol (1:0.25, 1:0.50, 1:1, 1:2.5, 1:5.0; BthTX-I:inhibitor). Enzyme activity was expressed as international Units per liter (U/L), where 1 U is defined as the amount that catalyzes the transformation of 1 µmol of substrate at 25 °C.

### 2.3. Scattering data acquisition and analysis

Small angle X-ray scattering (SAXS) measurements were conducted at room temperature utilizing the D11A-SAXS beamline at the Brazilian National Synchrotron Light Source where the wavelength was set to 1.488 Å. A sample concentration of 4–10 mg/mL in a 20 mM, pH 7.0 Tris-HCl buffer was used and serial dilutions were prepared to permit the extrapolation of the SAXS curves to zero concentration. Data acquisitions were performed by taking several 600 s frames of each sample. Data fitting was performed using the GNOM program (Semenyuk and Svergun, 1991) and the radius of gyration ( $R_g$ ) of the protein in solution was determined from the lowest  $q$  values using the Guinier approximation (Guinier and Fournet, 1955). The ab initio shape determination was

performed by the dummy atom model method, using the program DAMMIN (Svergun, 1999) and the independent *ab initio* reconstructions were averaged with program DAMAVER. The shape reconstruction and the crystallographic atomic coordinates were superimposed (SUPCOMB 2.0) (Kozin and Svergun, 2001). The superpositioning was assessed by normalized spatial discrepancy (NSD or parameter *d*), which estimates the similarity between two different three-dimensional objects. NSD values < 1.5 indicate high correlation of the surface complementarity and is typical for the comparisons between an atomic model and the corresponding DAMMIN model. The theoretical SAXS pattern based on the atomic coordinates was calculated using the program CRY SOL (Svergun et al., 1995).

#### 2.4. Crystallization, data collection, structure determination and refinement

Crystallization was performed by the hanging-drop vapour diffusion method and large single crystals (0.4 mm in each dimension) were obtained when a 2- $\mu$ L protein droplet (protein concentration 12 mg/mL) was mixed with an equal volume of reservoir solution consisting of 0.1 M Hepes (pH 7.5), 2.0 M ammonium sulphate and 20% polyethylene glycol 400 (PEG-400). The crystals were transferred to a cryo-protectant solution containing 20% glycerol and were flash frozen. Diffraction intensities were recorded utilizing a MAR-CCD detector at the D03B/MX1 Beamline at the Brazilian National Synchrotron Light Source where the wavelength of the incident radiation was set to 1.47 Å. The diffraction intensities were integrated, scaled and merged using the HKL suite of programs (Otwinowski and Minor, 1997).

The crystal structure of the BthTX-I was solved by molecular replacement techniques with the AMoRe package (Navaza, 1994) using the atomic coordinates of the Basp-II (PDB code 1Y4L) (Murakami et al., 2005) as the search model. Positional and individual isotropic thermal factor refinements were carried out using REFMAC5 (Murshudov et al., 1997) as incorporated in the CCP4 suite. The  $2F_o - F_c$  and  $F_o - F_c$  electron density maps were examined, the protein model was manually adjusted after each refinement cycle using TURBO FRODO (Jones, 1985) and COOT (Emsley and Cowtan, 2004) and the stereochemistry of the final model was analyzed using PROCHECK

(Laskowski et al., 1993). The atomic coordinates and structure factors of BthTX-I have been deposited with the Protein Data Bank (accession code 2H8I).

#### 2.5. Molecular dynamics

Explicit solvent molecular dynamics (MD) simulations were performed using the GROMACS 3.2 software package and the GROMOS-96 (43a1) force field (Lindahl et al., 2001). Two different systems were simulated, (i) the BthTX-I dimer and (ii) BthTX-I complexed with suramin. The topology of suramin was obtained from the Dundee PRODRG Server ([http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/cgi-bin/prodrgr\\_beta](http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/cgi-bin/prodrgr_beta)). All MD simulations were performed in an isothermal-isobaric ensemble, using the "leapfrog" algorithm (Hockney and Goel, 1974) and the temperature and pressure were controlled using the Berendsen method (Berendsen et al., 1981). The long-range interactions were treated using the particle-mesh Ewald sum method (Darden et al., 1993). The LINCS algorithm (Hess et al., 1997) was used to constrain protein covalent bonds involving hydrogen atoms, and the SETTLE algorithm (Miyamoto and Kollman, 1992) was used to constrain water molecules. The BthTX-I/suramin complex simulations were performed in three phases. In the first phase (Phase I) a short simulation was performed with BthTX-I by imposing restraints on atomic positions during 100 ps in order to equilibrate the system. In the second phase (Phase II), the atomic positions of BthTX-I atoms were not restrained in order to relax the protein structure, enabling the determination of the relaxed solution structure. In the final phase (Phase III), the complete system was simulated without imposing positional restraints. The root mean square deviation (RMSD) and intermolecular interaction potential (IIP) were monitored.

