Fábio Renato Lombardi

Cristalização e Determinação da Estrutura Terciária da Miotoxina II, Uma Proteína Homóloga à Fosfolipase A_2, Purificada do Veneno de Bothrops Moojeni

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP.

Fábio Renato Lombardi

CRISTALIZAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA TERCIÁRIA DA MIOTOXINA II, UMA PROTEÍNA HOMÓLOGA À FOSFOLIPASE A_2, PURIFICADA DO VENENO DE *BOTHROPS MOOJENI*.

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Física, Área de Concentração em Biofísica Molecular. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP.

Inst. de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
BIBLIOTECA
S. J. Rio Preto
823/98

ORIENTADOR: PROF. DR. R. K. ARNI

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. RICHARD J. WARD

São José do Rio Preto - SP

1998

unesp

DEDICO ESTE TRABALHO AOS MEUS PAIS, ANTÔNIO E CLEONICE, ÀS MINHAS IRMÃS, MÁRCIA, HELOISA E DENIZE E À MINHA NOIVA, LUCIANA. QUERO AGRADECER A VOCÊS PELA COMPREENSÃO E AJUDA DURANTE O MEU MESTRADO.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor R. K. Arni pela orientação.

Ao Professor Doutor Richard J. Ward, pela co-orientação e pelo uso facilitado de seu laboratório.

Ao Professor Doutor Marcos R. M. Fontes pela ajuda na coleta de dados.

Ao Professor Doutor Walter F. de Azevedo Jr. pelo apoio e incentivo durante a realização de parte deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Física, pelos ensinamentos transmitidos e pelo ambiente harmonioso.

Aos meus colegas de pós-graduação pelo companheirismo durante todo o tempo: Adriana, Alexandre, Alexandre Guerzoni, Alexandre Teso, André, Benatti, Bernadete, Cecília, Dulcinéia, Fábio, Fátima, Flávio, Giovanni, Gláucia, Jennifer, João Ricardo, Leandra, Milton, Murilo, Norma, Ocimar, Osmar, Raquel, Renato, Sandra, Selma e Uderlei.

Aos amigos André, Fátima, Fernanda, Gláucia, Leandra e Raquel, mais uma vez, agradeço pela amizade, carinho e pelo companherismo.

Aos funcionários Ilva, Paulo Salinas, Antônio Barbosa, Aparecida Mansur, Toninha, e D. Zezé pela assessoria necessária à realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor José R. Giglio e ao aluno Andreimar Martins Soares que nos cedeu a amostra de proteína, proporcionando o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais, Antônio e Cleonice, que com muito sacrifício e luta me ajudaram a chegar à pós-graduação.

Às minhas irmãs, Denise, Heloisa, Márcia e ao Manoel, que sempre torceram por mim.

À Profa. Dra. Eleni Gomes, minha primeira orientadora, que muito me ensinou.

À minha noiva, Luciana, pelo amor, compreensão, incentivo durante todo tempo.

À fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por financiar este trabalho

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

LISTA DE ABREVIAÇÕES

PLA_2 - Fosfolipase A_2

MjTX-II - Miotoxina II de *Bothrops moojeni*

BthTX-I - Miotoxina I de *Bothrops jararacussu*

PrTX-I - Miotoxina I de *Bothrops pirajai*

BaspTX-II - Miotoxina II de *Bothrops asper*

GodTX-II - Miotoxina II de *Bothrops* (Cerrophidion) *godmani*

NumTX-I - Miotoxina I de *Bothrops nummifer*

Najna - *Naja naja naja*

Najat - *Naja naja atra*

AgkPi - *Agkistrodon piscivorus piscivorus*

PEG - Polietilenoglicol

HEPES - Ácido(N-[2-Hidroxietil]piperazina-N-[2-Etanosulfônico])

SDS - Dodecilsulfato de sódio

DiC_8(2Ph)PE - *L*-1-*O*-octil-2-heptilfosfonil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

ÍNDICE

RESUMO	I
ABSTRACT	II
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Fosfolipases A_2	1
1.2. Mecanismo Catalítico e Sítio Ativo	4
1.3. A Molécula de Fosfolipase A_2	7
1.4. N-Terminal	8
1.5. Canal Hidrofóbico	10
1.6. Alça de Ligação do Cálcio	10
1.7. Região da Asa β	12
1.8. C-Terminal	14
2.0. Homólogo de Fosfolipase A_2	15
3. OBJETIVOS	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1. Amostra de Miotoxina II de *Bothrops moojeni*	18
4.2. Cristalização	19
4.3. O Método de Difusão de Vapor (Sistema Hanging drop)	21
4.4. Fatores que Influenciam na Cristalização	23
4.5. Montagem do Cristal	26
4.6. Coleta de Dados	28

4.6.1. Descrição do Difratômetro 28
4.6.1.1. Ânodo Rotatório 30
4.6.1.2. Colimadores e Monocromadores do feixe de Raios X 31
4.6.1.3. Câmara de Oscilação 32
4.6.1.4. Placa de Imagem (IP) 35
4.6.2. Índice dos Planos Atômicos em um Cristal 36
4.6.3. As Condições que Produzem Difração: A Lei de Bragg 38
4.6.4. O Número de Reflexões Mensuráveis 39
4.6.5. Fatores que Afetam a Coleta de Dados de difração de raios X 40
4.6.5.1. Mosaicidade 40
4.6.5.2. Danos por Radiação 41
4.6. Processamento Computacional das Imagens Usando o R-AXIS IV 42
4.7. Alinhamento do Cristal 43
4.8. Coleta e Processamento das Imagens Still 44
4.9. Coleta e Processamento das Imagens de Oscilação 46
4.10. Escalonamento das Imagens 49
4.11. O Método de Substituição Molecular 50
4.12. Análises Computacionais 54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 55
5.1. Verificação da Pureza da Amostra 55
5.2. Cristais da MjTX-II 56
5.2.1. Obtenção dos Cristais de MjTX-II 56
5.3. Resolução e Refinamento da Estrutura 59
5.4. Análise da Estrutura 61



5.5. Análise da Sequência Primária e da Estrtura Tridimensional

das Fosfolipases A_2 71

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS 79

7. BIBLIOGRAFIA 82

Curriculum vitae

Lista de Publicações

Anexo 1: Condições de Cristalização

Anexo 2: Primeira publicação

Anexo 3: Segunda publicação

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática de um fosfolipídeo indicando as ligações hidrolisadas pelas diferentes fosfolipases.	**1**
Figura 2 -	Mecanismo catalítico da fosfolipase A_2.	**6**
Figura 3 -	Representação esquemática da Miotoxina II da *Bothrops moojeni*.	**8**
Figura 4 -	Representação esquemática da alça de ligação de uma homóloga de fosfolipase A_2 (MjTX-II) e uma fosfolipase A_2 Asp49.	**12**
Figura 5 -	Representação esquemática de um diagrama de solubilidade de uma proteína.	**20**
Figura 6 -	Esquema do modelo de difusão de vapor "hanging drop".	**22**
Figura 7 -	Representação esquemática da montagem de um cristal.	**28**
Figura 8 -	Representação esquemática de um ânodo rotatório.	**31**
Figura 9 -	Índices das faces em uma unidade de cela.	**37**
Figura 10 -	Representação esquemática da Lei de Bragg.	**38**
Figura 11 -	Representação esquemática da esfera de Ewald.	**39**
Figura 12 -	Perfil para integração das reflexões.	**49**
Figura 13 -	Gel SDS-PAGE 17% da amostra de Miotoxina II de *B. moojeni*.	**56**
Figura 14 -	Cristais de Miotoxina II de *B. moojeni*.	**58**
Figura 15 -	Gráfico de Ramachandran	**62**
Figura 16 -	Diagrama estéreo da densidade eletrônica das regiões da interface dos monômeros da MjTX-II.	**63**
Figura 17 -	Representação esquemática da estrutura dimérica da MjTX-II.	**67**
Figura 18 -	Gráficos com as distâncias entre carbonos alfa de diferentes homólogas de fosfolipases A_2.	**70**

unesp

Figura 19 - Sobreposição dos carbonos alfa dos monômeros de MjTX-II e BthTX-I. **71**

Figura 20 - Alinhamento das sequências primárias das fosfolipases A_2. **74**

Figura 21 - Sobreposição dos carbonos alfa das hélices 2 e 3 das fosfolipases A_2 do pâncreas porcino e do veneno de *Apis melifera*. **75**

Figura 22 - Distribuição das pontes de dissulfeto nas fosfolipases A_2 das Classes I e II. **77**

Figura 23 - Sobreposição dos carbonos alfa da MjTX-II e da fosfolipase A_2 bovina, com os resíduos do sítio catalítico. **78**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estatística da coleta de dados e do refinamento. **60**

Tabela 2 - Distâncias das ligações de hidrogênio entre os monômeros A e B de diferentes homólogas de fosfolipases A_2. **68**

Tabela 3 - Comparação da sequência primária da MjTX-II com fosfolipases A_2 das Classes I, II e III. **75**

RESUMO

A estrutra tridimensional da Miotoxina II (MjTX-II), homóloga à fosfolipase A_2, purificada do veneno de *Bothrops moojeni* foi determinada e refinada a 2.0Å para um residual cristalográfico de 19.7% (R_{free}=28.1%). A MjTX-II é um dímero, com os monômeros na unidade assimétrica correlacionados por um eixo de simetria de ordem dois. Os dímeros da MjTX-II e da homóloga de fosfolipase A_2 de *B. asper* são similares, no entanto, as orientações relativas dos monômeros sugerem uma interface dimérica bastante flexível, que pode servir como um hinge entre as duas moléculas.

ABSTRACT

The crystal structure of Myotoxin-II (MjTX-II), a Lys49 PLA_2-homologue from *Bothrops moojeni* venom has been determined and refined at 2.0Å to a crystallographic residual of 19.7% (R_{free} = 28.1%). MjTX-II is a dimer in the crystal, with the monomers in the asymmetric unit related by a two-fold symmetry axis running through the dimer interface. The dimers of MjTX-II and the Lys49 PLA_2 from B. asper venom are similar, however the relative orientations of the monomers suggests a flexible dimer interface, which can serve as a hinge between the two molecules.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fosfolipases A_2

As fosfolipases são enzimas que hidrolisam fosfolipídeos, liberando lisofosfolipídeos e ácidos graxos livres. Existem quatro classes enzimáticas de fosfolipases, são elas: A_1, A_2, C e D, as quais se diferenciam por atuar em locais diferentes na molécula de fosfolipídeo, como é ilustrado na figura 1.

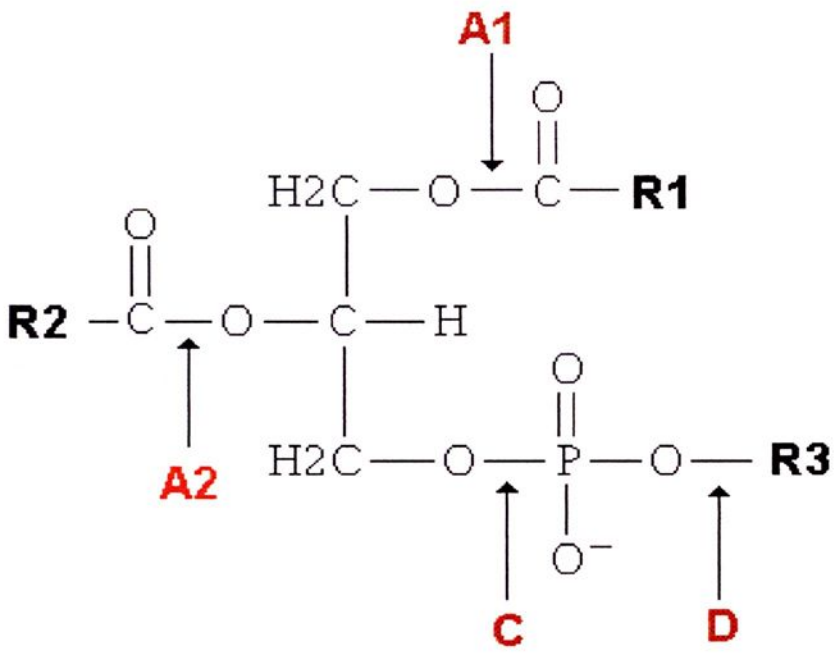


Figura 1- Representação esquemática de um fosfolipídeo. **R1** e **R2** referem-se às cadeias de ácidos graxos, **R3** refere-se a uma molécula, por exemplo um aminoálcool. As flechas indicam os pontos de hidrólise pelas diferentes fosfolipases.

Entre as serpentes venenosas do Brasil, as do gênero *Bothrops* representam um grupo de grande interesse científico e medicinal, já que são responsáveis por 90% dos acidentes ofídicos que ocorrem no país (Rosenfeld, 1971).

Os venenos de *Bothrops* contêm toxinas ativas, das quais um importante grupo são as fosfolipases A_2 (E.C.3.1.1.4). Além da função catalítica, as fosfolipases A_2 possuem atividades farmacológicas secundárias que incluem: neurotoxicidade, miotoxicidade, iniciação e/ou inibição de agregação plaquetária, efeito anticoagulante, hemorrágico, cardiotóxico, entre outros (Kini & Evans, 1989).

Historicamente, as fosfolipases A_2 foram divididas em dois grupos: intracelulares e extracelulares. As fosfolipases A_2 intracelulares foram isoladas do fígado de rato e plaqueta humana. São enzimas de alto massa molecular (85 KDa), estão localizadas no citosol das células e requerem cálcio para atividade catalítica. As fosfolipases A_2 extracelulares são proteínas pequenas (14-15 KDa), encontradas em venenos de insetos, serpentes e pâncreas de mamíferos e requerem cálcio para atividade catalítica. Mais recentemente, este sistema de classificação sofreu mudanças (Dennis, 1994), com o descobrimento de fosfolipases A_2 intracelulares pequenas e de fosfolipases A_2 extracelulares com ação independente de cálcio. As fosfolipases A_2, com

unesp

baixa massa molecular, são divididas em três classes, segundo os critérios de sequência primária e localização das pontes de dissulfeto.

São membros da classe I, as fosfolipases A_2 do veneno de *Elapidae*, *Hidrophidae* e do pâncreas de mamíferos. Os representantes da classe II são as enzimas do veneno das serpentes das famílias *Viperidae*, *Crotalidae* e de outros tecidos de mamíferos (por exemplo, plaquetas e do fluido sinovial humano). Os representantes da classe III são encontrados nos venenos de insetos e répteis (Dennis,1994).

Recentemente, foi descrita a existência de uma fosfolipase A_2 citosólica do miocárdio canino. Esta enzima não requer cálcio para atividade catalítica, mas hidrolisa fosfolipídeos. Sua sequência não foi determinada, mas estima-se que sua massa molecular esteja em torno de 40 kD. Esta fosfolipase A_2 intracelular cálcio independente parece ser distinta das fosfolipases A_2 da classe IV (Dennis,1994). Se a sequência primária comprovar esta hipótese será necessário classificá-la em um novo grupo (Wolf *et al.*,1985; Hazen *et al.*,1990).

1.4. Mecanismo Catalítico e Sítio Ativo

A ação catalítica das fosfolipases A_2 se dá na posição *sn-2* ("sequentially numbered"), na presença do cofator cálcio (Ca^{2+}) (Dennis,1983), mostrando maior atividade em micelas, membranas agregadas e na interface lipídeo-água (Ramirez e Jain,1991; Jain *et al.*,1995), do que em fosfolipídeos livres em solução.

Após vários estudos envolvendo modificações estruturais e químicos, um mecanismo semelhante ao sistema de revezamento de prótons das serina proteases foi proposto, onde temos o trio catalítico constituído pela His48, Asp99 e uma molécula de água (Scott *et al.*,1990).

A figura 2 ilustra os resíduos do sítio catalítico e o análogo de fosfolipídeo (diC_8(2Ph)PE). É proposto neste mecanismo que os resíduos Tyr52 e Tyr73 possuem a função de estabilizar o resíduo Asp99 (Dupureur *et al.*, 1992), que através do seu grupamento COO^-, estabiliza o anel imidazólico da His48 que fica com carga positiva no estado de transição. Os oxigênios, Oδ1 e Oδ2, do resíduo Asp49, o oxigênio da carbonila do resíduo de Gly30, além do oxigênio do grupamento fosfato, coordenam o cofator cálcio, que irá estabilizar o oxiânion no estado intermediário, além de proporcionar uma melhor orientação do fosfolipídeo.

unesp

A catálise inicia quando o fosfolipídeo entra no sítio catalítico expulsando as duas moléculas de água que coordenam o cofator cálcio na ausência do substrato. Em seguida, o nitrogênio delta da His48 (Nδ1) retira um próton de uma molécula de água, formando uma hidroxila, que irá desestabilizar a dupla ligação do carbono da carbonila, formando um estado de transição tetraédrico. Nesta etapa, o anel imidazólico da His48 fica com carga positiva e é estabilizado pelo grupamento COO^- do Asp99. A ligação carbono-oxigênio da carbonila torna-se uma ligação simples e o átomo de oxigênio adquire carga negativa, tornando-se oxiânion (figura 2.b). O íon cálcio e o NH da Gly30 estabilizam o oxiânion, promovendo melhor orientação do fosfolipídeo no estado intermediário. Finalmente, a His48 doa o próton a ligação susceptível, que é hidrolisada, formando assim ácidos graxos livres e lisofosfolipídeos. Os produtos são liberados e três moléculas de água entram no sítio ativo completando o ciclo.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

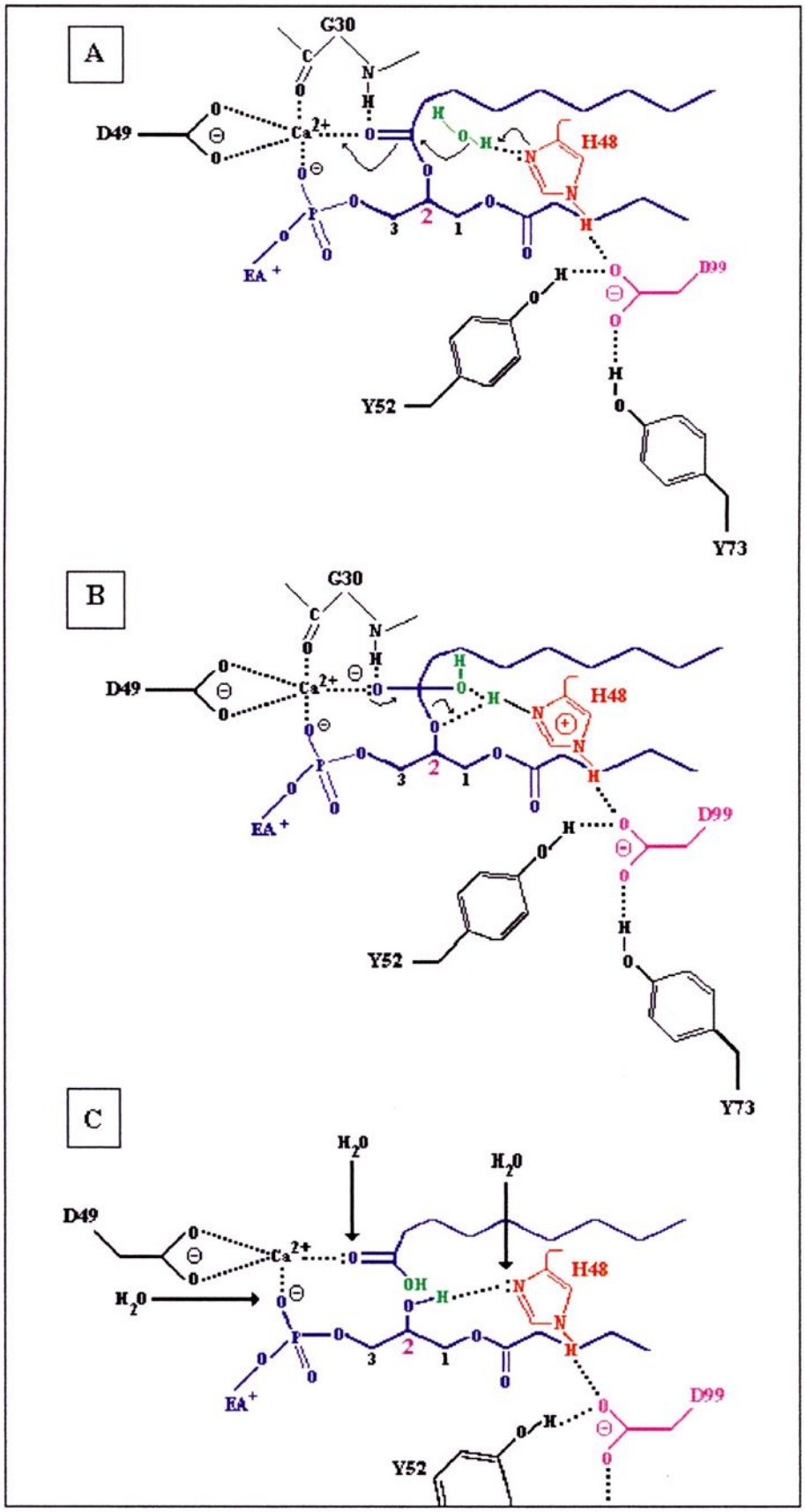


Figura 2- Mecanismo catalítico da fosfolipase A_2, adaptado de Scott *et al.*, 1992.