### 3. Results

#### 3.1. Effect of suramin or/and polyethylene glycol on myotoxicity *in vivo*

Intramuscular injections of BthTX-I (50  $\mu$ g/g) increased plasma CK activity from  $85 \pm 41$  to  $3950 \pm 248$  U/L after 2 h (Figs. 1A and B). Pre-incubation of BthTX-I with suramin for 15 min significantly inhibits the increase in plasma CK activity in a dose-dependent fashion with maximum

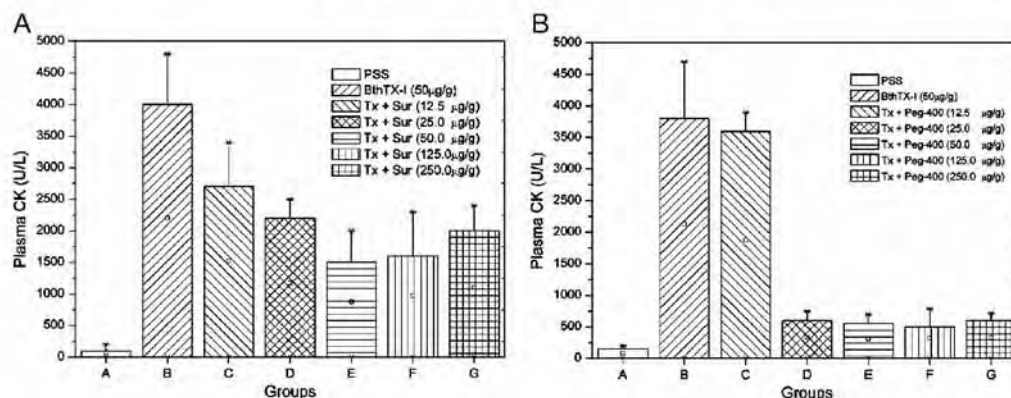


Fig. 1. In vivo dose-dependent effect of suramin (A) or PEG-400 (B) on CK release.

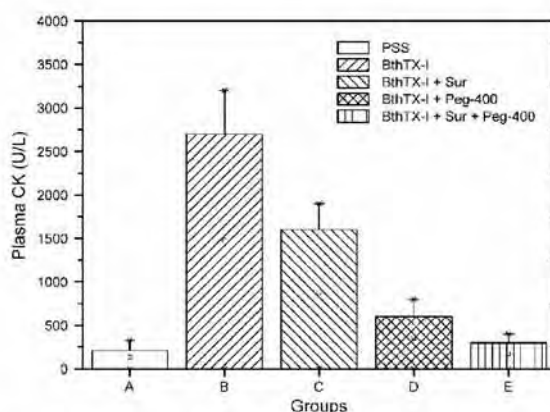


Fig. 2. In vivo effects of suramin and/or PEG-400 on the CK release.

inhibition observed when the ratio is 1:1 (w/w; BthTX-I:suramin) (Fig. 2A). These values of plasma CK activity are in agreement with previously reported values for other homologous Lys49 PLA<sub>2</sub>s such as ACL myotoxin (Melo et al., 1994) and Basp-II (Murakami et al., 2005). Experiments with PEG-400 were conducted under the same conditions (Fig. 2B). PEG-400 proved to be 30% more potent than suramin resulting in approximately 92% inhibition of myotoxicity, whereas the maximum inhibition by suramin is 40% (Figs. 1A and B). The effect of the simultaneous inclusion of both compounds was tested in vivo (Fig. 2) and displayed enhanced inhibition, dramatically decreasing the CK activity to insignificant levels.