1.2. A Molécula de Fosfolipase A_2

Usando o sistema de numeração proposto por Renetseder *et al.*, 1985, o N-terminal das fosfolipases é constituído por uma α-hélice, denominada hélice I (resíduos 1-12). Segue-se ao N-terminal uma hélice curta (resíduos 16-22), cuja função ainda não está bem esclarecida. Após a hélice curta, há a alça de ligação do íon Ca^{2+} (resíduos 25-33). Posteriormente, encontra-se outro segmento em hélice, denominado hélice II (resíduos 40-55). A hélice II é ligada por uma curta folha β anti-paralela, referida como Asa-β (resíduos 75-85), a hélice III (resíduos 90-107). Este último segmento, juntamente com a hélice II, possuem os resíduos de aminoácidos que formam o sítio catalítico (Dijkstra *et al.*,1978). Após a hélice III, está a região C-terminal, formada pelos resíduos 108-133, que se supõe estar relacionada com as atividades citolíticas destas moléculas (Lomonte *et al.*,1994e).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

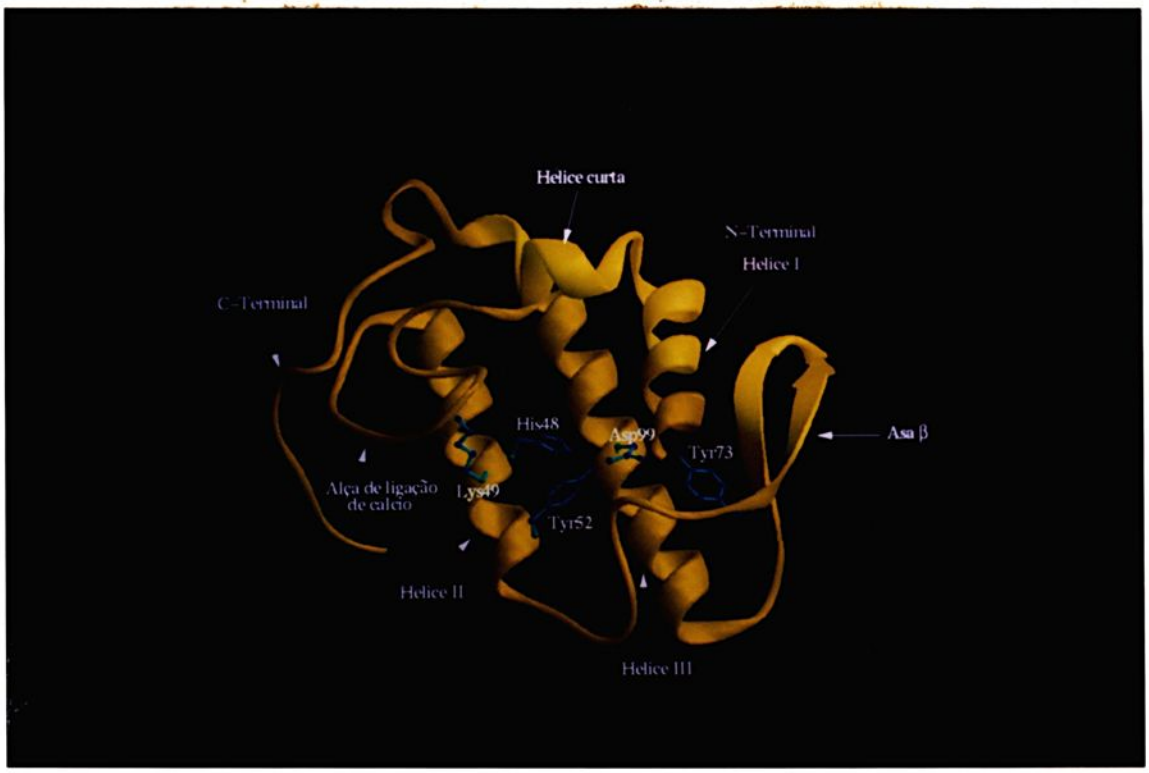


Figura 3- Representação esquemática da estrutura da MjTX-II, ilustrando as características estruturais da molécula e os resíduos do sítio ativo.

1.3. N-Terminal

Os resíduos do N-terminal (hélice1-figura 3) desempenham uma importante função nas fosfolipases A_2, visto que contribuem para formação do canal hidrofóbico destas enzimas. Os aminoácidos hidrofóbicos do interior da hélice estão altamente conservados (Dijkstra *et al.*,1981). Inserções ou deleções desta região eliminam a atividade catalítica destas enzimas (Maliwal *et al.*,1994).

Diccianni *et al.*, (1990) estudando duas isoformas de fosfolipases A_2 do pâncreas de porco, sugerem que a região do N-

terminal liga-se à heparina, como conseqüência da presença de alguns resíduos carregados positivamente. Estes resultados foram confirmados devido à mudança na fluorescência do Trp3 da isoforma maior da fosfolipase A_2 do pâncreas de porco (Diccianni *et al.*,1991). Kilby *et al.*, (1995) mostraram que há uma mudança na fluorescência do Trp3, quando foram realizados ensaios da fosfolipase A_2 do pâncreas bovino com SDS. Estes resultados indicam que esta região está envolvida na ligação do substrato, além de mostrar a sua preferência por substratos aniônicos.

Liu *et al.*, 1995 investigaram a relevância de alguns resíduos de aminoácidos da região N-terminal nas propriedades estruturais e funcionais de fosfolipase A_2 do pâncreas bovino.

1.5. Canal Hidrofóbico

Através dos estudos das estruturas cristalográficas de fosfolipases A2 foi identificado um canal hidrofóbico (Wery *et al.*,1991), o qual tem a função de facilitar a ligação da cadeia hidrofóbica do fosfolipídeo no sítio catalítico (Dennis,1994).

Os resíduos da hélice I (Leu2, Phe5, Ile9) formam uma das paredes do canal hidrofóbico. Outros resíduos de aminoácidos

contribuem para a formação deste canal: (1) resíduo 19, localizado na hélice curta, (2) resíduo 31, localizado na alça de ligação do cálcio e (3) resíduo 69, situado na primeira cadeia da folha β (Arni & Ward,1996).

Os resíduos de aminoácidos Ala104 e Phe106, também contribuem para formação deste canal altamente conservado (Dupureur *et al.*,1992).

Os resíduos de aminoácidos Phe5 e Ile9 são essenciais para a atividade catalítica destas enzimas, já que fazem parte do canal hidrofóbico e exercem a função de ligação e orientação do substrato no estado de transição. Mutações destes resíduos revelam uma redução drástica na atividade catalítica das fosfolipase A_2 do pâncreas bovino.

1.6. Alça de Ligação do Cálcio

Como dito anteriormente, as fosfolipases A_2 precisam do íon cálcio para sua atividade enzimática. Sua substituição por outros íons bivalentes tais como, bário ou câdmio, resulta na perda da atividade enzimática, como conseqüência há uma diminuição da atividade catalítica de 1840 U/mg para 1.6 U/mg, (van den Berg *et al.*,1989) (Yu *et al.*,1993).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

O íon cálcio é hepta-coordenado pelos oxigênios da carbonila dos resíduos de aminoácidos Tyr28, Gly30, Gly32, e pelos oxigênios da carboxila (Oδ1 e Oδ2) do Asp49, além de duas moléculas de água também contribuírem nesta coordenação (Fremont *et al.*,1992; Arni *et al.*,1995). A função do íon cálcio é a estabilização do estado intermediário tetraédrico (van den Berg *et al.*,1988).

Uma substituição conservativa de Asp49 - Glu49 resulta em um decréscimo na afinidade por cálcio,. Além disso, mutantes com Ala, Asn, Gln e Lys nesta posição, não demonstram capacidade para ligar Ca^{2+} (Li *et al.*,1994).

Existem na natureza enzimas homólogas à fosfolipases A_2, onde o Asp 49 está substituído por um resíduo de Lys (Maraganore *et al.*,1984; Francis *et al.*,1991; Homsi-Brandenburgo *et al.*,1988; Ward *et al.*,1995). São enzimas que não apresentam atividade catalítica, mas que danificam membranas por um mecanismo não conhecido (Rufini *et al.*,1991). Arni *et al.*, (1995) propuseram que a falta de atividade catalítica é devido à localização do Nξ da cadeia lateral da lisina (Figura 4), que ocupa a posição do co-fator Ca^{2+} na alça de ligação.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

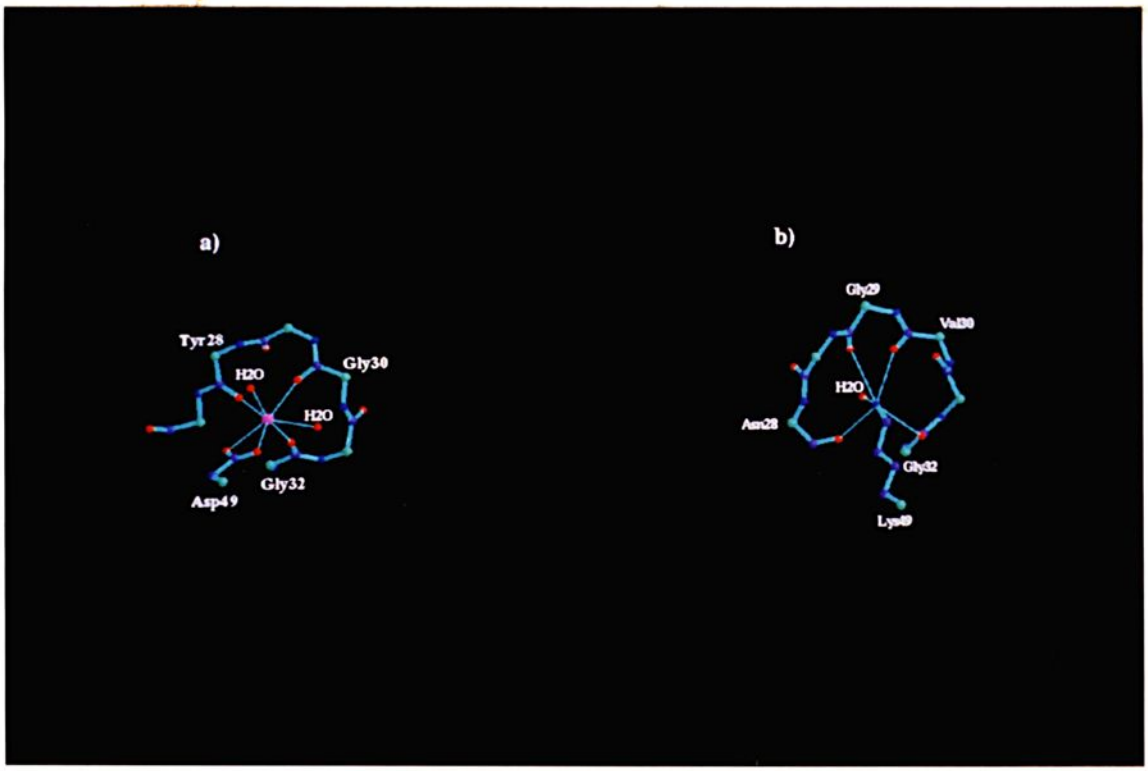


Figura 4- Representação esquemática da alça de ligação do íon cálcio: a) Fosfolipase A_2 de pâncreas bovino cataliticamente ativa; o íon cálcio está coordenado por duas ligações com os átomos de oxigênios carboxílicos do Asp49, três ligações com os oxigênios da cadeia principal, além de duas moléculas de água. b) miotoxina II Lys49 de *Bothrops moojeni*, mostrando o Nξ da Lys49 ocupando a posição do íon cálcio, formando três ligações com os átomos de oxigênio carbonil da Asn28, Gly29, Val30, Gly32 e uma molécula de água.

1.7. Região da Asa-β

Estruturas cristalográficas de fosfolipases A_2 que foram determinadas, apresentam-se como monômeros (Holland *et al.*,1990; Scott *et al.*,1992), dímeros (Brunie *et al.*,1985; Arni *et al.*,1995, de Azevedo *et al.*, 1997a; de Azevedo *et al.*, 1997b) e trímeros (Fremont *et al.*,1993). A fosfolipase A_2 de *Crotalus atrox* apresenta-se como dímero

no estado cristalino. No entanto, provavelmente, não é um dímero funcional, pois os resíduos do sítio catalítico não têm acesso ao solvente. Uma mudança conformacional foi proposta para explicar a atividade enzimática do complexo (Brunie *et al.*,1985). Outra forma de dímero é apresentada na estrutura da miotoxina II do veneno de *Bothrops asper*. As regiões da asa-β e do N-terminal seriam as responsáveis pelo contato entre as subunidades e, desta forma, os resíduos do sítio catalítico ficariam expostos ao solvente (Arni *et al.*,1995), ao contrário do dímero apresentado na estrutura da *Crotalus atrox* (Brunie *et al.*, 1985). Mais recentemente, cristalizou-se a BthTX-I em duas formas cristalinas diferentes, onde observou-se uma forma "aberta" e uma "fechada". A diferença angular na interface dimérica é de 23°. Este ângulo é formado na interface do dímero (fim do N-terminal e extremidade da Asa-β) e é determinado pela movimentação dos dois monômeros. Está diferença está relacionada com uma reorientação dos resíduos Trp 77 e Lys 80, localizados na Asa-β. Com o intuito de estabelecer se as formas "aberta" e "fechada" podem estar presentes em solução, foram realizados experimentos espectrofluoriométricos. Com experimentos onde se aumentava a viscosidade da solução notou-se diferenças na emisssão intrínsica do Trp 77, o que sugere duas formas em solução. Os resultados destes experimentos sugerem também que o aumento da

unesp

viscosidade favorece a conformação "fechada" (da Silva Giotto *et al.*, 1997).

1.8. C-Terminal

Na região C-terminal da molécula há muita variação entre as fosfolipases A_2 isoladas de diferentes fontes, quanto a composição de aminoácidos. Nas homólogas de fosfolipases A_2 Lys49 esta região é rica em resíduos de lisina (Selistre de Araújo *et al.*,1996).

Estudos de modelagem molecular da interação entre heparina e miotoxina II de *Bothrops asper*, mostram que a heparina inibe a ação da miotoxina II, ligando-se diretamente na região do C-terminal (Lomonte *et. al.*,1994c). Estudos de neutralização utilizando heparina e miotoxina III, a qual possui atividade miotóxica e enzimática, têm confirmado a dissociação destas atividades, já que a atividade miotóxica foi inibida, ao passo que a atividade fosfolipásica permanece conservada.(Lomonte *et al.*,1994c). Isto está de acordo com a hipótese da existência de um sítio miotóxico distinto ao sítio catalítico (Gutiérrez & Lomonte,1995).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

2.0 Homólogas de Fosfolipases A_2

O envenenamento provocado por serpentes do gênero *Bothrops*, caracteriza-se por induzir estado de choque, atividade proteolítica, alterações cardiovasculares e liberar substâncias farmacologicamente ativas (Rosenfeld,1971). Essas alterações são devidas a efeitos aditivos ou sinérgicos das diferentes toxinas e enzimas como fosfolipases A_2, miotoxinas, hemorraginas e diversas proteases presentes nos venenos de serpentes (Gutiérrez and Lomonte,1989; Sanchez *et al.*,1992).

A necrose muscular ou mionecrose pode ser devido a ação direta de miotoxinas ou fosfolipases A_2 miotóxicas sobre as membranas plasmáticas de células musculares, ou indireta, como conseqüência de degenerações vasculares e isquemia, causadas por hemorraginas. As miotoxinas agiriam ao nível da membrana sarcoplasmática, induzindo uma desorganização dos componentes fosfolipídicos que permitiriam a saída de moléculas intracelulares, como a creatina e creatina-cinase (Gutiérrez *et al.*,1989,1991; Diaz *et al.*,1992). A mionecrose é um efeito local relevante, podendo levar a perda permanente do tecido e da habilidade, requerendo amputação do membro atingido (Rosenfeld,1971).

unesp

Nos últimos anos, houve uma crescente ascenção no estudo dos componentes do veneno responsáveis pela mionecrose e seu modo de ação, resultando no isolamento e na caracterização de diversas miotoxinas botrópicas.

Maraganore *et al.*, (1984) purificaram e identificaram uma fosfolipase A_2 do veneno de *Agkistrodon piscivorus piscivorus*, que possui uma mutação na posição 49, onde um resíduo de ácido aspártico está substituído por um resíduo de lisina. Através de mutagênese sítio-dirigida, utilizando a fosfolipase A_2 do pâncreas de porco, substituiu o resíduo Asp49 para Lys49, o resultado foi a eliminação total da atividade catalítica (van den Berg, 1989). Outra mutação foi encontrada na enzima de *Vipera ammodytes*, onde o resíduo Asp49 estava substituído por Ser49 (Krizaj *et al.*,1991).

Outras fosfolipases A_2 com a substituição Asp49 para Lys49 foram descobertas e, atualmente, existe um grande interesse em elucidar a base molecular de ação destas enzimas, já que elas causam danos à membrana das células, por um mecanismo independente de cálcio, ou seja, sem hidrolisar fosfolipídeos.

unesp

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi cristalizar, coletar os dados de difração de raios X e determinar a estrutura tridimensional da Miotoxina II de *Bothrops moojeni*, a fim de determinar as diferenças estruturais entre as Homólogas de fosfolipases A_2 diméricas.

unesp

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostra de Miotoxina II de *Bothrops moojeni*

A amostra de Miotoxina II de *B. moojeni* foi purificada e cedida pelo Prof. Dr. J. R. Giglio e pelo aluno de Doutorado Andreimar M. Soares do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

O veneno bruto (200 mg) de *B. moojeni* foi dissolvido em bicarbonato de amônio 0.05M (pH 8) e a suspensão centrifugada. Após a centrifugação obteve-se um sobrenadante amarelo límpido, o qual foi aplicado em uma coluna de troca iônica (CM-Sepharose). A eluição foi realizada com o mesmo tampão, seguindo um gradiente linear de bicarbonato de amônio de 0.05 a 0.5 M. Desta cromatografia foram obtidas nove frações, sendo que a última fração eluída é a Miotoxina II, que é a proteína de nosso interesse. A pureza da amostra foi verificada em gel SDS-PAGE, o resultado deste gel será discutido no item RESULTADOS.

unesp

4.2. Cristalização

Biocristalografia é a aplicação das técnicas de difração de raios X para cristais de macromoléculas biológicas. O uso desta técnica, juntamente com estudos bioquímicos, têm contribuído imensamente para esclarecer a base molecular da atividade biológica destas macromoléculas (Blundell & Johnson,1976).

Para se determinar a estrutura tridimensional de uma determinada macromolécula por técnicas de difração de raios X, é essencial obter-se monocristais de tamanho apropriado para a coleta de dados de difração de raios X. Como o número de variáveis envolvidas no processo de cristalização é muito grande (como concentração de sal, temperatura, pH, agentes precipitantes e aditivos) encontrar as condições ideais de cristalização de uma macromolécula pode levar dias, meses ou até anos (Blundell & Johnson,1976).

Para cristalizar uma macromolécula em um determinado solvente, é necessário levá-la lentamente a um estado de supersaturação. A figura 5 mostra um diagrama de fase, que ilustra as fases deste processo.

unesp



Figura 5- Representação esquemática de um diagrama de solubilidade, ilustrando as regiões de variação da solubilidade de uma proteína, quando a concentração do agente cristalizante é alterada.

A curva de solubilidade divide as regiões de baixa saturação e de supersaturação (figura 5). Na região de baixa saturação, a macromolécula não cristalizará. Acima da linha escura está a região de supersaturação, que é dividida em três zonas: (1) zona metaestável (área alaranjada), (2) zona de nucleação (área azul)e (3) zona de precipitação (área verde). Quando a supersaturação é alcançada rapidamente a proteína em solução precipita (zona de precipitação). No entanto, quando a supersaturação é alcançada lentamente a solução de proteína alcança a zona de nucleação, onde se formarão os núcleos (primeiros agregados ordenados de proteína). Conforme a solubilidade da proteína diminui, estes núcleos atingem a zona metaestável, onde ocorrerá o crescimento do cristal, o qual será interrompido quando ocorrer falhas na deposição das moléculas ao longo do cristal (Ducruix & Giegé,1992).

unesp

Jancarik and Kim (1991) propuseram um conjunto de soluções, nas quais se considera a interação entre diferentes variáveis, derivadas de condições conhecidas de cristalização de diversas proteínas.

Existem, basicamente, quatro métodos que são utilizados para a cristalização de macromoléculas: 1- Diálise, 2- Interface de Difusão Livre, 3- "Batch" e 4- Difusão de Vapor. Sendo que, este último é dividido em três sistemas, são eles: *hanging drop*, *sitting drop* e *sandwich drop*. Neste trabalho foi utilizado o método de Difusão de Vapor, sistema ***hanging drop***, o qual será discutido a seguir.