### 3.2. Crystal structure of BthTX-I complexed with PEG-400

The final model consists of two molecules of BthTX-I forming a homodimer, two PEG-400 fragments and 86 solvent water molecules. The refinement converged to a crystallographic residual of 22.5% ( $R_{\text{free}} = 27.6\%$ ) for 18,722 reflections in the resolution range of 10.0–1.9 Å. The electron density in the  $2F_o - F_c$  Fourier maps was continuous and well defined for both monomers in the asymmetric unit, except for the C-terminii, which are typically disordered as in other structures. The model displays good overall stereochemistry with RMSD values of 0.02 Å and 2.1° for bond lengths

and bond angles, respectively and the average  $B$ -value for all atoms is  $41.5 \text{ \AA}^2$  (Table 1). The Ramachandran plot demonstrates that 88.5% of the dihedral angles are situated in the most favored regions, while the remaining 10.5% of residues are in the additionally permitted regions. The molecular topology of BthTX-I conserves all the main features of PLA<sub>2</sub>s containing an N-terminal  $\alpha$ -helix (H1) (residue 2–12) and the two long anti-parallel disulphide linked  $\alpha$ -helices (H2 from residue 40 to residue 55 and H3 from residue 86 to residue 103) with a mean distance of  $10 \text{ \AA}$  between the helical axes and two short helical turns (residues 19–22; SH4 and 108–110; SH5) (Arni and Ward, 1996). The  $\beta$ -wing region (residues 74–84) is structurally conserved and a disulphide bridge preserves its relative orientation. The total dimeric interface area

between the two molecules was calculated to be approximately  $3598 \text{ \AA}^2$  occluding the whole hydrophobic channel and the entrance to both the active-site pockets.

### 3.3. PEG-binding site

In both monomers, the electron density maps indicated the presence of a PEG-400 molecule bound in the hydrophobic channels that lead to the PLA<sub>2</sub>-active site-like regions (Fig. 3A). The PEG-400 molecules interact with the putative calcium-binding loop and the residues considered important for catalysis. The O1 atoms from the tails of the PEG-400 fragments simultaneously interact with the amide bonds between Cys29–Gly30 and His48ND1 atom via a water molecule (Fig. 3B). Similar interactions were observed in the crystal structure of piratoxin II, a Lys49 PLA<sub>2</sub> from *Bothrops pirajai*, which contains a fatty acid bound at the entrance to the active-site cavity (Lee et al., 2001) and in the crystal structure of Basp-II complexed with stearic acid (Watanabe et al., 2005). The crystal structure of Basp-II complexed with suramin also contains a PEG molecule bound at the active-site cavity concomitantly with suramin (Murakami et al., 2005) bound at the interfacial recognition face.

### 3.4. Suramin-binding site

In the MD simulations of BthTX-I with suramin, the structural stability was monitored by the RMSDs of the protein atoms in phases II and III (Fig. 4A), which undergo small positional shifts (around  $1.4 \text{ \AA}$ ) and a corresponding reduction in the IIP from  $-145$  to  $-233 \text{ kcal mol}^{-1}$  (Fig. 4B), indicating that the hydrated structure of BthTX-I is similar to the crystallographic model. The resulting BthTX-I/suramin complex model obtained from the MD simulations demonstrate a similar mode of binding to that described for the crystal structure of the Basp-II/suramin complex, where the residues Arg34 and Lys53 play key roles in the interaction with the sulphonated naphthyl rings (Fig. 3C). The central phenyl rings embrace the putative calcium-binding loop and the short helical turn (SH4) shields the whole hydrophobic surface, inducing a drastic change in the overall charge of the interfacial recognition face of the protein.

Table 1  
Data collection and refinement statistics

PDB code	2H81
<i>Data-collection statistics</i>	
Space group	P 3 <sub>1</sub> 2 1
Unit-cell parameters (Å)	$a = b = 56.02$ ; $c = 127.57$
Resolution range (Å)	9.96–1.90
Unique reflections	18,722
Redundancy	10.5 (8.5)
Completeness (%)	99.3 (98.8)
$I/\sigma(I)$	32.81 (4.33)
$R_{\text{merge}}$ (%) <sup>a</sup>	5.3 (41.0)
$V_M$ (Å <sup>3</sup> Da <sup>-1</sup> )	2.02
Solvent content (%)	38.58
<i>Refinement statistics</i>	
$R_{\text{factor}}$ (%) <sup>b</sup>	22.5
$R_{\text{free}}$ value (%) <sup>c</sup>	27.6
No. of amino acid residues	242
No. of solvent molecules	122
No. of polyethylene glycol molecules	2
Mean temperature factor (Å <sup>2</sup> ) <sup>d</sup>	41.5
R.m.s.d. bond lengths (Å)	0.020
R.m.s.d. bond angles (°)	2.145
Ramachandran plot	
Most favoured region (%)	88.5
Additionally allowed regions (%)	10.5
Generously allowed regions (%)	0.5
Disallowed regions (%)	0.5

Values in parentheses are for the highest resolution shell.

<sup>a</sup> $R_{\text{merge}} = 100 \times \sum |I(h) - \langle I(h) \rangle| / \sum I(h)$ , where  $I(h)$  is observed intensity and  $\langle I(h) \rangle$  is mean intensity of reflection  $h$  over all measurements of  $I(h)$ .

<sup>b</sup> $R_{\text{factor}} = 100 \times \sum |F_o - F_c| / \sum F_o$ , the sums being taken over all reflections with  $F/\sigma(F) > 2$  cutoff.

<sup>c</sup> $R_{\text{free}} = R_{\text{factor}}$  for 5% of the data, which were not included during crystallographic refinement.

<sup>d</sup> $B$ -values are average  $B$ -values for all non-hydrogen atoms.

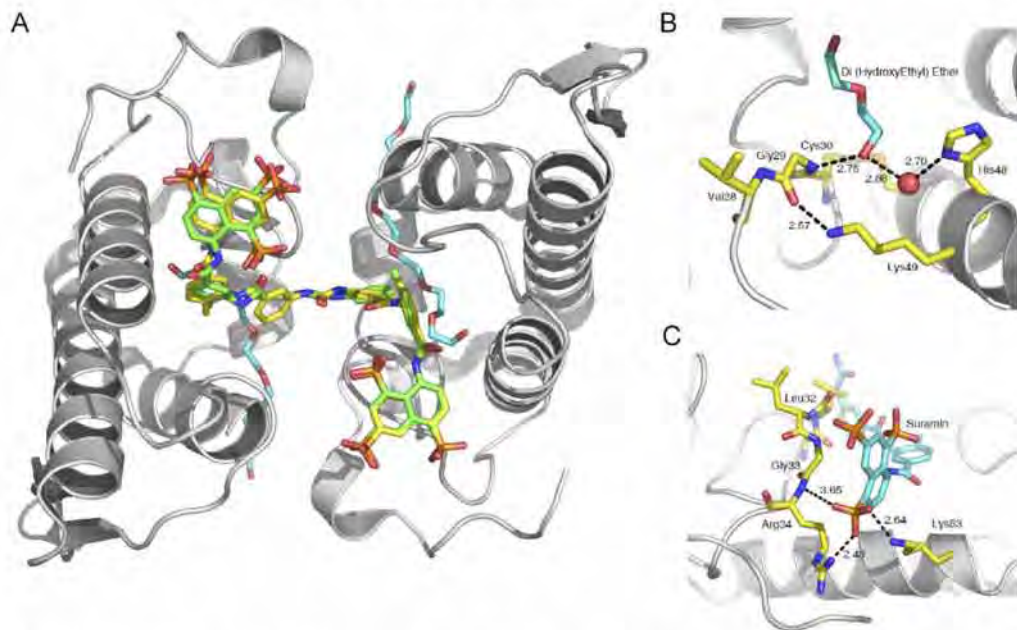


Fig. 3. (A) Simultaneous binding of suramin in the crystal structure of Basp-II (carbon atoms in yellow; PDB entry: 14YL) and in MD simulations of BthTX-I (carbon atoms in green, this work) and PEG of Basp-II (carbon atoms in blue). (B) Interactions of PEG (carbon atoms in blue) at the putative catalytic active of BthTX-I (this work). (C) Interactions resulting from the MD simulations between suramin (carbon atoms in blue) and BthTX-I (carbon atoms in yellow).

### 3.5. Oligomeric state

Electrophoretic and spectroscopic techniques indicate that a number of Lys49 PLA<sub>2</sub>s homologues exist as dimers in solution (Arni et al., 1995). Previous crystallographic and spectroscopic results suggest that these molecules adopt an extended conformation with a radius of gyration of 20.2 Å, maintained by diad, polar interactions formed between the  $\beta$ -wing and N-terminal helix regions that involve the strictly conserved residues: Gln11, Glu12, Trp77 and Lys80. In this conformation, the hydrophobic channels and interfacial surfaces are exposed to the solvent (Ward et al., 1998; da Silva-Giotto et al., 1998). Based on this, a model for the disruption of membranes by Lys49 PLA<sub>2</sub> homologues has been proposed (Lomonte et al., 2003).