4.3. O Método de Difusão de Vapor (Sistema *Hanging drop*)

O método de difusão de vapor, sistema *hanging-drop*, utilizado neste trabalho, consiste de uma pequena gota da amostra de proteína (1μl) misturada com solução de cristalização (1μl), suspensa em uma lamínula siliconizada que é colocada em equilíbrio de vapor com um grande reservatório (1ml) com solução de cristalização. Mudanças de vapor ocorrem entre o reservatório e a gota até o equilíbrio entre estas soluções ser alcançado (Blundell & Johnson,1976) (figura 6).

unesp

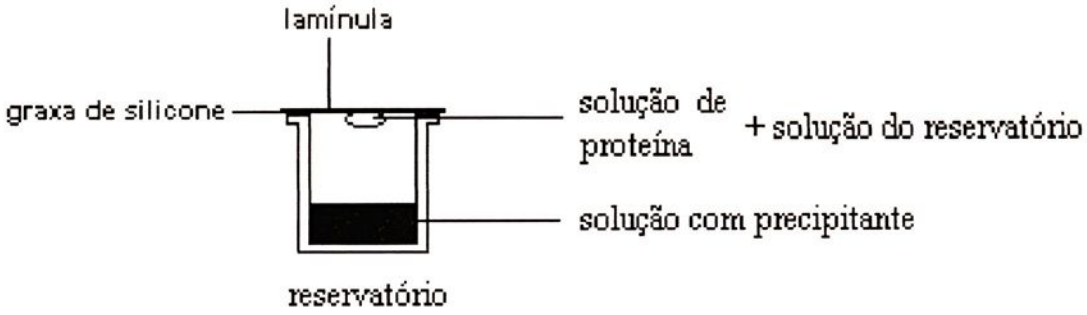


Figura 6- Esquema do modelo de difusão de vapor "hanging-drop".

O estoque de proteína utilizada apresenta concentração em torno de 5 a 20 mg/ml com 0.04% NaN_3 (Azida; anti-fungicida). Essa amostra é dissolvida em tampão com baixa força iônica (*salting-in*) que favorece a sua solubilidade.

Os reservatórios são distribuídos em placas de cristalização (Linbro plate), vedados com graxa e lamínulas. As lamínulas são siliconizadas para aumentar a força adesiva que suspende a gota (hanging-drop).

Utilizando o conjunto fatorial de Jancarik e Kim (1991) preparados em nosso laboratório (Anexo 1), é dado início aos experimentos de cristalização. O protocolo destas soluções é uma combinação de três agentes: sais, que blindam as cargas da macromolécula; tampão, que proporciona diferentes faixas de pH e precipitante, responsável pela supersaturação e, consequentemente

formação de cristais ou precipitado amorfo. Estas soluções são filtradas e acrescenta-se NaN_3, que evitam partículas indesejáveis e crescimento de fungos.

A difusão de vapor entre o reservatório e a gota ocorre devido a diferença de concentração (~50%), já que na gota acrescenta-se uma proporção 1:1 de amostra de proteína e solução de cristalização. Essas trocas ocorrem até que o equilíbrio seja alcançado, podendo ou não ter a formação de cristais. Alguns refinamentos destas soluções são feitos para atingir este objetivo, tais como: pequenas variações de pH, mudanças na concentração do agente precipitante, alteração da força iônica, e até mesmo variações de temperatura e acréscimo de aditivos (inibidores, substratos, cofatores e detergentes).

4.4. Fatores que Influenciam na Cristalização

A solubilidade de qualquer molécula depende da interação desta com o solvente e, é essencialmente definida pelas características do solvente, tais como pH, temperatura, sais, compostos orgânicos e aditivos. No caso de soluções super saturadas, onde não há moléculas de água suficientes para manter a hidratação, as moléculas podem se agregar como um precipitado amorfo ou, então, formar cristais. Sendo

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

assim, a capacidade de um composto se cristalizar está relacionada com o estado de supersaturação da solução (Blundell, 1982). Os fatores que influenciam na solubilidade das proteínas são:

1) FORÇA IÔNICA: Os sais podem diminuir ou aumentar a solubilidade de uma proteína. O efeito dos sais no sentido de aumentar a solubilidade das proteínas é denominado efeito de solubilização por sais (*Salting-in*). A solubilidade é uma função da força iônica, que é calculada a partir das concentrações molares dos íons e suas cargas, utilizando-se a seguinte expressão:

$$\mu = 1/2 \sum ci\ Zi^2 \qquad \text{Eq.1}$$

onde μ é a força iônica, ci a concentração de cada íon na solução e Zi é a sua valência.

A solubilidade de uma substância depende da afinidade relativa das moléculas de soluto entre si (formação da rede cristalina) e pelas moléculas do solvente. Fatores capazes de diminuir a interação entre as moléculas do soluto tendem a aumentar a solubilidade. No salting-in, os pequenos íons se interagem com os grupos iônicos das moléculas de

proteína, diminuindo as interações soluto-soluto e, assim, aumentando a solubilidade.

A precipitação de proteínas a partir de soluções aquosas por altas concentrações de sais, trata-se de um fenômeno conhecido como *salting-out*. Os íons di e trivalentes, tais como $(NH_4)_2SO_4$ e Na_2SO_4, que são mais efetivos, atraem as moléculas de água polarizáveis, resultando em menor disponibilidade das mesmas para as proteínas. Como a solubilidade da proteína depende do agrupamente de moléculas de água ao redor dos grupos hidrofílicos, a remoção de moléculas de água por outros íons diminui a sua solubilidade (Smith, 1985).

2) COMPOSTOS ORGÂNICOS E POLÍMEROS: Os polietilenoglicóis e os álcoois influenciam na cristalização de uma macromolécula. Os polietilenoglicóis influenciam na cristalização diminuindo o efeito de água, ou seja, diminuindo a quantidade destas moléculas em solução. Sendo assim, a solução é levada a um estado de supersaturação, favorecendo interações entre soluto-soluto. Os solventes orgânicos também produzem mudanças na solubilidade das proteínas em soluções aquosas. Isto é consequência da diminuição da constante dielétrica da água.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

3) pH: Proteínas são polieletrólitos com uma carga líquida que varia conforme o pH. Geralmente uma proteína é mais solúvel quanto mais interações está fazendo com as moléculas de solvente. Quando a carga total de uma proteína é nula, o que caracteriza o seu ponto isoelétrico (pI), a proteína apresenta uma maior facilidade em se agregar. Portanto, deve-se incluir nos experimentos de cristalização valores próximos ao pI.

4) TEMPERATURA: A solubilidade de uma proteína é dependente da temperatura, podendo aumentar ou diminuir com a variação da mesma. Sendo assim, é necessário que os experimentos de cristalização sejam realizados em câmaras, onde a temperatura possa ser mantida constante.

4.5. MONTAGEM DO CRISTAL

Uma vez obtido monocristais apropriados para coleta de dados de difração de raios X é necessário que se coloque o cristal em capilares, denominados capilares de Lindemann, a fim de realizar-se a coleta de dados de difração de raios X. Cerca de 40 a 60% do volume dos cristais de proteína é constituído por água, tornando-os muito sensíveis ao

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

ressecamento, por isso a necessidade de colocá-los em capilares. As etapas da montagem do cristal será descrita a seguir.

A figura 7 ilustra a montagem de um cristal. Primeiramente, escolhe-se a gota que possui o melhor cristal, em seguida, apanha-se um capilar e acopla-se a este uma borracha para que se possa sugar o cristal da gota para o capilar (A). Posteriormente, apanha-se a lamínula com a gota suspensa na qual se encontra o cristal e, com movimentos lentos e minuciosos emerge-se o capilar na gota até que este fique próximo ao cristal, sendo assim, suga-se o cristal para dentro do capilar (B). Geralmente, junto com o cristal entra uma grande quantidade de liquido da solução da gota no capilar, é necessário que se retire este excesso de líquido com a ajuda de uma fita fina de papel absorvente, este excesso de líquido é eliminado para evitar que o cristal se movimente durante a coleta de dados (C). Uma vez retirado o excesso de líquido do capilar, veda-se o mesmo com cera para evitar a evaporação da solução de cristalização. É importante que se deixe um pouco de solução envolvendo o cristal, esta pequena quantidade de solução evita que o cristal resseque (D). Sendo assim, o capilar esta pronto para ser colocado numa cabeça goniométrica e levado ao R-AXIS IV para a coleta de dados.

unesp

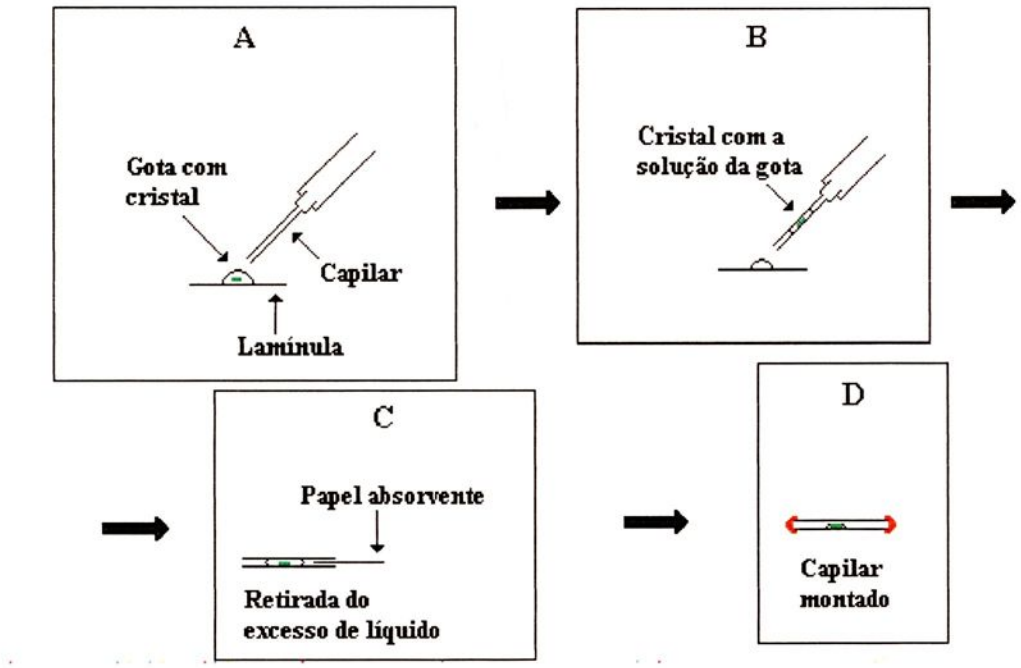


Figura 7 - Representação esquemática da montagem de um cristal para a coleta de dados de difração de raios X.

4.6. COLETA DE DADOS

4.6.1. Descrição do Difratômetro

Para a coleta de dados do cristal de miotoxina II, usamos o sistema R-AXIS IV instalado recentemente no nosso laboratório de Biologia Estrutural, no Departamento de Física - IBILCE/UNESP.

O sistema completo conta com uma fonte de raios X de ânodo rotatório, uma abertura rotatória sincronizada, um goniômetro (eixo ϕ), um cristal monocromador, um colimador, duas placas de imagens (IP

image plate) com 300mm x 300mm, lâmpadas deletoras, um laser He-Ne, uma fotomultiplicadora e uma interface SCSI (**S**mall **C**omputer **S**ystem **I**nterface) que conecta o sistema a uma estação gráfica que controla o R-AXIS IV.

A abertura rotatória sincronizada é desenhada para responder rapidamente, dentro de 0,04s, no início e no final da oscilação do ângulo ϕ do cristal, o que evita exposição não desejada antes e após o movimento do cristal.

A distância cristal-placa de imagem é variável, de 50 a 250mm. A mais alta resolução possível usando-se radiação CuKα é de 1.5418Å, quando a distância cristal-placa de imagem é de 50mm. Uma imagem digitalizada ocupa aproximadamente 18 Mbyte e é transferida à estação de trabalho via uma interface SCSI.

Um par de placas de imagens (IP) é usado no sistema de maneira que enquanto uma IP está sendo lida, a outra IP está na posição de exposição, registrando a próxima imagem. Após a exposição/leitura, as duas IPs são giradas de 90° e a imagem latente residual que ainda está sobre a IP após a leitura é apagada usando-se lâmpadas deletoras. O uso interligado de duas IPs possibilita uma coleta de dados quase contínua, desde que, o tempo de exposição de uma imagem seja maior que o tempo de leitura da mesma.

unesp

As principais partes do goniômetro R-AXIS IV estão descritas a seguir:

4.6.1.1. Ânodo Rotatório

Os raios X são produzidos quando elétrons acelerados colidem contra um alvo metálico. Para se acelerar estes elétrons, num sistema de ânodo rotatório, usam-se altas voltagens, na faixa de 40 a 50kV e correntes de até 160mA, o que leva a uma potência de até 8kW. Um fator limitante na construção de qualquer gerador de raios X é quanto calor pode ser dissipado do alvo metálico. No ânodo rotatório (figura 8) o feixe de elétrons incide sobre uma roda girante, o que evita a concentração de calor em um único ponto, além disso, existe um fluxo de água para refrigeração do alvo. O metal do alvo determina que comprimento de onda característico será emitido. O metal mais usado é o cobre, que emite raios X com comprimento de onda de 1,5418Å ($CuK\alpha$) (McRee, 1993).

unesp

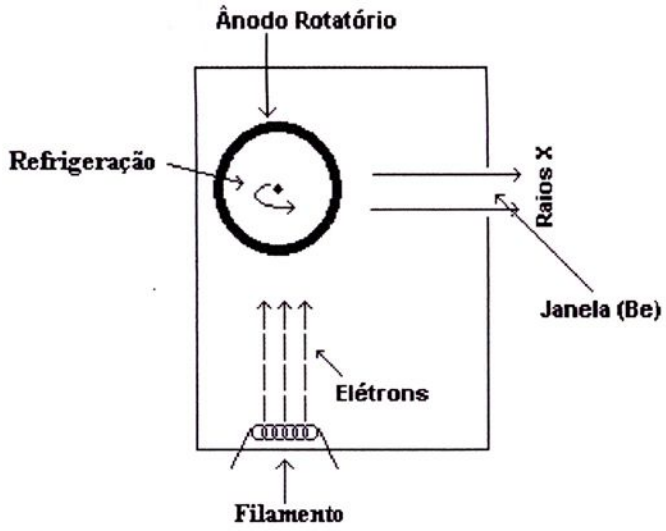


Figura 8- Representação esquemática do ânodo rotatório.

4.6.1.2. Colimadores e Monocromadores do feixe de raios X

Os sistemas de colimação podem ser escolhidos de tal forma a otimizar a intensidade máxima na placa de imagem e a resolução máxima de separação entre as reflexões. Colimadores circulares são geralmente usados para limitar o feixe incidente, resultando em um feixe circular de raios X.

O cristal monocromador é utilizado para se produzir um feixe de raios X com uma estreita distribuição de comprimentos de onda. A lei de Bragg, mostra que quando radiação com diferentes comprimentos de onda incide sobre um cristal, feixes difratados são observados a

diferentes ângulos de espalhamento, conforme o comprimento de onda (λ). Assim, selecionar um determinado ângulo de espalhamento, é equivalente a escolher um particular comprimento de onda do espectro incidente sobre o cristal. No sistema R-AXIS IV usado neste trabalho utiliza-se cristal monocromador de grafite (Giacovazzo, 1992).

4.6.1.3. Câmara de oscilação

No método de oscilação o cristal oscila por pequenos ângulos (para frente e para trás) em torno de um eixo perpendicular ao feixe de raios X, e as intensidades difratadas são registradas em um filme plano, ou uma placa de imagem, como no caso do R-AXIS IV.

Já que os "pontos" do espaço recíproco possuem volume, chamaremos tais pontos de nódulos. Assim, uma reflexão não estará totalmente registrada, a menos que todo o volume do nódulo do espaço recíproco tenha passado pela esfera de Ewald. Se isto não ocorrer, a reflexão é chamada reflexão parcial. Estas reflexões têm de ser adequadamente identificadas e tratadas durante o processamento de imagens. As reflexões parciais registradas em imagens diferentes podem ser somadas produzindo um valor confiável para a intensidade de reflexão total.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

Durante uma coleta de dados a câmara de oscilação tem de limitar o ângulo varrido em cada imagem, de forma, a evitar a sobreposição de reflexões diferentes na mesma imagem, ou seja, evitar que nódulos de diferentes planos do espaço recíproco produzam reflexões que se sobreponham numa mesma imagem. A expressão para o ângulo de oscilação máximo ($\Delta\phi_{max.}$) é dado por:

$$\Delta\phi_{max.} = \arctan\frac{|d_{min}|}{a} - \Delta \qquad \text{(Eq.2)}$$

onde d_{min} é a resolução máxima do conjunto de dados coletados, a é um eixo do cristal perpendicular ao eixo de rotação e Δ é a largura do ponto de difração. Como exemplo, consideremos um cristal ortorrômbico com os seguintes parâmetros de cela unitária a=73Å, b=71Å e c=54Å e com os pontos de difração com largura de 0.5° e deseja-se coletar dados a uma resolução de 2.5Å. O cristal está montado de tal forma que o eixo mais longo, a, está ao longo do eixo de rotação. Quando o sistema oscila com o eixo c, no plano da placa de imagem, o ângulo de oscilação máximo é limitado pelo eixo b, de maneira que $\Delta\phi_{max}$= arctan (2.5/71)-0.5°=1,52°e, quando o eixo c é o limitante, o ângulo de oscilação máximo é $\Delta\phi_{max}$=2.15°. Em resumo podemos estabelecer que o ângulo de oscilação máximo depende de três fatores:

i- Tamanho da cela unitária. Para celas unitárias maiores precisamos de ângulos de oscilações menores. Somente os eixos do cristal que são perpendiculares ao eixo de rotação, são limitantes do ângulo máximo. O eixo ao qual o cristal é rotacionado não é limitante.

ii- O tamanho do nódulo de difração ou mosaicidade. A largura do nódulo de difração na direção de rotação é tipicamente de 0,1° a 0,5°. A mosaicidade, que é expressa aproximadamente por esta largura, é a medida da ordem interna do cristal. Se um cristal possui baixa mosaicidade , o mesmo é altamente ordenado, se possui uma alta mosaicidade, é devido à baixa ordem cristalina.

iii- Resolução. Quanto maior a resolução desejada menor é o ângulo máximo de oscilação permitido. O máximo de sobreposição dos pontos de reflexão ocorrerá na área da imagem perpendicular ao eixo de rotação e no ângulo máximo de difração.

Um fator, igualmente importante, é o tamanho dos parâmetros da cela unitária. Nós vimos que o intervalo máximo de oscilação por imagem (Eq.2) é dependente da cela unitária. Assim, seria ideal, se girar o cristal em torno de seu maior parâmetro de cela, de forma que, este não seja o fator limitante na escolha de oscilação máxima por imagem. Um outro fator prático a ser considerado, que pode limitar a liberdade de escolha de um eixo de rotação, é a morfologia do cristal. Cristais que crescem em forma de uma placa muito fina, com o seu eixo de mais alta

unesp

simetria perpendicular à placa, não podem ser facilmente montados usando-se este como eixo de rotação (Giacovazzo, 1992).

4.6.1.4. Placa de Imagem (IP)

As placas de imagens são feitas depositando-se uma fina camada de um material semicondutor, como o haleto de bário empregnado com európio ($BaFBr:Eu^{2+}$), sobre uma base plana. Os fótons de raios X, quando incidem sobre esta placa, excitam os elétrons no material semicondutor para um nível de energia mais alto, ou seja, alguns dos íons Eu^{2+} são transformados em Eu^{3+}, e os elétrons que são liberados são aprisionados nas vacâncias de Br^- introduzidas no cristal, formando os chamados centros F. Parte desta energia é emitida, entretanto, uma quantidade apreciável de energia é retida no material por elétrons aprisionados nos centros de cor. O centro F decai quando iluminado com um laser de He-Ne (633nm), produzindo luminescência em 390nm (Azul) que é amplificada com uma fotomultiplicadora. A luz emitida é proporcional ao número de fótons de raios X ao qual aquela parte da placa foi exposta. Antes de se coletar uma nova imagem a placa é exposta a uma forte luz branca que a apaga. As placas de imagem usadas

unesp

no sistema R-AXIS IV possuem dimensões de 300mm x 300mm divididas em 3.000 por 3.000 pixels de dimensões de 100μm x 100μm.

Um outro componente do equipamento de coleta de dados que vale a pena ser mencionado é o aparador do feixe direto (**beam stop**), o qual evita que o feixe direto de raios X incida sobre a placa de imagem (Drenth, 1994).

4.6.2. Indíces dos Planos Atômicos em um Cristal.

Os conjuntos de planos em uma rede cristalina, são aqueles determinados pelas faces da unidade de cela. Estes e todos os outros planos, espaçados regularmente, que podem ser tirados como pontos da rede podem ser considerados como fonte de difração, e podem ser designados por um conjunto de três números denominados *índices de rede* ou *índices de Müller*. Estes três índices hkl identificam um conjunto particular de planos paralelos (figura 9).

O índice h dá o número de planos no conjunto por unidade de cela na direção x, isto é, o número de partes em que o conjunto de planos corta o eixo **a** de cada cela. Os índices k e l especificam quantos planos existem por unidade de cela nas direções y e z. O conjunto de planos paralelos as faces **b** e **c** e, portanto, normal ao eixo x, é designado

unesp

(100), já que há um plano por ponto de rede na direção x. De maneira semelhante, os planos paralelos as faces **a** e **c** são denominados planos (010)(um plano por ponto de rede ao longo do eixo y), como ilustrado na figura 9.

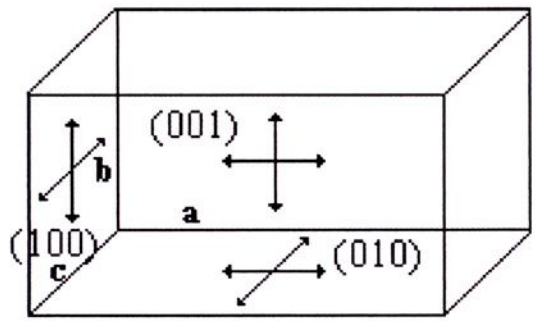


Figura 9- Índices das faces em uma unidade de cela.