However, the SAXS results show that the radius of gyration ( $R_g$ ) of BthTX-I is 17.5 Å indicating that this molecule adopts a more compact dimeric conformation as observed in the crystal structure of the suramin/Basp-II complex (Murakami et al., 2005) (Fig. 3A) that displays a  $R_g$  of 17.9 Å. The

profiles of the scattering curve and distance distribution function  $p(r)$  are presented in Figs. 5A and B, respectively. Re-examination of the molecules forming the asymmetric unit of a numerous dimeric Lys49 PLA<sub>2</sub> homologues indicates that this conformation is equally likely depending on the criteria used for the selection of the symmetry mates. The averaged ab initio shape of BthTX-I was superposed on the atomic coordinates of the extended (Figs. 6D–F) and compact dimers (Figs. 6A–C), resulting in NSD values of 1.85 and 1.21, respectively, indicating high shape complementarity between the ab initio solution envelope and the surface envelope of the compact dimer (Fig. 6G).

In this compact model, the interface consists of non-polar contacts formed between the interfacial surfaces connecting the PLA<sub>2</sub>-active site-like regions, shielding the whole hydrophobic faces of Lys49 PLA<sub>2</sub>s homologues from the solvent. Analysis of the protein interfaces of several Lys49 PLA<sub>2</sub>s homologues with the Protein, Interfaces, Surfaces and Assemblies (PISA) software ([http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot\\_int/pistart.html](http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html)) suggests that

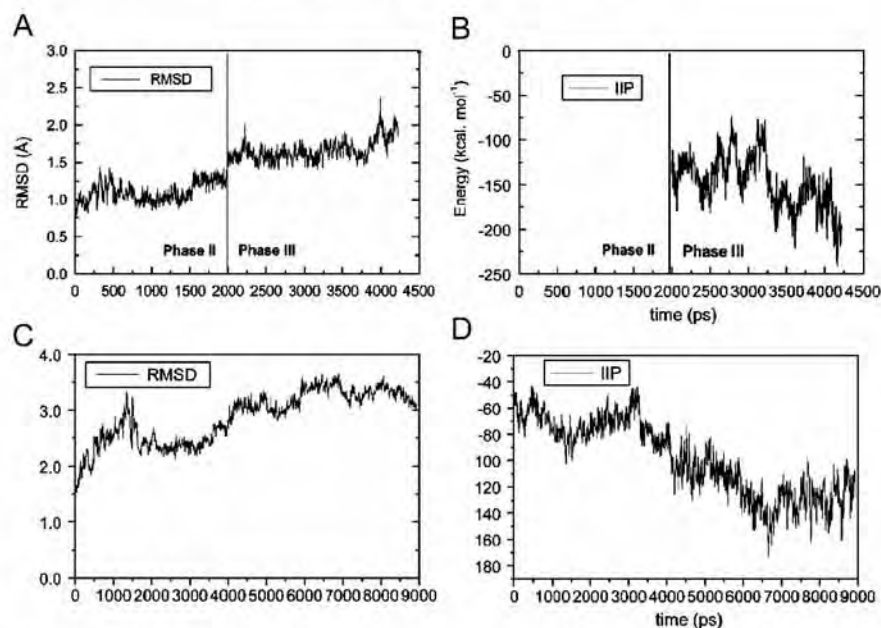


Fig. 4. Results of the MD simulations. (A) RMSD and (B) IIP values during phases II and III of BthTX-I plus suramin and (C) RMSD and (D) IIP for 9 ns of the compact dimer.

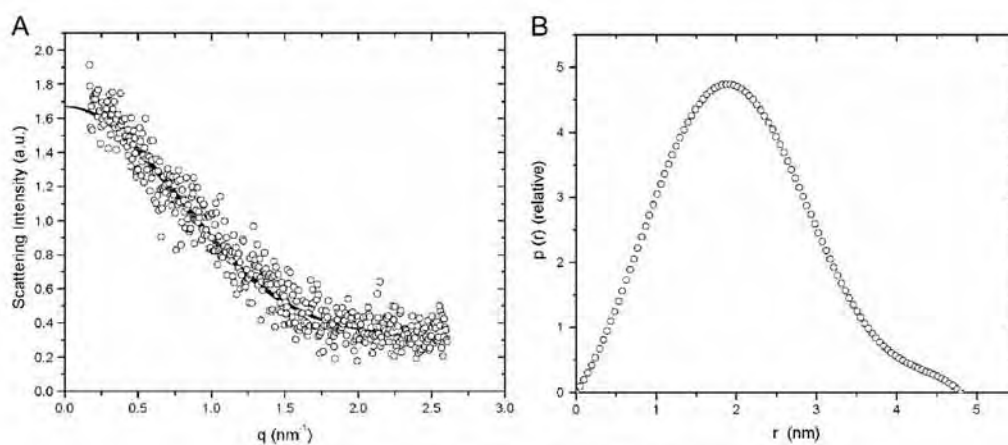


Fig. 5. Experimental scattering intensity (A) and  $p(r)$  distribution (B) curves.

the compact dimeric conformation is more likely. Additionally, MD simulations of the compact dimer for 9 ns indicated small increments in the RMSD

(Fig. 4C) and a reduction in the IIP from  $-45$  to  $-125 \text{ kcal mol}^{-1}$  (Fig. 4D), indicating that this conformation is stable in aqueous solution.

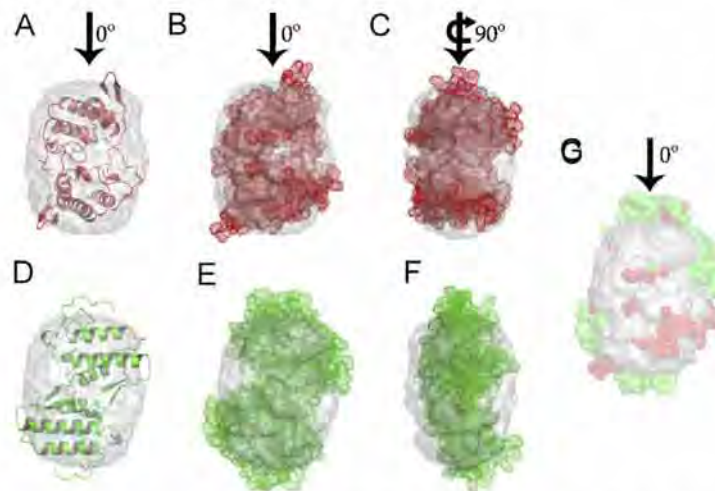


Fig. 6. Superpositioning of the atomic coordinates of the compact (A), (B) and (C) and extended (D), (E) and (F) oligomeric states on the SAXS ab initio envelope (gray transparent surface). Ribbon and space filling representations of the compact (A), (B) and (C) and extended (D), (E) and (F) dimers in the same orientation and 90° rotation of B/E along the vertical axis. (G) Surface representation of the compact (red) and extended (green) dimers on the SAXS envelope.

#### 4. Discussion

The capacity of polyanionic compounds to neutralize the myotoxic effects of snake venoms PLA<sub>2</sub>s has been extensively studied, especially in view of the limited efficacy of antisera in antagonizing these effects (Melo and Suarez-Kurtz, 1988; Melo and Ownby, 1999; Calil-Elias et al., 2002; Murakami et al., 2005) and the fact that they constitute useful tools for investigating the mechanisms of action of myotoxins (Gutiérrez and Lomonte, 1995).

The mechanism of inhibition of Lys49 PLA<sub>2</sub>s homologues by suramin, which involves an induced-fit binding at the hydrophobic surface of the dimer significantly changing the overall charge on the interfacial recognition face and the resulting partial blockage of the PLA<sub>2</sub>-active site-regions, has been reported (Melo et al., 1993; Calil-Elias et al., 2002; de Oliveira et al., 2003; Murakami et al., 2005). In vivo experiments with polyethylene glycol, a water-soluble waxy solid that is used extensively in the cosmetic, toiletry industry and as a medication for osmotic laxatives, indicates that is a more potent inhibitor of myotoxicity induced by Lys49 PLA<sub>2</sub>s homologues than suramin. Polyethylene glycol inhibits more than 90% of the myotoxic activity

and does not display any secondary toxic effects. In the crystal structure of BthTX-I complexed with PEG, the PEG molecules are bound in the hydrophobic channels that lead to the PLA<sub>2</sub>-active site-like region, interacting simultaneously with the amide bonds formed between Cys29–Gly30 and ND1 of His48 via a water molecule. This result indicates an alternative, more efficient pathway for the inhibition of myotoxicity by blocking the PLA<sub>2</sub>-active site-like region, without altering the overall surface charge. Since both suramin and PEG use different sites, the combination of suramin and polyethylene glycol was tested and almost complete inhibition of the myotoxic activity of Lys49 PLA<sub>2</sub>s homologues was observed, thus representing a possible utility for the complementary treatment of *Viperidae* snakebites.

#### 5. Concluding remarks

The action mechanism of myotoxic homologues Lys49 PLA<sub>2</sub>s is a paradigm for toxinologists and a number of different strategies, such as chemical modification, sequence comparison analyses, interaction with neutralizing molecules, synthetic peptide studies, and site-directed mutagenesis analyses have attempted to elucidate the structural determinants

for myotoxicity of Lys49 PLA<sub>2</sub>s. Our results indicate that (i) the molecules that bind at the PLA<sub>2</sub>-active site-like region inhibit the myotoxic activity of Lys49 PLA<sub>2</sub>; (ii) PEG derivatives represent attractive targets for drug design aimed at the treatment of Viperidae snakebites since they are non-toxic; (iii) binding of suramin and heparin analogues at the hydrophobic interfacial surface also inhibit myotoxic activity albeit at a lower level and (iv) the inclusion of molecules that bind both at the PLA<sub>2</sub>-active site-like region and at the hydrophobic interfacial surface reduces myonecrosis to extremely low levels.