No modelo de Bragg de difração como reflexão a partir de conjuntos de planos paralelos, alguns destes conjuntos de planos paralelos podem gerar um feixe de raios X difratado, portanto, cada conjunto destes é tratado como um difrator independente e produz uma única reflexão.

4.6.3. As Condições que Produzem Difração: A Lei de Bragg.

Foi mostrado por Bragg que um conjunto de planos paralelos com índices hkl e espaçamento interplanar d_{hkl} produz um feixe difratado, quando os raios X de comprimento de onda (λ) atingem os planos num ângulo (θ) e são refletidos no mesmo ângulo, isto acontecerá se θ obedecer a seguinte condição:

$$2d_{hkl}\text{sen}\theta = \lambda \qquad \text{(Eq.3)}$$

A figura 10 representa 2 planos paralelos com espaçamento interplanar d_{hkl}. Dois raios X (R1 e R2) são refletidos num ângulo θ.

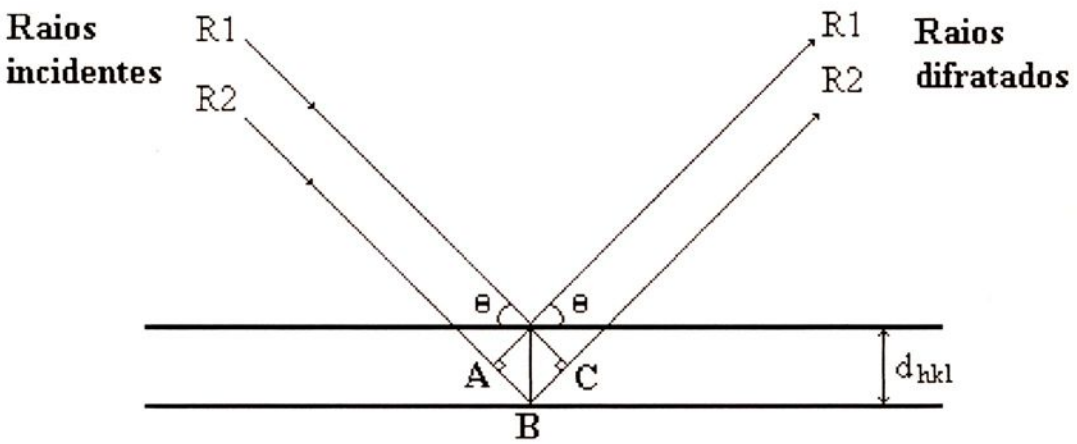


Figura 10- Representação esquemática da lei de Bragg.

Para que estes dados possam ser analisados é necessário a construção da rede recíproca, a qual permite uma análise conveniente da direção dos feixes difratados para todos os conjuntos de planos paralelos na rede cristalina (espaço real). Na figura 11, está representado um esquema da difração no espaço recíproco. um ponto de difração só será considerado como tal, se este passar pela esfera de Ewald.

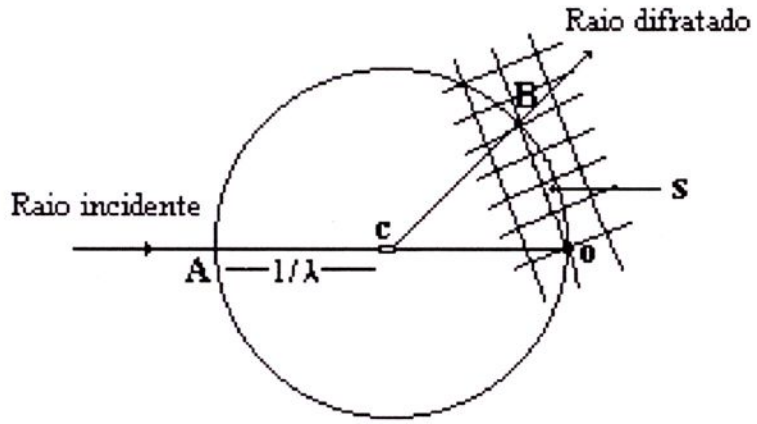


Figura 11- A esfera de Ewald interceptada por um ponto da rede recíproca, B. No esquema **o** é a origem da rede recíproca, **s** é o vetor do espaço recíproco, **c** é o cristal e $1/\lambda$ é o raio da esfera de Ewald.

4.6.4. O Número de Reflexões Mensuráveis.

Se a esfera de reflexão tem um raio de $1/\lambda$, então pontos da rede recíproca dentro de uma distância $2/\lambda$ da origem podem ser trazidos a condição de difração. Esta distância define a esfera limitante. O número de pontos da rede recíproca dentro da esfera limitante é igual ao número

de reflexões que podem ser produzidas pela rotação do cristal em todas as direções possíveis. Isto demonstra que as dimensões da unidade de cela e o comprimento de onda dos raios X determinam o número de reflexões mensuráveis. Sendo assim, o número de reflexões possíveis é igual ao volume da esfera limitante dividido pelo $V_{recip.}$ de uma cela recíproca. O volume de uma esfera de raio r é $(4\pi/3)r^3$, e r para a esfera limitante é $2/\lambda$, então:

$$N = \frac{\left(\frac{4\pi}{3}\right)\left(\frac{2}{\lambda}\right)^3}{V_{recip.}} \qquad \text{(Eq. 4)}$$

O volume V da unidade de cela real é V_{recip}^{-1}, assim:

$$N = \frac{33{,}5.V}{\lambda^3} \qquad \text{(Eq. 5)}$$

A equação 5 mostra que o número de reflexões disponíveis depende somente do V e λ.

4.6.5. Fatores que Afetam a Coleta de Dados de Difração de Raios X

4.6.5.1. Mosaicidade

A mosaicidade tem um efeito decisivo no fenômeno de difração de raios X. O monocristal real com estrutura de mosaico pode ser considerado como um conjunto de blocos de celas unitárias levemente desorientados um em relação ao outro. O efeito de um aumento na mosaicidade é um alargamento e achatamento da intensidade da reflexão, que influencia o tempo que a reflexão leva para passar pela esfera de Ewald. A mosaicidade para cada cristal é refinada durante o processamento de dados.

4.6.5.2. Danos por radiação

Cristais de macromoléculas biológicas sofrem danos quando expostos aos raios X. Os fótons de raios X causam a formação de radicais livres no cristal, o que leva a reações químicas entre estes radicais e partes da macromolécula responsáveis pela estrutura cristalina, ou seja, ligações fracas, como ligações de hidrogênio e van

unesp

der Walls, são quebradas e geram radicais livres. Para se minimizar estes danos causados pela radiação coleta-se dados de difração de raios X dos cristais a baixa temperatura. Procedendo-se desta forma, minimizam-se os danos por radiação, possibilitando a coleta de dados de difração de raios X por mais longos períodos. O procedimento de se coletar cristais a baixíssimas temperaturas, próximas ou iguais à temperatura do nitrogênio líquido, é conhecido como crio-cristalografia e vem se tornando de uso cada vez mais freqüente, principalmente em fontes síncrotron, devido à alta intensidade do feixe de raios X destas fontes (Drenth, 1994).

4.6. Processamento computacional das imagens usando o R-AXIS IV

Dois pacotes de programas são fornecidos junto com o equipamento R-AXIS IV: um controla o difratômetro de placa de imagem mecanicamente, tira as imagens de raios X com o cristal imóvel (still) ou de oscilação e transfere as imagens para a estação de trabalho. O outro pacote de programas processa as imagens para se obter um conjunto de dados de difração. O programa MEASUREMENT é o mais frequentemente usado durante a rotina de coleta de dados de difração de

unesp

raios X. Informações sobre o cristal, o gerador de raios X e as imagens still ou de oscilação são tiradas sob estas condições. O programa MANUAL é usado principalmente para se estabelecer as condições da máquina comandando-se cada função independente. Após as condições de trabalho serem estabelecidas pelo programa SETUP, o programa STILL analisa as imagens still para determinar a orientação do cristal, o programa OSCILL calcula as intensidades integradas das reflexões das imagens de oscilação e finalmente o programa SCALE determina os fatores de escala das imagens e faz a média das reflexões relacionadas por simetria para gerar um conjunto de reflexões independentes (Sato *et al.*, 1992).

Os principais passos para a coleta de dados e processamento das imagens coletadas usando o equipamento R-AXIS IV da Rigaku Co., são apresentados a seguir.

4.7. Alinhamento do cristal.

Uma vez tenhamos o cristal numa cabeça goniométrica faz-se necessário o alinhamento deste cristal com o feixe de raios X. Tal alinhamento ótico é feito com o equipamento de raios X desligado, ou seja, sem que haja incidência de raios X tanto sobre o cristal quanto

unesp

sobre o operador. O equipamento dispõe de um sistema ótico composto de uma luneta com "+", calibrado de tal forma que quando o cristal estiver sobre o centro deste "+" estará alinhado com o feixe de raios X. Por alinhado entende-se que durante uma rotação de 360° do eixo de rotação, o cristal esteja sempre sob o feixe de raios X. O suporte da cabeça goniométrica permite translação vertical o que possibilita o posicionamento do cristal. Após este posicionamento passa-se ao ajuste do eixo de rotação. Considerando-se o cristal num ângulo inicial ϕ=0, usam-se os ajustes de translação horizontal da própria cabeça goniométrica para se posicionar o cristal sobre o centro do "+" da luneta, feito isto, gira-se o cristal de 180°, e o colocamos ϕ=90°, centra-se novamente o cristal, gira-se para ϕ=270° e repete-se o processo. O cristal estará razoavelmente alinhado, quando girando-se 360° o cristal fica sobre o centro do "+" durante toda a rotação. Caso contrário, procede-se ao ajuste fino repetindo o procedimento inicial.

4.8. Coleta e processamento das imagens Still

Para a coleta dos dados de difração da miotoxina II usou-se 50kV e 100mA. Um parâmetro importante a ser ajustado é a distância

cristal-placa de imagem, já que esta distância determinará a máxima resolução possível do conjunto de dados de difração de raios X, ou seja, quanto mais próxima a placa de imagem do cristal, maior é a resolução máxima possível. No entanto, se o cristal difrata a baixa resolução (pior que 3Å) de nada adianta colocar a placa de imagem próxima ao cristal, pois sua difração será baixa. Assim, se faz necessário a coleta de uma única imagem Still, para se avaliar o poder de difração do cristal. Caso existam muitos pontos fortes de difração próximos à borda da imagem deve-se aproximar a placa de imagem ao cristal, caso contrário deve-se afastar.

As imagens Stills são coletadas com o eixo de rotação (ângulo ϕ) fixo, ou seja, sem oscilações durante a exposição de raios X. As informações obtidas com estas imagens permitem o cálculo da matriz de orientação do cristal em relação ao sistema de coordenadas do laboratório e os parâmetros da cela unitária, tal processo é chamado de auto-indexação. O processo de auto-indexação é equivalente a se achar três vetores de base a partir de um conjunto de vetores de espalhamento observados experimentalmente.

Para o processo de auto-indexação é recomendado o uso de no mínimo duas imagens Still coletadas a diferentes ângulos ϕ, por exemplo ϕ=0° e ϕ=90°. Estas imagens devem ter por volta de no mínimo

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

100 pontos de difração com boa estatística no processo de auto-indexação (Arndt and Wonacott, 1977; Fontes, 1995).

4.9. Coleta e processamento das imagens de oscilação.

Com a orientação e os parâmetros de cela conhecidos o número de imagens a ser coletado e o tempo de exposição de cada imagem deve ser determinado. O número de imagens deve ser tal que quando multiplicado pelo ($\Delta\phi$) cubra uma região do espaço recíproco suficiente para conter uma unidade assimétrica. Já o tempo de exposição deve ser determinado empiricamente, através da observação de diversos fatores, tais como, danos por radiação, resolução desejada, radiação de fundo, etc. Através do uso do programa OSCILL é possível fazer-se uma simulação das condições da coleta de dados. O operador tem disponível para isto a opção SIMULATION. Os parâmetros de entrada são ($\Delta\phi$), o ângulo de início de coleta, o ângulo final de coleta e a resolução. O programa usa as informações obtidas da auto-indexação (orientação do cristal e cela unitária) para fazer a simulação. A saída da simulação fornece o quanto de sobreposição e a porcentagem do conjunto de dados coletados acumulativamente em cada imagem, desta forma, o usuário pode ver se a escolha das condições de coleta de dados, feita por ele, não



estão gerando dados com muita sobreposição de pontos de difração e se o número de imagens, é suficiente para uma boa completeza dos dados. A completeza é o número de reflexões únicas possíveis em uma dada resolução. Assim, um conjunto de dados 92% completo à resolução de 2,33Å, indica que, 8% das reflexões únicas possíveis estão faltando. A quantidade de completeza necessária é dependente de vários fatores, mas, como regra geral, temos que, dados 80% completos são normalmente suficientes para a maioria dos propósitos. Após a coleta das imagens de oscilação passa-se a etapa de se indexação de cada ponto de difração sobre cada imagem de oscilação e se medir a intensidade dos mesmos. Para se medir as intensidades, usando-se placas de imagens, leva-se em consideração que estas são divididas em pequenas áreas (pixels) e somam-se as intensidades registradas em cada pixel. Deve-se, também, levar em consideração a radiação de fundo presente. O programa OSCILL calcula um perfil médio para as reflexões, usando-se caixas centradas nas posições previstas para as reflexões usando se a matriz de orientação. A caixa definida no programa OSCILL está mostrada na figura 12. Esta caixa é definida pela altura (NRY), largura (NRX) e diagonais (NCR), formando assim duas áreas na caixa, uma interna às linhas pontilhadas e outra externa. A intensidade medida na área externa é considerada como background (radiação de fundo) e a intensidade medida na área interna como reflexão mais radiação de

unesp

fundo, assim, a intensidade devido unicamente à reflexão é obtida pela equação:

$$I(hkl)=I(\text{área interna})-I(\text{área externa}) \qquad \text{(Eq.6)}$$

O programa faz ainda nesta etapa a correção de Lorentz (L) polarização (p). A correção de polarização surge devido ao fato de que um elétron não espalha radiação ao longo de sua direção de oscilação. Para radiação não polarizada esta correção é da seguinte forma:

$$p = \frac{1}{2(1+\cos^2 2\theta)} \qquad \text{(Eq.7)}$$

A correção de Lorentz representa o tempo que uma reflexão gasta em condições de difração, enquanto está sendo girada através da esfera de Ewald. A expressão para a correção de Lorentz (L) para a câmara de oscilação é da seguinte forma:

$$L = \frac{1}{sen2\theta} \qquad \text{(Eq.8)}$$

onde 2θ é o ângulo de espalhamento.

unesp

No próximo passo o programa SCALE agrupa todas as reflexões integradas em um único arquivo (arquivo merge), estas reflexões ficam em ordem crescente dos índices de Miller (Higashi *et al.*, 1990; Arndt and Wonacott, 1977; Fontes, 1995; Giacovazzo, 1992).

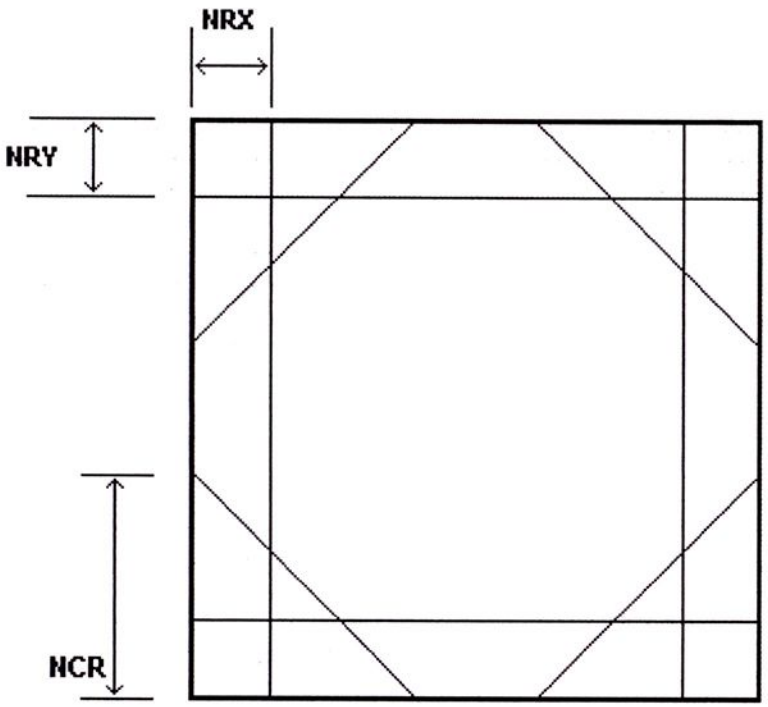


Figura 12- Perfil para integração das reflexões.

4.10. Escalonamento das imagens

Dados de alta resolução para cristais de macromoléculas biológicas são coletados usando-se diversas imagens e, em muitos casos, cristais diferentes. As reflexões medidas mais de uma vez e as

parcialmente medidas podem ser utilizadas no conjunto final de dados, uma vez que é possível colocá-las em uma mesma escala. A procura pelo fator de escala a ser aplicado em cada imagem é conhecido como escalonamento.

A avaliação da qualidade dos dados processados pode ser feita através do cálculo do R_{merge}, que mede a concordância entre as reflexões equivalentes:

$$R_{merge} = \frac{100 \sum_h \sum_i \left| F_i^2(hkl) - \left\langle F^2(hkl) \right\rangle \right|}{\sum_h \sum_i F_i^2(hkl)} \qquad \text{(Eq.9)}$$

onde $F_i^2(hkl)$ é a intensidade da i-ésima reflexão e $\left\langle F^2(hkl) \right\rangle$ é a intensidade média das reflexões equivalentes hkl (Blundell and Johnson, 1976; Fox and Holmes, 1966).

4.11. O Método de Substituição Molecular

O método denominado de **Substituição Molecular** é aplicado quando a macromolécula estudada apresenta alta homologia com outras macromoléculas biológicas, cuja estrutura já tenha sido determinada. Este procedimento é baseado na observação de que macromoléculas homólogas na sua sequência, têm um enovelamento muito similar. Neste

Inst. de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
BIBLIOTECA

método, a molécula de estrutura conhecida, denominada molécula modelo, é posicionada na cela unitária da estrutura desconhecida através da aplicação de seis variáveis, três rotacionais e três translacionais, sobre o conjunto conhecido de coordenadas. Essa transformação pode ser representada como (Giacovazzo *et al.*, 1994):

$$X' = [M]X + t \qquad \text{(Eq.10)}$$

onde X é o conjunto de vetores posição dos átomos da molécula original, [M] é a matriz que rotaciona as coordenadas X para a nova orientação e t é um vetor translação. Resolver uma estrutura por Substituição Molecular resume-se, portanto, em encontrar as duas funções: de rotação e de translação.

O método de Substituição Molecular foi utilizado neste trabalho para determinar a estrutura tridimensional da MjTX-II, devido à alta semelhança na sequência de aminoácidos (95%) que essa proteína apresenta com a miotoxina II de *Bothrops asper*, cuja estrutura já foi resolvida (Arni *et al.*, 1995).

Na resolução da estrutura da MjTX-II foi utilizado o pacote de programas AMoRe ("**A**utomated Package for **Mo**lecular **Re**placement") (Navaza, 1994). O pacote pode ser rodado passo a passo (programa por programa) ou automaticamente, tendo os seguintes arquivos de entrada:

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

- arquivo contendo a estrutura modelo com átomos, coordenadas e fatores de temperatura (B).

- arquivo contendo os dados cristalográficos: h, k, l, F_{obs}, sigma (F).

Os programas que compõem o AMoRe são:

- **SORTING:** Resume e ordena os dados de h, k, l, F_{obs}, que serão utilizados nos programas seguintes. Devem ser especificados os parâmetros de rede, operações de simetria e limites de resolução.

- **TABLING:** Calcula coeficientes de Fourier para a molécula modelo.

- **ROTING:** Calcula função de rotação. As melhores soluções são escolhidas de acordo com o coeficiente de correlação (CC), descrito na equação 11.

- **TRAING:** Calcula função de translação. Para uma dada função de rotação, o programa faz translação e em cada posição calcula o coeficiente de correlação:

$$CC^{\alpha\beta\gamma xyz} = \frac{\sum_H \Delta F_H^{Obs} \Delta F_H^{Calc.}(\alpha\beta\gamma xyz)}{\sqrt{\sum_H (\Delta F_H^{Obs})^2}\sqrt{\sum_H (\Delta F_H^{Calc.})^2}} \qquad \text{(Eq.11)}$$

Esse coeficiente relaciona os Fatores de Estrutura observados com os calculados para a nova posição da molécula e ângulos α, β e γ, além de translações x, y e z, portanto, quanto maior o coeficiente de

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

correlação, melhor a resolução encontrada (função rotação seguida da translação).

- **FITING:** Faz um refinamento de corpo-rígido minimizando F_{Obs} e $F_{Calc.}$ levando em consideração a escala, fator de temperatura (B) e parâmetros de rotação e translação.

- **CORDING:** Aplica as matrizes de rotação e translação nas coordenadas do modelo, produzindo um novo conjunto de coordenadas finalmente na cela unitária.

Com o pacote AMoRe, consegue-se à partir da estrutura de uma molécula conhecida, chegar a um modelo inicial da estrutura desejada.