These biochemical, physiological and structural findings suggest a new promising therapeutic utility for the clinically approved drugs, suramin and PEG, which interact at two distinct sites, for the treatment of myonecrosis induced by Viperidae snakebites.

#### Acknowledgements

Financial support by FAPESP, CEPID, SMOLB-Net, CNPq and CAPES/DAAD is gratefully acknowledged. MTM is recipient of a FAPESP fellowship.

#### References

- Arni, R.K., Ward, R.J., Gutiérrez, J.M., Tulinsky, A., 1995. Structure of a calcium-independent phospholipase-like myotoxic protein from *Bothrops asper* venom. *Acta Crystallogr. D* 51, 311–317.
- Arni, R.K., Ward, R.J., 1996. Phospholipase A<sub>2</sub>—a structural review. *Toxicon* 34, 827–841.
- Arruda, E.Z., Silva, N.M., Moraes, R.A., Melo, P.A., 2002. Effect of suramin on myotoxicity of some crotalid snake venoms. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35, 723–726.
- Berendsen, H.J.C., Postma, J.P.M., van Gunsteren, W.F., Hermans, J., 1981. Interactions models for water in relation to protein hydration. In: Pullman, B. (Ed.), *Intermolecular Forces*. Reidel Publishing Company, Dordrecht, pp. 331–342.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Burch, T.A., Ashburn, L.L., 1951. Experimental therapy of onchocerciasis with suramin and hetrazan; results of a three-year study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31, 617–623.
- Calil-Elias, S., Martinez, A.M., Melo, P.A., 2002. Effect of heparin and antivenom on skeletal muscle damage produced by *Bothrops jararacussu* venom. *Histol. Histopathol.* 17, 463–470.
- Darden, T., York, D., Pedersen, L., 1993. Particle mesh Ewald. An  $N \log(N)$  method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* 98, 10089–10092.
- da Silva-Giotto, M.T., Garrat, R.C., Oliva, G., Mascarenhas, Y.P., Giglio, J.R., Cintra, A.C.O., de Azevedo, W.F., Arni, R.K., Ward, R.J., 1998. Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: conformational changes in bothropstoxin I, a dimeric Lys49-phospholipase A<sub>2</sub> homologue. *Prot. Struct. Funct. Gen.* 30, 442–454.
- de Oliveira, M., Cavalcante, W.L., Arruda, E.Z., Melo, P.A., Dal-Pai Silva, M., Gallacci, M., 2003. Antagonism of myotoxic and paralyzing activities of bothropstoxin-I by suramin. *Toxicon* 42, 373–379.
- Emsley, P., Cowtan, K., 2004. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. Sect. D* 60, 2126–2132.
- Guinier, A., Fournet, G., 1955. *Small Angle Scattering of X-rays*, first ed. Wiley, New York, pp. 17–19.
- Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., 1995. Phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* 33, 1405–1424.
- Hess, B., Becker, H., Berendsen, H.J., Fraaije, J.G.E.M., 1997. Lincs: a linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem.* 18, 1463–1472.
- Hockney, R.W., Goel, S.P., 1974. Quiet high-resolution computer models of a plasma. *J. Comput. Phys.* 14, 148–158.
- Homs-Brandeburgo, M.I., Queiroz, L.S., Santo-Neto, H., Rodrigues-Simioni, L., Giglio, J.R., 1988. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. *Toxicon* 26, 615–627.
- Johnson, E.K., Ownby, C.L., 1993. Isolation of a myotoxin from the venom of *Agkistrodon contortrix latincinctus* (broad-banded copperhead) and pathogenesis of myonecrosis induced by it in mice. *Toxicon* 31, 243–255.
- Jones, T.A., 1985. Interactive computer graphics: FRODO. *Methods Enzymol.* 115, 157–171.
- Kozin, M.B., Svergun, D.I., 2001. Automated matching of high- and low-resolution structural model. *J. Appl. Crystallogr.* 34, 33–41.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- LaRocca, R.V., Cooper, M.R., Uhrich, M., Danesi, R., Walther, M.M., Linehan, W.M., Laskowski, R.A., Moss, D.S., Thornton, J.M., 1993. Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. *J. Mol. Biol.* 231, 1049–1067.
- Laskowski, R.A., Moss, D.S., Thornton, J.M., 1993. Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. *J. Mol. Biol.* 231, 1049–1067.
- Lec, W.H., da Silva Giotto, M.T., Marangoni, S., Toyama, M.H., Polikarpov, I., Garratt, R.C., 2001. Structural basis for low catalytic activity in Lys49 phospholipases A<sub>2</sub>—a hypothesis: the crystal structure of piratoxin II complexed to fatty acid. *Biochemistry* 40, 28–36.
- Lindahl, E., Hess, B., van der Spoel, D.L., 2001. Gromacs 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. *J. Mol. Model.* 7, 306–317.
- Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., 1989. A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon* 27, 725–733.
- Lomonte, B., Angulo, Y., Calderon, L., 2003. An overview of lysine-49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon* 42, 885–901.
- Melo, P.A., Ownby, C.L., 1999. Ability of wedelolactone, heparin and para-bromophenacyl bromide to antagonize the myotoxic effects of two crotaline venoms and their PLA<sub>2</sub> myotoxins. *Toxicon* 37, 199–215.