A partir da melhor solução encontrada com o programa AMoRe prossegue-se com o refinamento das coordenadas atômicas usando-se o programa X-PLOR (Brünger, 1992). O programa X-PLOR é muito útil, adequando-se a praticamente todos os problemas encontrados durante o refinamento de estruturas de macromoléculas utilizando dados de difração de raios X (Brünger, 1992).

O método dos mínimos quadrados em refinamento funciona bem para moléculas pequenas, pois tem-se muitas observações por parâmentro a ser refinado. No caso de proteínas tem-se tipicamente de 2 a 4 observações por parâmetro, portanto deve-se levar em consideração outras informações, tais como estereoquímica para aumentar o número de dados e/ou reduzir o número de parâmetros. O programa X-PLOR

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

(Brünger, 1992) faz uma minimização da função energia total. O refinamento segue no sentido de minimizar a energia total, calculando as variações nas coordenadas atômicas e parâmetros térmicos que conduzem ao mais baixo valor de energia. As etapas do refinamento são: 1- Rotina topologia, 2- Refinamento de corpo rígido, 3- Rotina Check e a Determinação do peso W_A, 4- Refinamento por dinâmica molecular com temperatura controlada (Simulated Annealing), 5- Refinamento posicional com minimização de energia, 6- Refinamento dos fatores de temperatura, 7- Análise do modelo refinado, 8- Simetria não-cristalográfica e 9- Colocação das moléculas de água.

4.12 Análises Computacionais

Os alinhamentos de sequências primárias foram feitos utilizando o Clustal W Multiple Sequence Aligmente do SWISSPROT (Protein Sequence Database). O programa WHATIF 4.9 (Vriend, 1987) foi utilizado para se realizar a comparação das estruturas cristalográficas, as coordenadas das fosfolipases A_2 foram obtidas no Protein Data Bank (PDB - Brookhaven National Laboratory) (Bernstein *et al.*, 1977). O programa RIBBONS 2.0 (Carson, 1987) foi utilizado para gerar as estruturas cristalográficas da MjTX-II.

unesp

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Verificação da Pureza da Amostra

Para verificar a pureza da amostra da MjTX-II (Miotoxina II de *B. moojeni*), foi feito gel desnaturante (SDS-PAGE), com sistema descontínuo de pH no tampão (gel de empilhamento pH 6.8 e gel de separação pH 8.3) (Laemmli,1970). Foram separadas alíquotas para a eletroforese em SDS-PAGE de 17% de poliacrilamida. As amostras foram aquecidas por 10 minutos à 100°C na presença de β-mercaptoetanol 5%, antes de serem aplicadas no gel. A figura 13, ilustra o resultado desta eletroforese. Por este método de análise, pode-se verificar que a MjTX-II possui uma pureza adequada para os ensaios de cristalização. As bandas observadas em 1, por volta de 30 KDa, é o dímero desta proteína, uma vez que esta quando estocada revela uma forte tendência à formação de dímeros, trímeros e tetrâmeros.

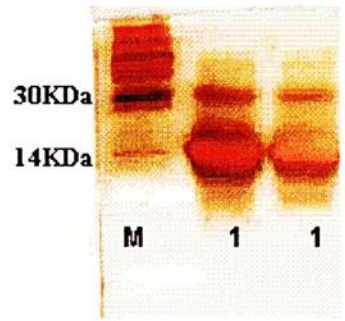


Figura 13: Gel SDS-PAGE 17% com β-mercaptoetanol impregnado por nitrato de prata: M- marcador (músculo de coelho), 1- Miotoxina II de *B.moojeni*. Foi aplicado 2µl de amostra em cada poçinho.

5.2 Cristais da MjTX-II

5.2.1 Obtenção dos cristais de MjTX-II

A amostra de miotoxina II de *B. moojeni* foi purificada e cedida pelo grupo do Prof. Dr. J. R. Giglio da USP de Ribeirão Preto, como mencionado anteriormente. Para os experimentos iniciais de cristalização a amostra liofolizada foi dissolvida em água destilada, tendo uma concentração final de 20mg/ml.

Tendo a proteína em solução utilizou-se o método da matriz esparsa (Jancarik and Kim, 1991) a fim de se obter as condições ideais de

cristalização da proteína. Após três dias, microcristais foram obtidos na solução de número 9 (Anexo 1), no entanto, estes não apresentavam tamanho apropriado (um cristal de 0.2 a 0.5mm já seria bom para a coleta) para a coleta dos dados de difração de raios X. Seria necessário alguns ajustes na concentração de agente precipitante, para que monocristais apropriados para coleta de dados fossem obtidos.

Os próximos experimentos foram feitos diminuindo a concentração de agente precipitante da solução, isto proporcionaria uma cinética de cristalização mais lenta, o que favoreceria a formação de cristais (Ducruix and Giége, 1982). Alguns dias após os experimentos de otimização das condições de cristalização, monocristais de tamanho apropriado para a coleta de dados de difração de raios X foram obtidos.

Como o difratômetro de raios X R-AXIS IV não havia sido instalado no Departamento de Física, neste período, os cristais de MjTX-II foram levados a São Carlos, onde existe um difratômetro de raios X (R-AXIS IIC). Os dados deste cristal foram coletados e os resultados da coleta foram negativos, pois o cristal difratava a uma resolução muito baixa. Isto é devido ao alto conteúdo de solvente no cristal, o que geraria uma fraca difração de raios X, além de promover uma alta mosaicidade (um mau ordenamento das celas unitárias do cristal) (Branden and Tooze, 1991).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Sendo assim, foi necessário encontrar uma outra solução que fornecesse cristais. Uma nova avaliação das soluções foi feita e, chegou-se a conclusão que a solução de número 39 deveria ser usada para novos experimentos. Novos ajustes foram feitos na solução e após 3 semanas obteve-se monocristais de MjTX-II. Com o intuito de se aumentar o tamanho dos cristais de MjTX-II, foram feitas gotas contendo 3µl de proteína para 3µl de solução, uma vez que, ao se usar uma maior quantidade de proteína a tendência é que se obtenha cristais maiores.

Obtidos os cristais (figura 14), estes tiveram seu poder de difração de raios X testados e seus dados de difração foram coletados. Os resultados da coleta foram satisfatórios, pois esta foi a primeira estrutura dimérica de fosfolipase miotóxica a alta resolução (2.0Å).

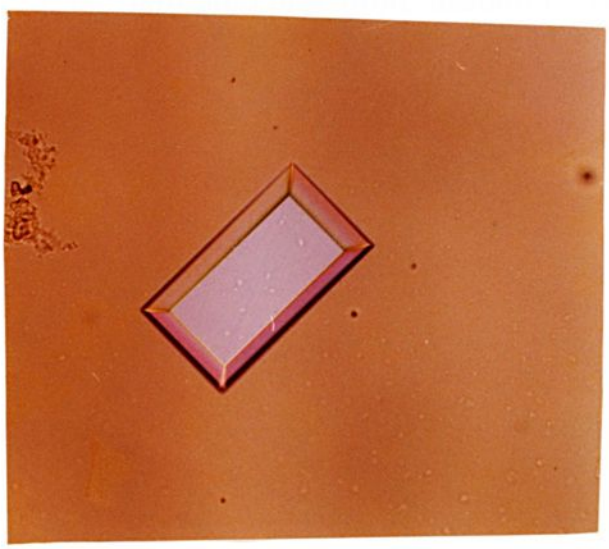


Figura 14: Cristal de MjTX-II.

5.3. Resolução e Refinamento da Estrutura

Os dados de difração de raios X do monocristal de MjTX-II foram coletados a temperatura ambiente (24°C) com um detector de área R-AXIS IV, usando um gerador de raios X com ânodo rotatório RU300 da Rigaku, o qual opera a 50kV e 100mA, os dados foram processados usando o programa PROCESS (Higashi, 1991). A estrutura da MjTX-II foi resolvida por substituição molecular, usando o programa AMoRe (Navaza, 1994) e as coordenadas atômicas da Miotoxina II de *B. asper* (fosfolipase A_2 Lys49) (Arni *et al.*, 1995). As reflexões na faixa de resolução de 20.0 a 4.0Å foram usadas para a procura de rotação, a solução que apresentou o mais alto coeficiente de correlação foi usado na função translação.

Após um ciclo de *simulated annealing* usando o programa X-PLOR (Brünger, 1992), os mapas de densidade eletrônica foram visualmente examinados utilizando o programa FRODO (Jones, 1978) e as posições dos átomos das cadeias laterais foram ajustados manualmente quando necessário. As moléculas de água foram subsequentemente localizadas e suas posições e fatores de temperatura foram refinados. O refinamento convergiu para um residual cristalográfico de 19.7% (R_{free}=28.1%) usando intensidade de difração de raios X numa faixa de resolução de 5.0 a 2.0Å,

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

que neste caso é a faixa ótima para refinamento posicional e "Simulated Annealing". As diferenças de rms (Root-mean-square) das geometrias ideais para comprimento de ligação e ângulos foram calculados com o X-PLOR 3.1 (Brünger, 1992). A qualidade estereoquímica total do modelo final para MjTX-II foi analisada pelo programa PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993). Os modelos atômicos foram superpostos usando o programa LSQKAB para CCP4. As ligações de hidrogênio foram determinadas com o programa HBPLUS (McDonald and Thornton, 1994) (Tabela 2).

Tabela 1- Estatística da coleta de dados e do refinamento da MjTX-II de *Bothrops moojeni*.

Grupo espacial	$P2_12_12_1$	R_{factor}[+](%)	19.7
Dimensões de Cela (Å)	a=50.83 b=64.55 c=88.95	R_{free}[#](%)	28.1
		valores B[**] (Å^2)	
		Cadeia principal	30.70
No. de reflexões únicas	17.121	Cadeia lateral	33.69
		Águas	32.15
Completeza dos dados a 2.0Å (%)	84.0	Desvio (rms)	
		Comprimento das ligações (Å)	0.013
R_{merge}(%)	4.9	Ângulos das ligações (graus)	1.851
Resolução (Å)	5.00-2.00	Ângulos diédrico (graus)	23.076
		No. de moléculas de água	129

[+]$R_{factor}=100x\sum| F_o-F_c| /\sum(F_o)$, as somas foram efetuadas sobre todas as reflexões com $F>2\sigma(F)$. [#]$R_{free}=R_{factor}$ para 10% dos dados, os quais não foram incluídos durante o refinamento cristalográfico. [**]valores de B=médias dos valores B para todos os átomos que não sejam hidrogênio, onde B é o parâmetro de vibração térmica.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

5.4. Análise da Estrutura

O modelo final da Miotoxina II de *B. moojeni* (MjTX-II) consiste de 1.886 átomos de proteína e 129 moléculas de água. Como apresentados na tabela 1, os desvios totais da estereoquímica ideal no modelo final são baixos e o gráfico de Ramachandran indica um agrupamento das conformações peptídicas nas regiões mais energeticamente favoráveis, como ilustrado na figura 15. Neste gráfico, o resíduo 78 e seu correspondente (278) ficaram fora das regiões permitidas. Os ângulos ϕ e ψ possuem restrições de movimento, devido a impedimentos estéricos entre os átomos da cadeia lateral e os átomos da cadeia principal. O gráfico de Ramachandran descreve estas restrições comparando os parâmetros da proteína de interesse com parâmetros equivalentes de estruturas resolvidas a alta resolução. Neste gráfico as regiões mais escuras são as que possuem geometria mais favorável para ângulos ϕ e ψ, sendo assim, nas regiões claras existem ângulos não permitidos para ϕ e ψ, portanto resíduos que caem nesta região apresentam algum impedimento estérico. No entanto, pode haver uma explicação em termos estruturais ou funcionais, que compense o custo energético de uma conformação não usual. Os resíduos de glicina, representados por triângulos no gráfico, estão em regiões não

unesp

permitidas, isto se deve ao fato deste resíduo possuir somente um hidrogênio como cadeia lateral, o que lhe confere grande liberdade de rotação. Os demais resíduos são representados por quadrados (figura 15)

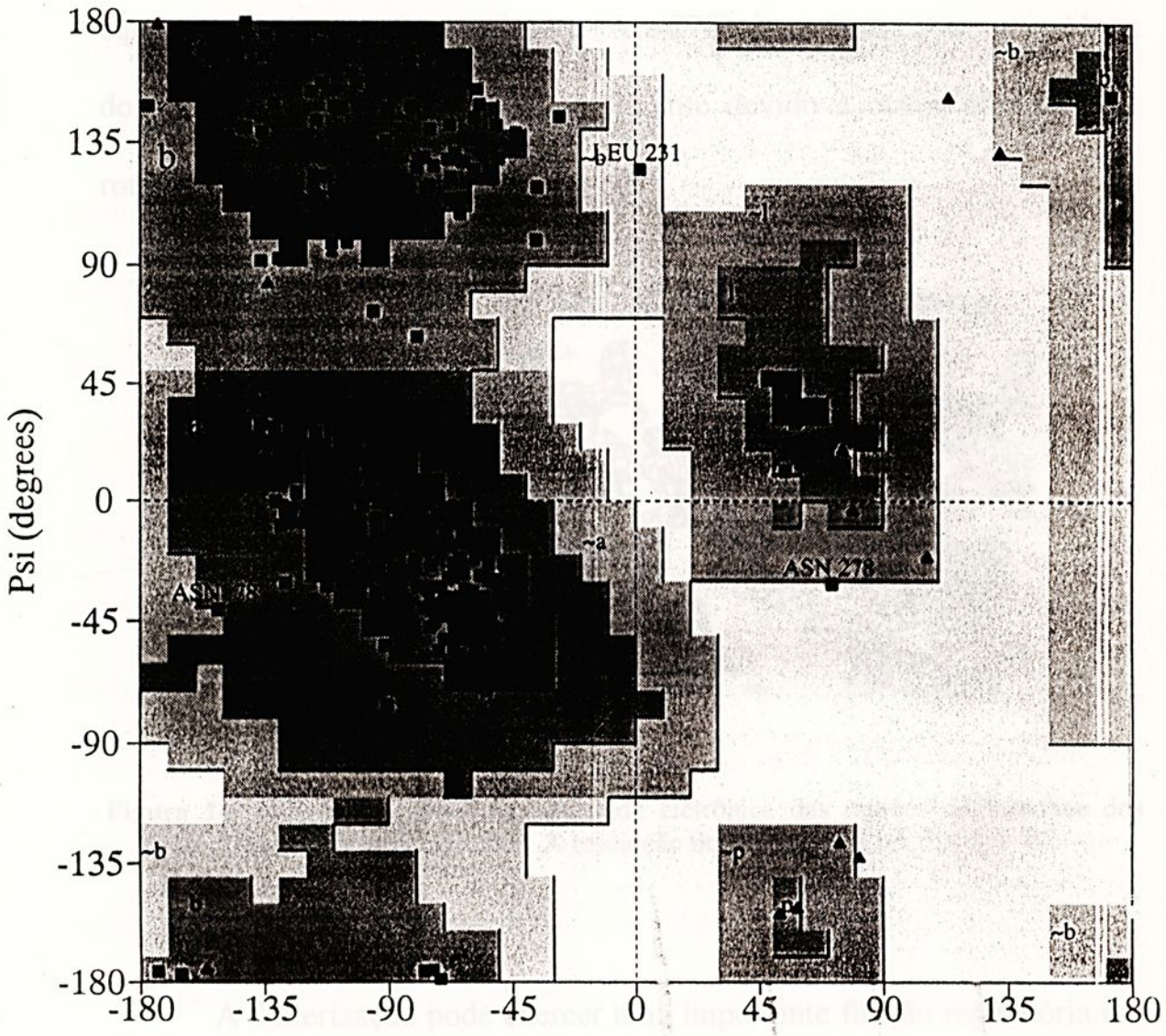


Figura 15- Gráfico de Ramachandran indicando a distribuição dos resíduos de aminoácidos da MjTX-II.

O mapa de densidade eletrônica mostra uma excelente qualidade. Na figura 16 está exemplificado um diagrama estéreo de uma região representativa da densidade eletrônica na interface entre os dois monômeros. No entanto, as densidades eletrônicas dos resíduos 88 e seu equivalente no segundo monômero (Asn 278), juntamente com os resíduos do C-terminal estão fracas, provavelmente devido à maior liberdade de rotação desta região.

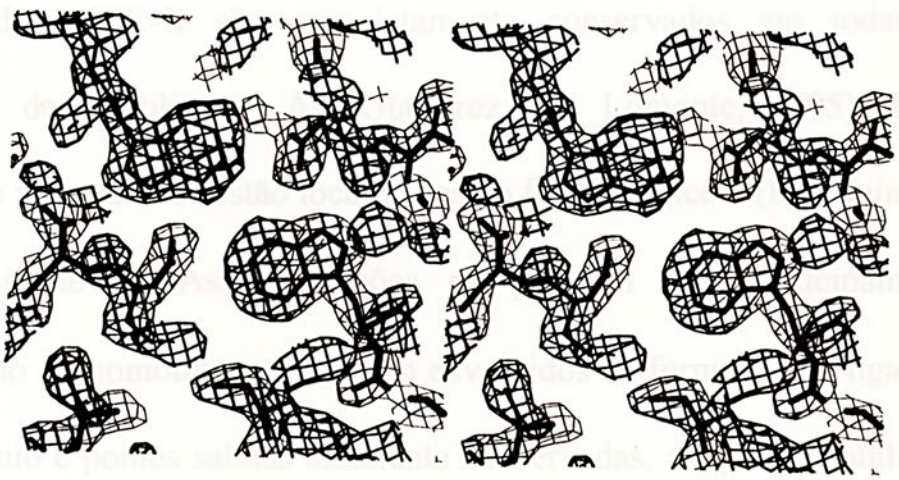


Figura 16- Diagrama estéreo da densidade eletrônica das regiões de interface dos monômeros da MjTX-II. A resolução do mapa é de 2.0Å.

A dimerização pode exercer uma importante função regulatória nas fosfolipases A_2 cataliticamente ativas (Tomasseli *et al.*, 1989; Cordella-Miele *et al.*, 1990). Um eixo de ordem dois atravessa a interface dimérica, na qual os aminoácidos localizados na primeira hélice e na primeira cadeia

β da Asa-β formam ligações de hidrogênio e pontes salinas que permitem a exposição do sítio catalítico ao solvente. O oposto ocorre na estrutura da fosfolipase A_2 de *Crotalus atrox* (Brunie *et al.*, 1985), na qual os resíduos catalíticos estão fora de contato com o solvente. Neste caso, um íon cálcio que induz transição na estrutura quaternária tem sido proposto para explicar a exposição do sítio ativo e consequentemente a ligação do substrato. Os aminoácidos envolvidos na interação dimérica (Glu 12, Trp 77 e Lys 80) na estrutura da MjTX-II são completamente conservados em todas as homólogas de fosfolipases A_2 (Gutiérrez and Lomonte, 1995). Estes resíduos de aminoácidos estão localizados no fim da hélice 1 (N-terminal) e na extremidade da Asa-β (regiões da proteína que participam na estabilização do homodímero) e, estão envolvidos na formação de ligações de hidrogênio e pontes salinas altamente conservadas, as quais estabilizam a forma dimérica. (Arni *et al.*, 1995; de Azevedo *et al.*, 1997a,b,c; da Silva Giotto *et al.*, 1997). Por outro lado, a homóloga de fosfolipase A_2 de *Agkistrodon piscivorus piscivorus* (Holland *et al.*, 1990; Scott *et al.*, 1992) e a miotoxina II de *Bothrops (Cerrophidion) godmani* (GodTX-II; de Azevedo Jr. *et al.*, 1997c) são observadas como monômeros no estado cristalino. No caso da GodTX-II, notou-se em gel SDS-PAGE uma forma dimérica da proteína, indicando que a forma monomérica observada pela

unesp

cristalografia de raios X, pode ser um artefato resultante do processo de cristalização (de Azevedo Jr. *et al.*, 1997c). da Silva Giotto *et al.*, (1997) obtiveram duas formas cristalinas da bothropstoxina-I, denominadas forma "aberta" e "fechada". Outras estruturas de homólogas de fosfolipases A_2 da espécie de *Bothrops* mostram variações no ângulo entre os dois monômeros (de Azevedo Jr. *et al.*, 1997a,b), sugerindo que sub-estados da forma "aberta" e "fechada" podem existir. Isto é sustentado por estudos espectroscópicos que indicam um equilíbrio entre forma "aberta" e "fechada" existente em solução (da Silva Giotto *et al.*, 1997).

Mudanças na hidratação tem sido observado na mudança de conformação de muitas proteínas alostéricas (Parsegian *et al.*, 1994) e a desidratação da interface proteína-lipídeo foi sugerido ser um fator que promove a transição estrutural associado com a transição E^* para E^*L na fosfolipase A_2 de porco (Jain *et al.*, 1993). É tentador especular que a conformação do dímero mais aberta, observado na estrutura da MjTX-II, é um resultado da hidratação da região da interface. Mudanças de hidratação na ligação do lipídeo podem promover mudanças na estrutura quaternária das homólogas de fosfolipases A_2 diméricas, e tal mudança estrutural na membrana associada a proteína pode resultar na reorganização da

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

integridade da membrana, o que tem relevância para a atividade independente Ca^{2+} que danifica a membrana.

Uma ilustração esquemática do dímero da MjTX-II está apresentado na figura 17. A estrutura é muito similar àquelas das fosfolipases A_2 determinadas de outros venenos de várias espécies de *Bothrops* (Arni and Ward, 1996). A estrutura da MjTX-II é estabilizada por sete pontes de dissulfeto (27:125, 29:45, 44:105, 50:133, 51:98, 61:91, 84:96) e compreende uma hélice no N-terminal (resíduos 2-12) seguida do laço de ligação do cálcio (resíduos 25-35) e de uma segunda hélice (resíduos 40-55). Temos, então, a Asa-β (resíduos 75-84) seguida pela terceira hélice que é anti-paralela à segunda hélice. A numeração dos resíduos seguiu o esquema proposto por Renetseder *et al*., (1985).

Como apresentado na figura 17, a MjTX-II é um dímero no estado cristalino, que é estabilizado por interações entre as pontas da Asa-β e os últimos resíduos do N-terminal, uma relação anteriormente relatada para a Miotoxina II de *B. asper* (BaspTX-II) (Arni *et al*., 1995). O átomo Nζ da Lis 49 forma ligações de hidrogênio com os átomos de oxigênio carbonil do laço de ligação de Ca^{2+}, e fornece uma base estrutural para a diminuição da atividade catalítica (Arni *et al*., 1995; Holland *et al*., 1990; Scott *et al*., 1992).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

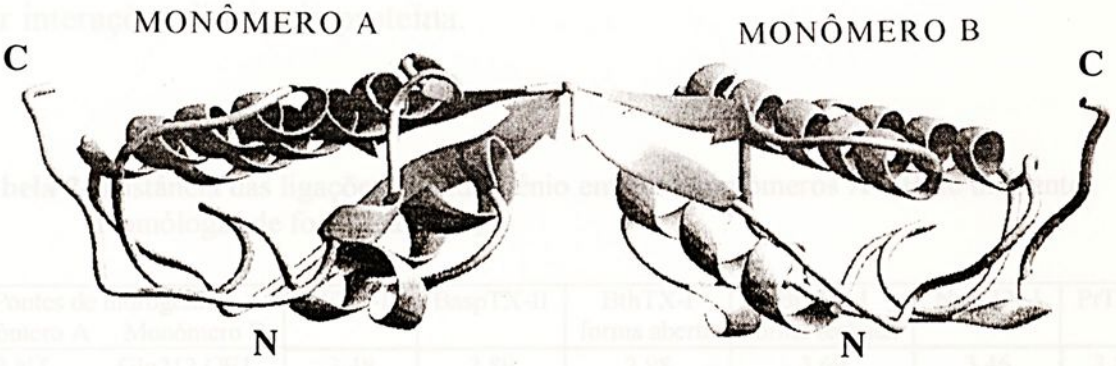


Figura 17- Representação esquemática da estrutura dimérica da MjTX-II. Os N- e C-terminais estão indicados.

O dímero da MjTX-II é estabilizado principalmente por ligações de hidrogênio intermoleculares, pontes salinas e as 6 ligações de hidrogênio, além de 5 pontes de água observadas entre os monômeros A e B, estas ligações dão origem a uma interface dimérica altamente polar. Duas interações são conservadas entre a MjTX-II e BaspTX-II; (i) a ponte salina entre Lys 80 no monômero A com o oxigênio carbonil do Glu 12 no monômero B, juntamente com a interação recíproca, (ii) ligações de hidrogênio entre Trp 77 no monômero A e átomos de oxigênio da cadeia principal no monômero B (Arni *et al.*, 1995) (Tabela 2). No entanto, embora a interação dimérica na interface da MjTX-II envolva uma rede de

5 moléculas de água, a interface da BaspTX-II está estabilizada somente por interações diretas da proteína.

Tabela 2- Distância das ligações de hidrogênio entre os monômeros A e B de diferentes Homólogas de fosfolipases A_2.

Pontes de hidrogênio		MjTX-II	BaspTX-II	BthTX-I	BthTX-I	NumTX-I	PrTX-I
Monômero A	Monômero B			forma aberta	forma fechada		
Lys80 NZ	Glu212 OE1	3.48	2.89	2.98	3.69	3.46	3.51
Lys80 NZ	Glu212 OE2	2.95	2.87	2.56	3.02	2.89	3.03
Lys80 NZ	Lys80 O	2.76	3.43	2.46	2.87	2.61	2.62
Lys280 NZ	Glu12 OE1	3.54	3.22	3.02	3.57	3.15	3.36
Lys280 NZ	Glu12 OE2	2.88	2.98	3.82	2.82	2.77	3.24
Lys280 NZ	Lys80 O	2.72	2.96	3.28	2.79	2.87	2.78
Trp77 NE1	Glu212 O	3.70	3.46	3.69	3.33	-----	3.00
Trp277 NE1	Glu12 O	3.62	3.91	2.84	3.53	-----	3.14

Na figura 18, comparou-se o gráfico das distâncias entre os carbonos alfa da MjTx-II com outros homólogos de fosfolipases A_2. Na figura 18A foi feita a comparação entre o monômero A e B da MjTX-II. O resultado mostra que não há grandes diferenças entre os monômeros. Contudo, existem algumas regiões (resíduos de aminoácidos 82 a 85 e 120 a 133) onde os picos são maiores, isto se deve ao fato de que estas regiões são muito flexíveis. Nos demais gráficos (18B, 18C, 18D e 18E) observa-se que os picos são mais acentuados nestas regiões (resíduos de aminoácidos 82 a 85 e 120 a 133), já que aqui a MjTX-II foi comparada a outras homólogas de fosfolipases A_2 e nestas últimas algumas substituições de aminoácidos ocorrem intensificando estas diferenças (ver figura do

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

alinhamento). Observa-se pela análise dos gráficos (18A, 18B, 18C, 18D e 18E) que existem outros picos menores, estes são devido à regiões de alça ("loop") que permitem aos resíduos de aminoácidos uma maior liberdade de movimentação. Observa-se, por exemplo, picos em todos os gráficos entre os aminoácidos 28-35 (região da alça de ligação de cálcio). Por outro lado, observa-se que entre os resíduos de aminoácidos 40-55 e 70-110 os picos são baixos, isto porque estas regiões compõem as hélices II e III as quais são estabilizadas por quatro pontes de dissulfeto (29:45, 44:105, 50:133 e 51:98).

Embora, a estrutura cristalina da MjTX-II seja altamente similar àquela de BthTX-I, a sobreposição dos dois dímeros revela uma diferença na orientação relativa entre os monômeros constituintes. Os baixos valores de rms para a cadeia principal da sobreposição de ambos monômeros A e B de cada dímero, indica que os monômeros são estruturas altamente homólogas. Isto sugere que, a movimentação relativa dos monômeros, dá origem as diferenças observadas entre os dois dímeros, e como resultado deste movimento, o dímero da MjTX-II adota uma conformação mais aberta quando, comparado ao dímero da BthTX-I (Figura 19).

unesp

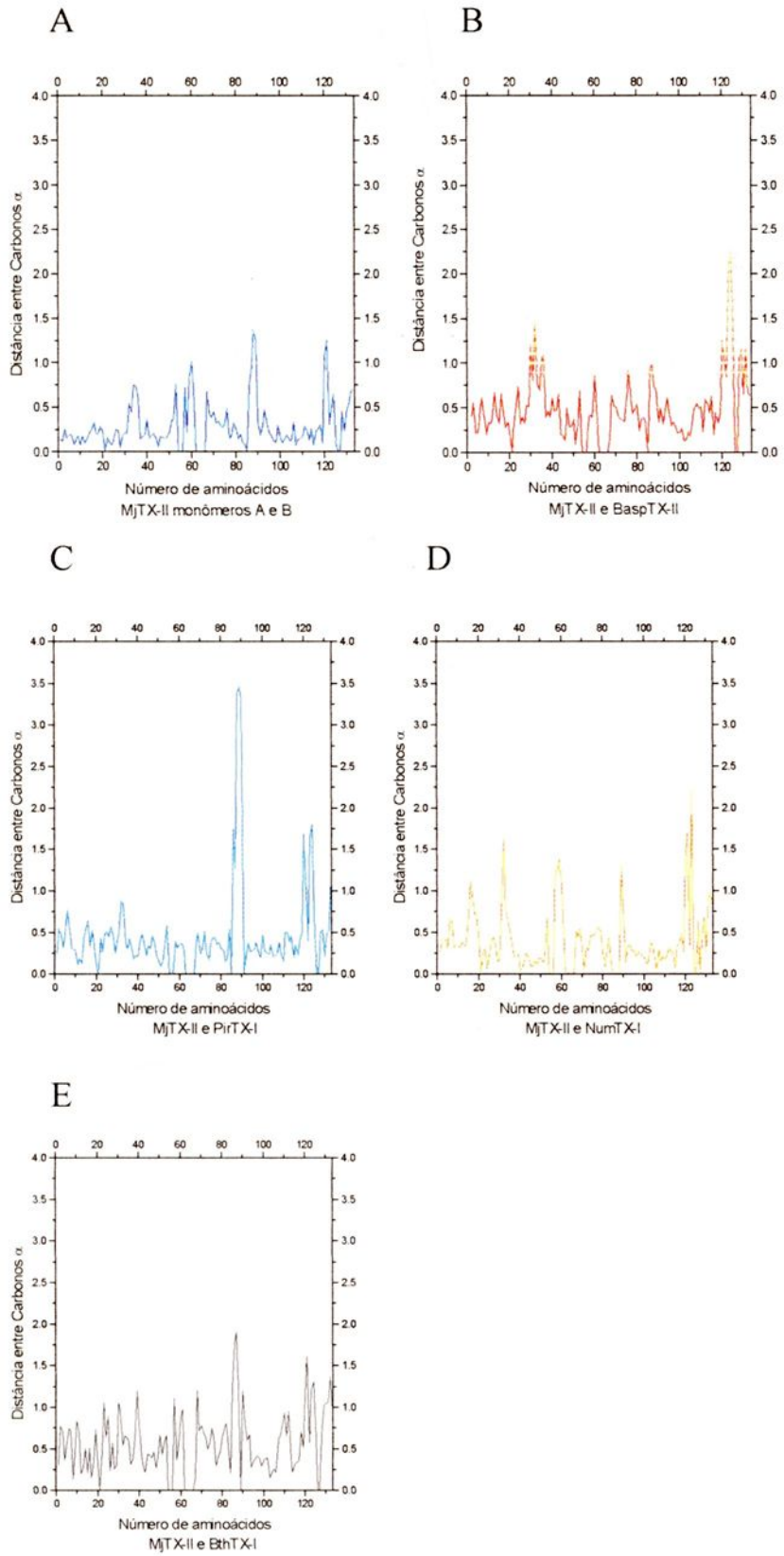


Figura18- Gráficos com as distâncias entre carbonos alfa de diferentes Homólogas de fosfolipase A_2.

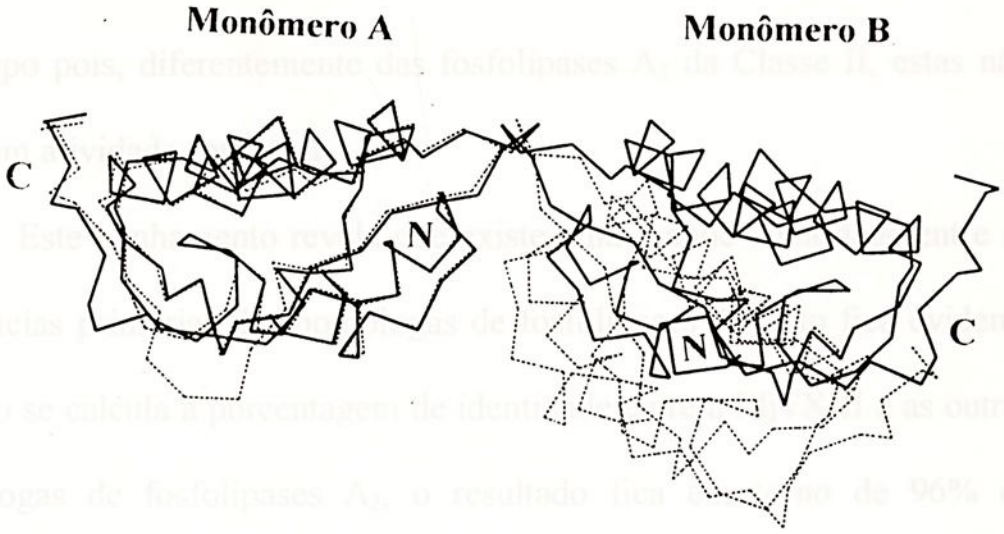


Figura 19- Sobreposição dos carbonos alfa dos monômeros de MjTX-II (linhas cheias) e BthTX-I (linhas pontilhadas). O N- e C-terminal estão em evidência.

5.5. Análise da sequência primária e da estrutura tridimensional das fosfolipases A_2

A figura 20 mostra o alinhamento das sequências primárias de várias fosfolipases A_2.

Para o alinhamento utilizou-se sequências primárias das homólogas de fosfolipases A_2 (1 a 5), fosfolipases A_2 da Classe I (6 e 7), fosfolipases A_2 da Classe II (8 e 9) e fosfolipase A_2 de abelha (10). As homólogas de fosfolipases A_2 pertencem à Classe II, utilizando-se o critério das posições das pontes de dissulfeto (Renetseder, 1987), mas serão analisadas como um

subgrupo pois, diferentemente das fosfolipases A_2 da Classe II, estas não possuem atividade catalítica.

Este alinhamento revela que existe uma grande identidade entre as sequências primárias das homólogas de fosfolipases A_2. Isto fica evidente quando se calcula a porcentagem de identidade entre a MjTX-II e as outras homólogas de fosfolipases A_2, o resultado fica em torno de 96% de identidade. No entanto, quando se compara a MjTX-II à fosfolipase A_2 da Classe III, fosfolipase A_2 de abelha, nota-se que existe apenas 4% de identidade entre estas proteínas. Isto ocorre também para a Classe I e para as fosfolipases Asp49 da Classe II. A comparação da MjTX-II com as fosfolipases da Classe I mostrou uma identidade de 36% e com as fosfolipases da Classe II foi de 50% (Tabela 3). Quando se calcula a porcentagem de homologia entre as homólogas de fosfolipase A_2 e a MjTX-II fica mais evidente o quanto a estrutura primária destas proteínas são similares (98% de homologia) como ilustra a tabela 3. A porcentagem de homologia para as fosfolipases A_2 das outras Classes também aumenta consideravelmente, pois em homologia considera-se além dos resíduos de aminoácidos idênticos, os resíduos conservados (uma substituição conservativa seria substituir um aminoácido hidrofóbico por outro hidrofóbico e assim por diante).

unesp

Outro ponto importante da análise das sequências primárias é com relação a conservação dos resíduos do sítio ativo. Nota-se que estes estão conservados em todas as fosfolipases A_2 das diferentes Classes (caixa azul). Contudo, em relação às homólogas de fosfolipases A_2 há a substituição do resíduo Asp49 para Lys, o que lhes conferem a ausência de atividade catalítica (Scott *et al.*, 1992; Arni *et al.*, 1995). Os resíduos do sítio catalítico da fosfolipase A_2 de abelha também são conservados (caixa azul), todavia, estão em posições diferentes na sequência primária, as posições são: His48/His34; Asp49/Asp35; Tyr73/Tyr87; Asp99/Asp64. No entanto, a região do sítio ativo é conservada na estrutura tridimensional, não alterando a atividade catalítica, como mostra a figura 21 (nesta figura foi utilizada a fosfolipase A_2 Asp49 do pâncreas de porco, já que a utilização da MjTX-II não contribuiria para ilustrar o sítio catalítico, uma vez que estas enzimas possuem um resíduo de lisina).

unesp

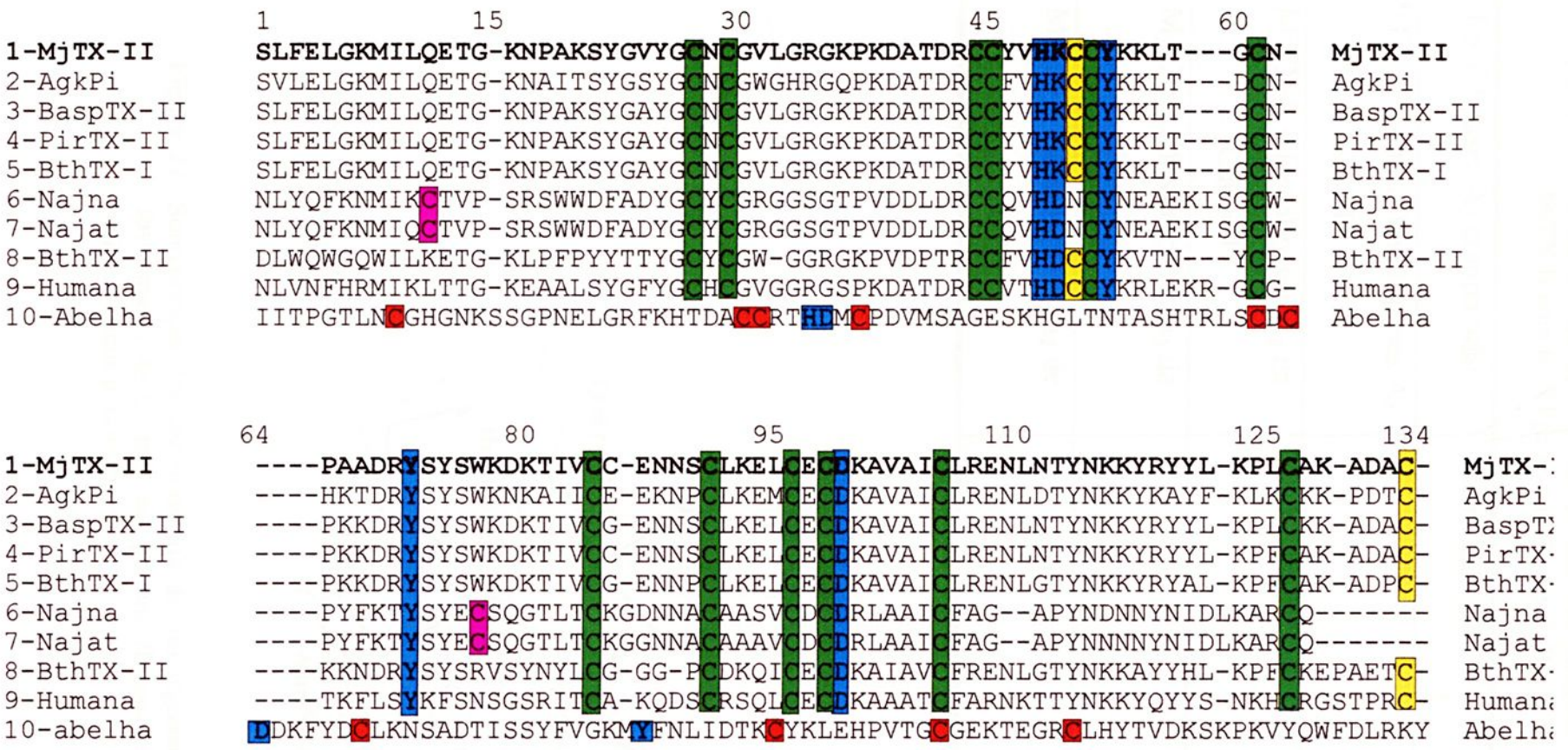


Figura 20- Alinhamento das sequências primárias das fosfolipases A_2 de diferentes fontes. Caixa azul: ilustra os resíduos do sítio ativo; verde: resíduos de cisteína que estão presentes nas fosfolipases A_2 das Classes I e II; caixa amarela: resíduos de cisteína pre somente nas fosfolipases A_2 da Classe II; caixa roxa: resíduos de cisteína presentes somente em fosfolipases A_2 da Classe I; vermelha: resíduos de cisteína presentes na fosfolipase A_2 de abelha.

Tabela 3. Tabela mostrando o resultado das comparações de sequência primária da MjTX-II com fosfolipases das Classes I, II e III.

Fosfolipases A_2 comparadas	Identidade em %	Homologia em %
MjTX-II e outras fosfolipases A_2 Lys49	96	98
MjTX-II e fosfolipases A_2 da Classe I	36	57
MjTX-II e fosfolipases A_2 da Classe II	50	69
MjTX-II e fosfolipases A_2 de abelha	4	31

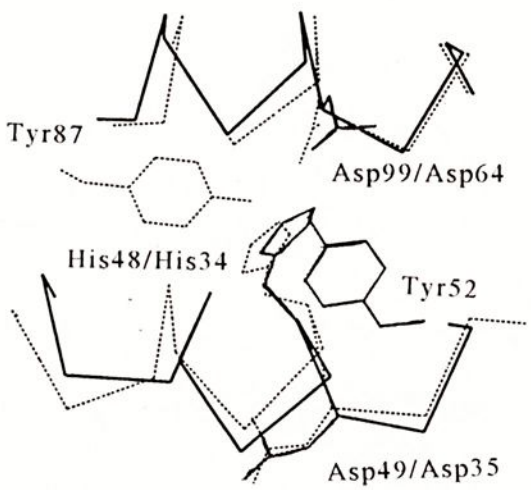


Figura 21- Sobreposição dos carbonos alfa de um segmento das hélices 2 e 3 das fosfolipases A_2 do pâncreas porcino (linha cheia) e do veneno de *Apis melifera* (linha pontilhada).