- Melo, P.A., Suarez-Kurtz, G., 1988. Release of creatine kinase from skeletal muscle by *Bothrops* venoms: heparin potentiation of inhibition by antivenin. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 21, 548–558.
- Melo, P.A., Homsí-Brandemburgo, M.I., Giglio, J.R., Ownby, G., 1993. Antagonism of the myotoxic effects of *Bothrops jararacussu* venom and bothropstoxin by polyanions. *Toxicon* 31, 285–291.
- Melo, P.A., Nascimento, M.C., Mors, W.B., Ownby, G., 1994. Inhibition of the myotoxic and hemorrhagic activities of crotalid venoms by *Eclipta prostrata* (asteraceae) extracts and constituents. *Toxicon* 32, 595–603.
- Miyamoto, S., Kollman, P.A., 1992. SETTLE: an analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *J. Comput. Chem.* 13, 952–962.
- Murakami, M.T., Arruda, E.Z., Melo, P.A., Martínez, A.B., Calil-Elias, S., Tomaz, M.A., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Arni, R.K., 2005. Inhibition of myotoxic activity of *Bothrops asper* myotoxin II by the anti-trypanosomal drug suramin. *J. Mol. Biol.* 350, 416–426.
- Murshudov, G.N., Vagin, A.A., Dodson, E.J., 1997. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. Sect. D* 53, 240–255.
- Navaza, J., 1994. AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Crystallogr. A* 50, 157–163.
- Ownby, C.L., Selistre de Araujo, H.S., White, S.P., Fletcher, J.E., 1999. Lysine 49 phospholipase A<sub>2</sub> proteins. *Toxicon* 37, 441–445.
- Otwinowski, Z., Minor, W., 1997. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* 276, 307–326.
- Semenyuk, A.V., Svergun, D.I., 1991. Gnom—a program package for small-angle scattering data-processing. *J. Appl. Crystallogr.* 24, 537–540.
- Spencer, P.J., Aird, S.D., Boni-Mitake, M., Nascimento, N., Rogero, J.R., 1998. A single-step purification of bothropstoxin-I. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31, 1125–1127.
- Svergun, D.I., 1999. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophys. J.* 76, 2879–2886.
- Svergun, D.I., Barberato, C., Koch, M.H., 1995. Crysol—a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *J. Appl. Crystallogr.* 28, 768–773.
- van Oosterom, A.T., ten Bokkel Huinink, W.W., van der Burg, M.E., Vermorken, J.B., Willemse, P.H., Neijt, J.P., 1991. Phase II clinical trial of doxifluridine in patients with advanced ovarian cancer. *Eur. J. Cancer* 27, 747–749.
- Ward, R.J., de Azevedo, W.F., Arni, R.K., 1998. At the interface: crystal structures of phospholipases A<sub>2</sub>. *Toxicon* 36, 1623–1633.
- Watanabe, L., Soares, A.M., Ward, R.J., Fontes, M.R., Arni, R.K., 2005. Structural insights for fatty acid binding in a Lys49-phospholipase A<sub>2</sub>: crystal structure of myotoxin II from *Bothrops moojeni* complexed with stearic acid. *Biochimie* 87, 161–167.
- Williamson, J., Desowitz, R.S., 1956. Prophylactic activity of suramin complexes in animal trypanosomiasis. *Nature* 177, 1074–1075.