As pontes de dissulfeto também são altamente conservadas entre as fosfolipases A_2 da Classe I e II. A exceção é a presença da ponte de dissulfeto Cys11-Cys77 nas fosfolipases A_2 da Classe I (caixa rosa, figura 20) e da ponte de dissulfeto Cys50-Cys133 nas fosfolipases A_2 da Classe II (caixa amarela, figura 20), esta diferença é uma das características que diferenciam as duas Classes (Figura 22). Nas caixas verdes estão as outras seis pontes de dissulfeto que são comuns entre as Classes I e II. Com relação à fosfolipase A_2 de abelha as distribuições dos resíduos de meia cistina na sequência primária são diferentes em relação à Classe I e II, bem como o número de pontes de dissulfeto que é de 5.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

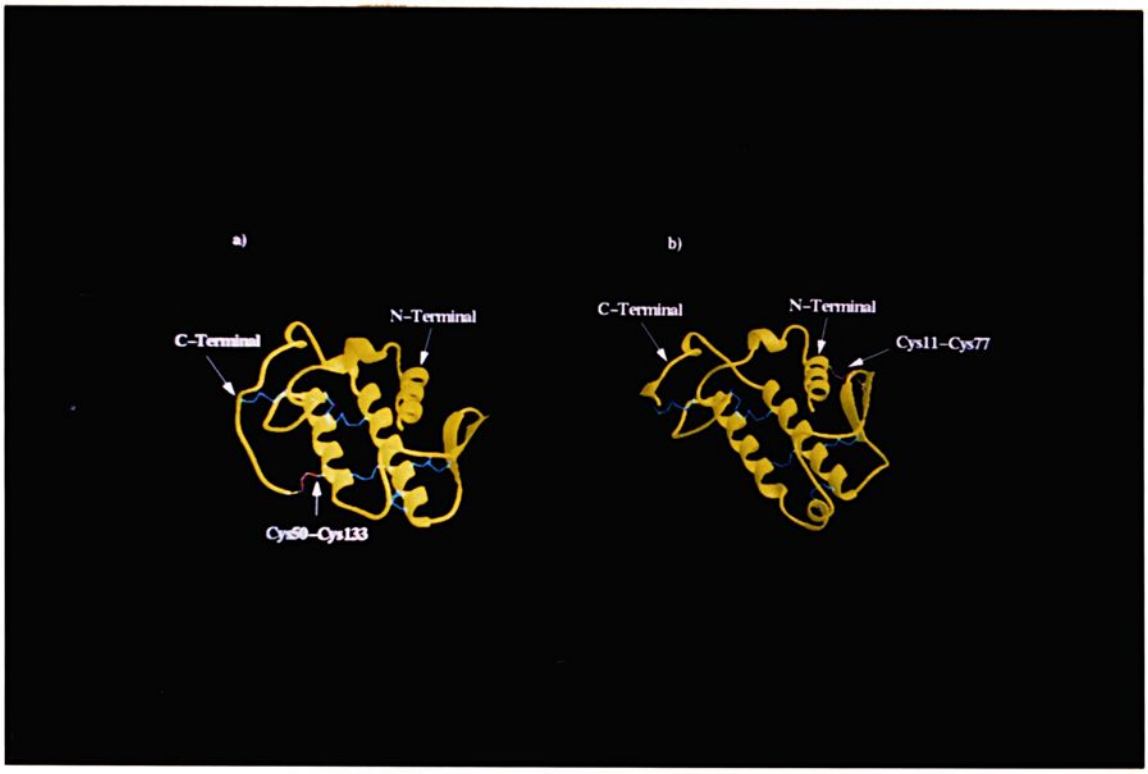


Figura 22- Ilustração da distribuição das pontes de dissulfeto nas fosfolipases A_2 das Classes I e II. Em a) MjTX-II (Classe II) ilustrando a ponte de dissulfeto 50:133 exclusiva da Classe II. E em b) fosfolipase A_2 bovina (Classe I) ilustrando a ponte de dissulfeto 11:77 exclusiva da Classe I. As demais pontes de dissulfeto são comuns à ambas as Classes.

As estruturas das fosfolipases A_2 das Classes I e II são similares. No entanto, ocorrem algumas diferenças entre as duas Classes que torna possível caracterizá-las estruturalmente. A figura 23 ilustra a sobreposição entre a MjTX-II e a fosfolipase A_2 de pâncreas bovino. Observando a figura, nota-se que a região do sítio catalítico está conservada, assim como as hélices I, II e III. A maior diferença entre estas proteínas é a região do C-

Terminal, onde as fosfolipases A_2 da Classe II possuem uma inserção de 5 - 7 resíduos de aminoácidos em relação às fosfolipases A_2 da Classe I. As regiões de "loop", tal como a Asa β e a alça de ligação de cálcio, também se diferenciam, pois são regiões bastante flexíveis.

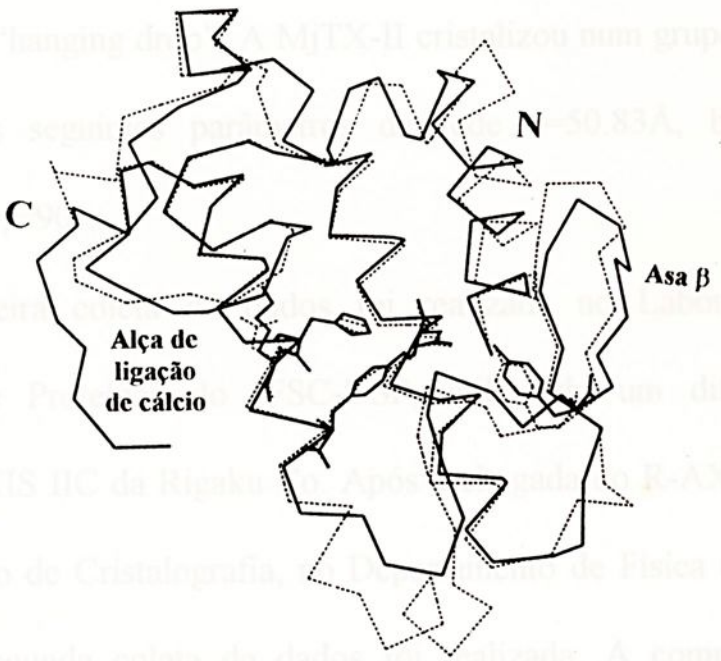


Figura 23- Sobreposição dos carbonos alfa da MjTX-II (linha cheia; Classe II) e fosfolipase A_2 bovina (linha pontilhada; Classe I), com os resíduos do sítio catalítico.

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A condição ideal de cristalização para a MjTX-II foi obtida com a solução tampão HEPES 0.1M pH 7.0, 2% de PEG 400 e 2M sulfato de Amônio.

Para os experimentos de cristalização utilizou-se o método de difusão de vapor "hanging drop". A MjTX-II cristalizou num grupo espacial $P2_12_12_1$, com os seguintes parâmetros de rede a=50.83Å, b=64.55Å, c=88.95Å, $\alpha=\beta=\gamma=90°$.

A primeira coleta de dados foi realizada no Laboratório de Cristalografia de Proteínas do IFSC-USP, utilizando um difratômetro automático R-AXIS IIC da Rigaku Co. Após a chegada do R-AXIS IV em nosso Laboratório de Cristalografia, no Departamento de Física (IBILCE / UNESP) uma segunda coleta de dados foi realizada. A completeza do conjunto de dados foi de 84% até 2.0 Å, com um fator R_{merge}=4.9%.

A estrutura foi resolvida por Substituição Molecular, com o uso do programa AMoRe. O modelo utilizado foi o da *B. asper* resolvida a 2.8Å de resolução. O refinamento utilizou o programa X-PLOR. O modelo final mostrou um fator R_{factor}=19.7% e R_{free}=28.1%.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

Pela análise da sequência primária observa-se que a MjTX-II é 96% idêntica às outras homólogas de fosfolipases A_2. A MjTX-II também possui uma substituição do resíduo Asp49 para Lys como as demais homólogas de fosfolipaases A_2. Esta proteína está incluída na Classe II das fosfolipases A_2, no entanto, difere-se das demais representantes desta Classe por não possuir atividade fosfolipásica. Esta deficiência é devido ao fato de que o Nζ da Lys49 ocupa a posição do cofator cálcio, o qual é essencial para a catálise, uma vez que este auxilia na estabilização do oxiânion no estado tetraédrico intermediário. Contudo, estas enzimas continuam a danificar as membranas das células por um mecanismo independente de Ca^{2+}, o qual permanece em discussão. A MjTX-II mostra diferenças marcantes em relação às fosfolipases A_2 da Classe I nas regiões da alça de ligação de cálcio, Asa β e C-terminal.

Outro ponto importante apresentado pela MjTX-II é a conformação mais aberta que esta apresenta em relação às outras homólogas de fosfolipases A_2. Isto sugere que as homólogas de fosfolipases A_2 possuem sub-estados, ou seja, conformações "abertas" e "fechadas". Sugere-se que estas enzimas quando presentes no citosol da célula e, portanto, inativas estejam na forma fechada não expondo o sítio catalítico. No momento em

unesp

que estas se ligam a membrana o dímero assume uma conformação mais aberta expondo assim o sítio catalítico.

O grupo recentemente estabeleceu uma colaboração com o INPE (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais) de São José dos Campos. Nesta colaboração serão realizados experimentos de cristalização no espaço e uma das proteínas que serão levadas será a MjTX-II. Outro objetivo do grupo é estudar estas homólogas de fosfolipases A_2 com ligantes, tal como, heparina, a fim de tentar localizar o sítio miotóxico destas enzimas.

unesp

7. Bibliografia

ARNDT, U. W., WONACOTT, A. J. *The rotation method in crystallography*. North-Holland, Amsterdam. 1977.

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

ARNI, R. K., WARD, R. J. Phospholipase A_2 - A structural review. *Toxicon*, **34**, 827-841, 1996.

de AZEVEDO JR., W. F., WARD, R. J., LOMBARDI, F. R., GIGLIO, J. R., FONTES, M. R. M., ARNI, R. K. Crystal structure of myotoxin-II: A myotoxic phospholipase A_2 - homologue from *Bothrops moojeni* venom. *Protein and Peptide Letters*. **4**, 329-334, 1997a.

de AZEVEDO JR., W. F., WARD, R. J., CANDURI, F., SOARES, A. M., GIGLIO, J. R., ARNI, R. K. Crystal structure of Piratoxin-I: A calcium-independent, myotoxic phospholipase A_2 - homologue from *Bothrops pirajai* venom.(1997b) *Toxicon*.

de AZEVEDO JR., W. F., WARD, R. J., FONTES, M. R. M., GUTIÉRREZ, J. M., DÍAZ-OREIRO, C., ARNI, R. K. Crystal structure of a monomeric Lys49-phospholipase A_2 homologue isolated from the venom of *Cerrophidion (Bothrops) godmani*. *Arch. Biochem. Biophys.* (submitted).

BERNSTEIN, F. C., KOETZLE, T. F., WILLIAMS, G. J. B., MEYER, E. F. Jr., BRYCE, M. D. RODGERS, J. R., KENNARD, O., SIMANOUCHI, T., TASUMI, M. The protein data bank: a computer based arquival file for macromolecular structures. *J. Molec. Biol.* **112**, 535-542.

BLUNDELL, T. L., JOHNSON, L. N. *Protein crystallography*. Academic Press, New York. 1976.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

BRANDEN, C. AND TOOZE, J. *Introduction to Structure*. Academic Press, New York. 1991.

BRÜNGER, A. T. X-PLOR Version 3.1: A system for crystallography and NMR (Yale University Press, New Haven, 1992).

BRUNIE, S., BOLIN, J., GERWITH, D., SIGLER, P. B. The refined crystal structure of dimeric phospholipase A_2 at 2.5Å. Access to a shielded catalytic site. *J. Biol. Chem.*, **260**, 9742-9749, 1985.

CCP4. The SERC(UK) Collaborative computing project No. 4: A suite of programmes for protein crystallography. *Acta Cryst.* **D50**, 760-763, 1994.

CARSON, M. Ribbons 2.0. *J. Appl. Cryst.*, **24**, 958-961, 1991.

CORDELLA-MIELE, E., MIELE, L., MUKHERJEE, A. B. A novel transglutaminase mediated post-translational modification of phospholipase A_2 dramatically increases its catalytic activity. *J. Biol. Chem.* **265**, 17180-17188, 1990.

DENNIS, E. A. Diversity of Group Types, Regulation, and Function of Phospholipase A_2. *J. Biol. Chem.*, **269,** 13057-13060, 1994.

DÍAZ, C., GUTIÉRREZ, J. M., LOMONTE, B. Isolation and characterization of basic myotoxic phospholipase A_2 from *Bothrops godmani* (Godman's pit viper) snake venom. *Arch. Bioch. Biophys.* **298**, 135-142, 1992.

DICCIANNI, M. B., MCLEAN, L. R., STUART, W. D., MISTRY, M. J., GIL, C. M., HARMONY, J. A. K. Porcine pancreatic phospholipase A_2 isoforms: differencial regulation by heparin. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1082**, 85-93, 1990.

DICCIANNI, M. B., LILLY-STAUDERMAN, M., MCLEAN, L. R., BALASUBRAMANIAM, A., HARMONY, J. A. K. Heparin prevents the binding of phospholipase A_2 to phospholipid micelles: importance of the amino - terminus. *Biochemistry*, **30**, 9090-9097, 1991.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

DIJKSTRA, B. W., DRENTH, J., KALK, K. H., VANDERMAELEN, P. J. Three-dimensional structure and disulfide bond connections in bovine pancreatic phospholipase A_2. *J. Mol. Biol.*, **124**, 53-60, 1978.

DIJKISTRA, B. W., DRENTH, J., KALK, K. H. Active site and catalytic mechanism of phospholipase A_2. *Nature*, **289**, 604-606, 1981.

DRENTH. J. *Principles of protein X-ray crystallography*. Springer-Verlag. New York. USA. 1994.

DUCRUIX, A., GIEGÉ, R. *Crystallization of nucleic acid and proteins*. Oxford University Press, New York. 1992.

DUPUREUR, C. M., YU, B-Z., RAMONE, A., JAIN, M. K., TSAI, M-D. Phospholipase A_2 engineering. The structural and functional roles of aromaticity and hydrophobicity in the conserved phenylalanine-22 and phenylalanine-106 aromatic sandwich. *Biochemistry*, **31**, 10576-10583, 1992.

FONTES, M. R. M. (1995). "Tese de Doutorado". Instituto de Física de São Carlos.

FOX, G. C., HOLMES, K. C. An alternative method of solving the layer scaling equations of hamilton, Rollett and Sparks. *Acta Cryst.* **20**, 886, 1966.

FRANCIS, B., GUTIÉRREZ, J. M., LOMONTE, B., KAISER I. I. Myotoxin II from *Bothrops asper* (Terciopelo) venom is a lysine 49 phospholipase A_2. *Arch. Biochem. Biophys.*, **284**, 352-359, 1991.

FREMONT, D. H., ANDERSON, D. H., WILSON, I. A., DENNIS, E. A., XUONG, N.-H. Crystal structure of phospholipase A_2 from indian snake reveals a trimeric association. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **90**, 342-346, 1993.

GIACOVAZZO, C. *Fundamentals of crystallography*. Oxford Science Publications. Great Britain. 1992.

GUTIÉRREZ, J. M., LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. *Mem. Inst. Butatan*, **51**, 211-233, 1989.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

GUTIÉRREZ, J. M., NUNEZ, J., DÍAZ, C., CINTRA, A. C. O., HOMSI-BRANDEBURGO, M. I., GIGLIO, J. R. Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of Bothropstoxin II, a phospholipase A_2 isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. *Exp. Molec. Path.*, **55**, 217-229, 1991.

GUTIÉRREZ, J. M., LOMONTE, B. Phospholipase A_2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. Review article. *Toxicon*, **33**, 1.405-1.424, 1995.

HAZEN, S. L., STUPPY, R. J., GROSS, R. W. Purification and characterization of canine myocardial cytosolic phospholipase A_2. *J. Biol. Chem.*, **265**, 10622-10630, 1990.

HIGASHI, T. J. PROCESS: A Program for Indexing and Processing R-AXIS II Imaging Plate Data. *J. Appl. Cryst.* **23**, 253-257, 1990.

HOLLAND, D. R., CLANCY, L. L., MURCHMORE, S. W., RYDEL, T. J., EINSPAHR, H. M., FINZEL, B. C., HEINRICKSON, R. L., WATENPAUGH, K. D. The crystal structure of a lysine 49 phospholipase A_2 form the venom of the cottonmouth snake at 2.0Å resolution. *J. Biol. Chem.*, **266**, 17649-17656, 1990.

HOMSI-BRANDEBURGO, M. I., QUEIROZ, L. S., SANTO-NETO, H., RODRIGUES-SIMONI, L., GIGLIO, J. R. Fractional of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. *Toxicon*, **26**, 615-627, 1988.

JAIN, M. K., MALIWAL, B. P. Spectroscopic properties of the states of pig pancreatic phospholipase A_2 at interface and their possible molecular origin. *Biochemistry* **32**, 11838-11846, 1993.

JAIN, M. K., GELB, M. H., ROGERS, J., BERG, O. Kinetic basis for interfacial catalysis by phospholipase A_2. *Meth. Enzym.* **249**, 567-614. 1995.

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

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

JONES, T. A. A graphics model building and refinement system for macromolecules. *J. Appl. Cryst.* **11**, 268-272, 1978.

KILBY, P. M., PRIMROSE, W. U., ROBERTS, E. C. K. Changes in the structure of bovine phospholipase A_2 upon micelle binding. *Biochem. J.*, **305**, 935-944, 1995.

KINI, R. M., EVANS, H. J. A common cytolitic region in myotoxins, hemolysis, cardiotoxins and antibacterial peptides. *Toxicon*, **27**, 613-635, 1989.

KRIZAJ, I., BIEBER, A. L., RITONJA, A., GUBENSEK, F. The primary structure of ammodytin L, a myotoxic phospholipase A_2 homologue from *Vipera ammodytes* venom. *Eur. J. Biochem.*, **202**, 1165-1168, 1991.

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

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

LI, Y., YU, B-Z, ZHU, H, JAIN, M. K., TSAI, M-D. Phospholipase A_2 engineering. Structure and functional roles of the highly conserved active site residue aspartate-49. *Biochemistry*. **33**, 14714-14722, 1994.

LOMONTE, B., TARKOWSKI, A., HANSON, L. A. Broad cytolitic specificity of myotoxin II, a lysine49 phospholipase A_2 of *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* **32**, 1359-1369, 1994a.

LOMONTE, B., MORENO, E., TARKOWSKI, A., HANSON, L. A., MACCARANA, M. Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a Lys49 phospholipase A_2 from *Bothrops asper* snake venom. *J. Biol. Chem.*, **269**, 29.867-29.873, 1994c.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

MALIWAL, B. P., SZMACINSKI, H., SQUIRE, T., VAN-BINSBERGEN, J., SLOTBOOM, A. J., JAIN, M. D. Function significance of the conformational dynamics of the N-terminal segment of secreted phospholipase A_2 at the interface. *Biochemistry*, **33**, 4509-4516, 1994.

MARAGNORE, J. M., MERUTKA, G., CHO, W., WELCHES, W., KEZDY, F. J., HEINRICKSON, R. L. A new class of phospholipase A_2 with lysine in place of aspartate 49. *J. Biol. Chem.*, **259**, 13839-13843, 1984.

MCREE, D. E. *Pratical protein crystallography*. Academic Press, Inc. San Diego, USA. 1993.

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

RAMIREZ, F., JAIN, M. K. Phospholipase A_2 at the bilayer interface. *Prot. Structure, Function Genetics.* **9**, 229-239. 1991

RENETSEDER, R., BRUNIE, S., DIJKSTRA, B. W., DRENTH, J., SIGLER, P. B. A comparison of the crystal structures of phospholipase A_2s from bovine pancreas and Crotalus atrox venom. *J. Biol. Chem.*, **260**, 11627-11636, 1985.

RIGAKU CORPORATION. *The Rigaku Journal*, **12**, n°2, 46-49, 1995.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. Academic Press, New YorK. 1971.

SANCHEZ, E. F., FREITAS, T. V., FERREIRA-ALVES, D. L., VELARDE, D. T., DINIZ, N. R., CORDEIRO, M. N., AGOSTINE-COTTA, G., DINIZ, C. R. Biological activities of venoms from south american snake. *Toxicon*, **30**, 95-103, 1992.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

SATO, M., YAMAMOTO, M., IMADA, K., KATSUBE, Y., TANAKA, N., HIGASHI, T. A High-Speed Data-Collection System for Large-Unit-Cell Crystal Using an Imaging Plate as a Detector. *Acta Cryst*. **25**, 348, 1992.

SCOTT, D. L., WHITE, S. P., OTWINOWSKI, Z., YUAN, W., GELB, M. H., SIGLER, P. B. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A_2. *Science*, **250**, 1541-1546, 1990.

SCOTT, D. L., ACHARI, A., VIDAL, J. C., SIGLER, P. B. Crystallographical and biochemical studies of the (inactive) Lys49 phospholipase A_2 from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*. *J. Biol. Chem.*, **267**, 22465-22657, 1992.

SELISTRE DE ARAÚJO, H. S., WHITE, S. P., OWNBY, C. L. cDNA cloning and sequence analysis of a lysine 49 phospholipase A_2 myotoxin from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom. *Arch. Biochem. Biophys.*, **326**, 21-30, 1996.

da SILVA GIOTTO, M. T., GARRAT, R. C., OLIVA, G., MASCARENHAS, Y. P., GIGLIO, J. R., CINTRA, A. C. O., DE AZEVEDO JR., W. F., ARNI, R. K., WARD, R. J. Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: conformational changes bothropstoxin I, a dimeric Lys49-phospholipase A_2 homologue. *Prot. Struct. Funct. Genet.* (In press).

STRYER, L. Bioquímica. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1988.

TOMASSELLI, A. G., HUI, J., FISHER, J., ZURCHER-NEELY, H., REARDON, I. M., ORIAKU, E. O., KEZDY, F. J., HEINRICKSON, R. L. Dimerization and activation of porcine pancreatic phospholipase A_2 via substrate level acylation of lysine 56. *J. Biol. Chem.*, **264**, 10041-10047, 1989.

VAN DEN BERG, C. J., SLOTBOOM, A. J., VERHEIJ, H. M., DE HAAS, G. H. The role of Asp49 and other conserved amino acids in phospholipases A_2 and their importance for enzymatic activity. *J Cell Biochem.*, **39**, 379-390, 1989.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

VRIEND, G. WHATIF: a molecular modelling and drug design programm. *J. Mol. Graph.*, **8**, 52-55, 1990.

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

WERY, J. P., SCHEVITZ, R. W., CLAWSON, D. K., BOBBITT, L. L., DOW, E. R., GAMBOA, G., GOODSON, T., HERMAN, R. B., KRAMER, R. M., MCCLURE, D. B., MIHELICH, E. D., PUTMAN, J. E., SHARP, J. D., STARK, D. H., TEATER, C., WARRICK, M. W., JONES, N. D. Structure of Recombinant Human Rheumatoid Arthritic Synovial Fluid Phospholipase A_2 at 2.2Å Resolution. *Nature*, **352**, 79-82, 1991.

WOLF, R. A., GROSS, R. W. Identification of neutral active phospholipase C which hydrolyzes choline glycerophospholipids and plasmalogen selective phospholipase A_2 in canine myocardium. *J. Biol. Chem.*, **260**, 7295-7303, 1985.

YU, B-Z., BERG, O. G., JAIN, M. K. The divalent cation is obligatoly for the binding of ligands to the catalytic site of secreted PLA_2. *Biochemistry*, **32**, 6485-6492, 1993.

Curriculum Vitae

Fábio Renato Lombardi nasceu no dia 19 de setembro de 1971 em São José do Rio Preto – S.P.

Realizou o curso de graduação de Bacharel em Ciências Biológicas no câmpus da UNESP de São José do Rio Preto, iniciando o curso em 10 de fevereiro de 1992 e concluindo-o em 07 de dezembro de 1995.

Realizou estágio de iniciação científicano Departamento de Biologia do0 mesmo câmpus, na área de Bioquímica aplicada à Microbiologia, sob a orientação da Profa. Dra. Eleni Gomes, onde desenvolveu um projeto de pesquisa intitulado: Produção de enzima nucleolítica em resíduo de indústria de processamento de suco de laranja, utilizando *Penicillium citrinum*. No Departamento de Física desta unidade, realizou estágio sob orientação do Prof. Dr. R. K. Arni, no laboratório de cristalografia de proteínas, no período de agosto de 1995 a dezembro de 1995, objetivando aprender as técnicas básicas de cristalização de proteínas. Durante este estágio desenvolveu um projeto intitulado: Cristalização das Lectinas de *Parkia platycephala* e *Parkia pendula*.

Durante o mestrado, realizou um curso intitulado: Princípios de Engenharia Genética, ministrado pelo Prof. Dr. Adilson Leite, no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), durante o mês de julho de 1996.

Participou da XXV[a] Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), realizada em Caxambu – M.G., no período de 04 a 07 de maio de 1996, apresentando trabalho intitulado: "**Affinity chromatography of type I hexokinase from rat brain mitocondria**", e na XXVI[a] Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), realizada em



Caxambu – M.G. no período de 03 a 06 de maio de 1997, apresentando trabalho intitulado: "**Crystallization and preliminary X-ray reffraction data of a blood platelet aggregation inibitor S_{III}-SP_{III} isolated from the venom of *Bothrops jararacussu***".

Participou também do VII[a] Workshop Anual de Usuários do LNLS, Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas, de 10 a 14 de novembro de 1997, apresentando trabalho intitulado: "Cristalização e análise cristalográfica preliminar das Lectinas de *Parkia platycephala* e isoforma de *Parkia pendula*".

Durante o mestrado, desenvolveu dois outros projetos em paralelo, são eles: 1. Cristalização das Lectinas de *Parkia platycephala, Parkia pendula* e isoforma de *Parkia pendula*, sendo que, os resultados da cristalização e da coleta de dados de difração de raios X desta última proteína, resultou num manuscrito submetido para publicação na revista *Protein and Peptide Letters*, 2. Cristalização da fração S_{III}-SP_{III} de *Bothrops jararacussu*, que também foi submetido para publicação na mesma revista.



Lista de Publicações

A. M. Soares, V. M. Rodrigues, M. I. Homsi-Brandeburgo, M. H. Toyama, F. R. Lombardi, R. K. Arni and J. R. Giglio (1997). A Rapid Procedure for the Isolation of Myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca) Venom: Biochemical Characterization, Myonecrotic Activity and Crystallization. *Toxicon*. (Aceito) (Anexo 2).

W. F. de Azevedo Jr., R. J. Ward, F. R. Lombardi, J. R. Giglio, M. R. M. Fontes and R. K. Arni (1997). Crystal Structure of Myotoxin II: A Myotoxic Phospholipase A_2 – Homologue from *Bothrops moojeni* Venom. *Protein and Peptide Letters*. (Aceito) (Anexo 3).

F. R. Lombardi, M. R. M. Fontes, G. M. O. Souza, L. C. B. B. Coelho, R. K. Arni and W. F. de Azevedo Jr. (1998). Cristallization and Preliminary X-ray Analysis of *Parkia pendula* Lectin. *Protein and Peptide Letters*. (Aceito).

W. F. de Azevedo Jr., M. R. M. Fontes, R. J. Ward, F. R. Lombardi, A. C. O. Cintra, J. R. Giglio and R. K. Arni (1998). Cristallization and Preliminary X-ray Analysis of S_{III}-SP_{III}, a Phospholipase A_2 Isolated from the Venom of *Bothrops jararacussu*. *Protein and Peptide Letters*. (Submetido).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

Anexo I

Condições de Cristalização

	SAL	TAMPÃO	PRECIPITANTE
1	0,05M Cloreto de cálcio	0,1M Acetato	30% MPD
2	----	----	0,4M Tartarato de Na/K
3	----	----	0,4M Fosfato de amônio
4	----	0,1M Tris	2,0M Sulfato de amônio
5	0,2M Citrato de sódio	0,1M Hepes	40% MPD
6	0,2M Cloreto de magnésio	0,1M Tris	30% PEG 4 K
7	----	0,1M Cacodilato	1.5M Acetato de sódio
8	0,2M Citrato de sódio	0,1M Cacodilato	30% Isopropanol
9	0,2M Acetato de amônio	0,1M Citrato	30% PEG 4 K
10	0,2M Acetato de amônio	0,1M Acetato	30% PEG 4 K
11	----	0,1M Citrato	1,0M Fosfato de amônio
12	0,2M Cloreto de magnésio	0,1M Hepes	30% Isopropanol
13	0,2M Citrato de sódio	0,1M Tris	30% PEG 400
14	0,2M Cloreto de cálcio	0,1M Hepes	28% PEG 400
15	0,2M Sulfato de amônio	0,1M Cacodilato	30% PEG 8 K
16	----	0,1M Hepes	1,5M Sulfato de lítio
17	0,2M Sulfato de Lítio	0,1M Tris	30% PEG 4 K
18	0,2M Acetato de magnésio	0,1M Cacodilato	25% PEG 8 K
19	0,2M Acetato de amônio	0,1M Tris	30% Isopropanol
20	0,2M Sulfato de amônio	0,1M Acetato	25% PEG 4 K
21	0,2M Acetato de magnésio	0,1M Cacodilato	30% MPD
22	0,2M Acetato de sódio	0,1M Tris	30% PEG 4 K
23	0,2M Cloreto de magnésio	0,1M Hepes	30% PEG 400
24	0,2M Cloreto de cálcio	0,1M Acetato	20% Isopropanol
25	0,1M Sulfato de cádmio	0,1M Hepes	1,0M Acetato de sódio
26	0,2M Acetato de amônio	0,1M ácido cítrico	30% MPD
27	0,2M Citrato de sódio	0,1M Hepes	20% Isopropanol
28	0,2M Acetato de sódio	0,1M Cacodilato	30% PEG 8 K
29	----	0,1M Hepes	0,8M Tartarato de Na/K
30	0,2M Sulfato de amônio	----	30% PEG 8 K
31	0,2M Sulfato de amônio	----	30% PEG 4 K
32	----	----	2,0M Sulfato de amônio
33	----	----	4,0M Formiato de sódio
34	----	0,1M Acetato	2,0M Formiato de sódio
35	----	0,1M Hepes	1,6M Fosfato de Na/K
36	----	0,1M Tris	8% PEG 8 K
37	----	0,1M Acetato	8% PEG 4 K
38	----	0,1M Hepes	1,4M Citrato de sódio



	SAL	TAMPÃO	PRECIPITANTE
39	----	0,1M Hepes	2% PEG 400 2,0M Sulfato de amônio
40	----	0,1M Citrato	20% Isopropanol 20% PEG 4 K
41	----	0,1M Tris	10% Isopropanol 20% PEG 4 K
42	0,05M Fosfato de potássio	----	20% PEG 8 K
43	----	----	30% PEG 1500
44	----	----	0,2M Formiato de Mg
45	0,2M Acetato de zinco	0,1M Cacodilato	18% PEG 8 K
46	0,2M Acetato de cálcio	0,1M Tris	18% PEG 8 K
47	----	0,1M Acetato	2,0M Sulfato de amônio 5% Isopropanol
48	0,8M Sulfato de lítio	----	2% PEG 8 K
49	1,0M Sulfato de lítio	----	10% PEG 8 K
50	----	----	1,0M Imidazol
51	----	0,1M Hepes	70% MPD
52	0,1M Cloreto de cádmio	0,1M Acetato	30% PEG 400
53	0,02M Cloreto de cádmio	0,1M Hepes	30% PEG 4 K



ANEXO 2

Pergamon

PII: S0041-0101(97)00133-5

Toxicon Vol. 36, No. 3, pp. 503–514, 1998
© 1998 Elsevier Science Ltd. All rights reserved
Printed in Great Britain
0041-0101/98 $19.00 + 0.00

A RAPID PROCEDURE FOR THE ISOLATION OF THE LYS-49 MYOTOXIN II FROM *BOTHROPS MOOJENI* (CAISSACA) VENOM: BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION, CRYSTALLIZATION, MYOTOXIC AND EDEMATOGENIC ACTIVITY

A. M. SOARES,[1] V. M. RODRIGUES,[2] M. I. HOMSI-BRANDEBURGO,[2] M. H. TOYAMA,[3] F. R. LOMBARDI,[1] R. K. ARNI[4] and J. R. GIGLIO[1]*

[1]Departamento de Bioquímica, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 14049-900 Ribeirao Preto, SP, Brazil, [2]Departamento de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia-MG, Uberlandia, MG Brazil, [3]Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade de Campinas-SP, Campinas, SP, Brazil; and [4]Departamento de Física, IBILCE, Universidade Estadual Paulista, Sao Jose do Rio Preto, SP, Brazil

(*Received* 23 *April* 1997; *accepted* 15 *August* 1997)

A. M. Soares, V. M. Rodrigues, M. I. Homsi-Brandeburgo, M. H. Toyama, F. R. Lombardi, K. Arni and J. R. Giglio. A rapid procedure for the isolation of the Lys-49 myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: Biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. *Toxicon* **36**, 503–514, 1998.—*Bothrops moojeni* snake venom was fractionated on a CM-Sepharose column which was previously equilibrated with 0.05 M ammonium bicarbonate buffer at pH 8.0 and subsequently eluted with an ammonium bicarbonate concentration gradient from 0.05 to 0.5 M at constant pH (8.0) and temperature (25 C). The fraction which eluted last (M-VI) showed, after direct lyophilization, a single band by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and SDS-PAGE, indicating an approximate M_r of 14 000 and 27 000, in the presence and absence of dithiothreitol, respectively. Its amino acid composition revealed a high level of hydrophobic and basic amino acids as well as 14 half-cystine residues. Its isoelectric point and extinction coefficient ($E^{1.0\ mg\ ml}_{1.0\ cm}$ at 278 nm and pH 7.0) were 8.2 and 1.170, respectively. M-VI was devoid of phospholipase A_2 (PLA_2) activity on egg yolk, as well as of hemorrhagic, anticoagulant and coagulant activities, but could induce drastic necrosis on skeletal muscle fibres as well as rapid and transient edema on the rat paw. Its N-terminal sequence: SLFELGKMIL-QETGKNPAKSYGVYGCNCGVGGRGKPKDATDRCCYVHKCCYK... revealed high homology with other Lys 49 PLA_2-like myotoxins from other bothropic venoms. Orthorhombic crystals of M-VI, which diffracted to a maximal resolution of 1.6 Å, were obtained and indicated the presence of a

* Author to whom correspondence should be addressed.

dimer in the asymmetrical unit. © 1998 Elsevier Science Ltd. All rights reserved

Keywords: *Bothrops moojeni*, myotoxin-II, myonecrosis, crystallization

INTRODUCTION

Phospholipases A_2 (PLA_2s, E.C. 3.1.1.4) are largely distributed in nature a.ad are found both intra and extracellularly (Bosch, 1980). Extracellular PLA_2s are abundant in pancreatic secretion and in snake and arthropod venoms.

Snake venoms PLA_2s are able to induce several biological effects such as pre or postsynaptic neurotoxicity, cardiotoxicity, myotoxicity, platelet aggregation inhibition, edema, hemolysis, anticoagulation, convulsion and hypotension (Kini and Iwanaga, 1986a,b).

During the last fifteen years, there has been considerable interest in the study of the venom components responsible for myonecrosis and their modes of action. As a result, several myotoxins from bothropic venoms have been isolated and characterized (Gutiérrez and Lomonte, 1995). Myotoxic PLA_2s from bothropic venoms may be divided into two major classes: those with enzymatic activity on artificial substrates, the Asp 49 myotoxic PLA_2s, and those lacking this catalytic activity, the Lys 49 myotoxins (Maraganore *et al.*, 1984; Homsi-Brandeburgo *et al.*, 1988; Gutiérrez and Lomonte, 1995; Mancuso *et al.*, 1995; Arni and Ward, 1996). Additionally, natural occurring PLA_2 homologous have been isolated which possess Ser (Krizaj *et al.*, 1991) or Ala (Liu *et al.*, 1991) at position 49, both of these substitutions resulting in catalytically inactive proteins.

Lomonte *et al.* (1990) have reported a two-step chromatographic procedure for the isolation and partial characterization of two basic myotoxins from *Bothops moojeni* snake venom, referred to as myotoxins-I and -II. The present paper describes a simplified, rapid, dialysis-free, one-step procedure for the isolation of the most basic myotoxin from this venom, myotoxin-II, its biochemical characterization, myotoxic activity, crystallization and N-terminal sequence up to the 53rd amino acid residue.

MATERIALS AND METHODS

CM-Sepharose was purchased from Pharmacia (Uppsala, Sweden). Molecular weight markers, polyethylene glycol 400 (PEG-400) and *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethane-sulphonic acid (HEPES) were from Sigma Chem. Co. Highly purified, lyophilizable ammonium bicarbonate was synthesized as previously described (Sampaio *et al.*, 1983). All other reagents were of analytical or sequanal grade.

Purification procedure

Desiccated *B. moojeni* venom (200 mg, from snakes of the State of São Paulo, Brazil) was dispersed in 2.5 ml of 0.05 M ammonium bicarbonate buffer at pH 8.0 and cleared by centrifugation at 480 × g for 10 min at room temperature. An aliquot of this solution was used for measurement of the total absorbance at 280 nm ($A_{280\,nm}$) and total protein estimation by the microbiuret method of Itzhaki and Gill (1964). The clear solution was applied on a CM-Sepharose column (2.0 × 20 cm) which was previously equilibrated with the same buffer. Elution started with this low buffer concentration followed by a concentration gradient from 0.05 to 0.5 M at pH 8.0 and 25 C. Fractions of 3 ml tube were collected at a flow rate of 20 ml h using an LKB fraction collector connected to a U.V. detector device. Absorbances at 280 nm were also read in a Beckman spectrophotometer and conductivities of the collected fractions were monitored with a Beckman RC-16C conductimeter.

Biochemical characterization

Fraction M-VI was assayed for purity by PAGE, following the method of Reisfeld *et al.* (1962) for basic proteins and by SDS-PAGE according to Laemmli (1970).

The extinction coefficient ($E^{1.0\ mg\ ml}_{1.0\ cm}$) at λ = 278 nm, pH = 7.0, was evaluated at different protein concentrations (0.25 to 2.0 mg ml). In addition, the following determinations were carried out for the isolated protein as previously detailed (Homsi-Brandeburgo *et al.*, 1988): amino acid composition (Spackman *et al.*, 1958), isoelectric point (Vesterberg, 1972), N-terminal amino acid residue (Gray, 1972) and amino terminal sequence, up to the 53rd amino acid residue of the reduced and carboxymethylated toxin, using an Applied Biosystem Sequencer, model 477A (Toyama *et al.*, 1995).

Enzymatic and biological assays

The edematogenic activity was assayed as described by Lloret and Moreno (1993) using 180–200 g Wistar rats. Aliquots of 50 μg of the purified toxin were diluted with 100 μl saline (0.9%, w/v, NaCl) and injected in the subplantar region of the right paw (n = 6), whereas in the left paw the same volume of saline alone was injected as a control. The edema formation was measured with the use of a plethysmograph, computerized at several time intervals (0, 0.5, 1, 2, 4 and 24 h). Edematogenic activity was expressed in percent of volume increase of the right paw as compared to the left one.

The myotoxic activity was assayed on the basis of the morphologic alterations induced by i.m. injections of 50 μg toxin in the right gastrocnemius skeletal muscle of Swiss mice (n = 6). After 24 h, the animals were sacrificed by deep anesthesia with ethyl ether and a small section of the central region of the muscle was excised and soaked in fixing solution [95% (v/v) ethanol 40% (w/v) formaldehyde glacial acetic acid H_2O, 3:1:1:5 (v/v)]. The material was then dehydrated by increasing concentrations of ethanol and processed for inclusion in glycol metacrylate. The resulting blocks were sliced in 2.5 μm thick sections, stained with 0.25% (w/v) toluidine blue and examined under a light microscope.

The PLA_2 activity was determined by potentiometric titration using an egg yolk emulsion, which contained phosphatidylcholine, as a substrate, as described by De Haas *et al.* (1968). Other additional activities assayed were: anticoagulant, using citrated bovine plasma (Alvarado and Gutiérrez, 1988); hemorrhagic, through i.d. injections in the back of mice (Nikai *et al.*, 1984) and coagulant, using citrated bovine plasma or purified fibrinogen (Selistre and Giglio, 1987; Assakura *et al.*, 1992).

Crystallization

Multiple crystallization trials were set up in Linbro tissue culture plates by the micro-vapour diffusion hanging drop method (Ducrix and Geige, 1992). A stock protein solution was prepared by dissolving the lyophilized sample in distilled water at room temperature (20 C) to a concentration of 15.0 mg ml. Initially, the crystallization conditions were screened using the sparse matrix sampling techniques (Jancarik and Kim, 1991) in which 0.5 μl of the protein solution suspended on siliconized microscope-slide coverslips were equilibrated against 0.5 ml of the reservoir solution. The best crystals were obtained from 0.1 M HEPES, 2.0 M ammonium sulphate and 2.0% (v/v) PEG400 (pH 5.5). Once the optimal conditions for crystallization were determined, the volume of the protein was increased to 4 μl. The crystals were then mounted in thin-walled glass capillaries along with a small quantity of mother liquor to prevent dehydration. A native X-ray diffraction data set was collected from a single crystal on a Rigaku R-AXIS IIC imaging plate detector and X-rays were generated by a Rigaku RU200 rotating anode X-ray generator operating at 50 kV and 100 mA, utilizing a graphite monochromator and a 0.3 mm collimator. The detector-to-imaging plate distance was set to 58.4 mm and the swing angle at 0°. Two still images were recorded. A complete X-ray diffraction data set was collected to 1.6 Å. The cell parameters were then refined further and the data processed utilizing the software package PROCESS (Higashi, 1990). The integrated intensities for both full and partial reflections were obtained using profile fitting in which both temperature and intensity factors were used for scaling (R_{merge} = 5.5%). The reflection files were then examined.

RESULTS

Figure 1(A) illustrates the chromatographic profile of the venom fractionation on CM-Sepharose. The main protein fractions were pooled and named M-I_{a+b}, M-II_{a+b}, M-III, M-IV_{a+b}, M-V and M-VI. PLA_2, coagulant and hemorrhagic activities are indicated in Table 1. Table 1 presents also the recovery in absorbance and total protein. Fraction M-VI (myotoxin II) accounts for 7% (w/w) of the desiccated venom. The ($E^{1.0\ mg\ ml}_{1.0\ cm}$) of M-VI at 278 nm and pH 7.0 was 1.170.

PAGE of the whole venom and M-VI is shown in Fig. 1(B). The toxin, basic in character, appeared as a single electrophoretic band. Manual identification of the

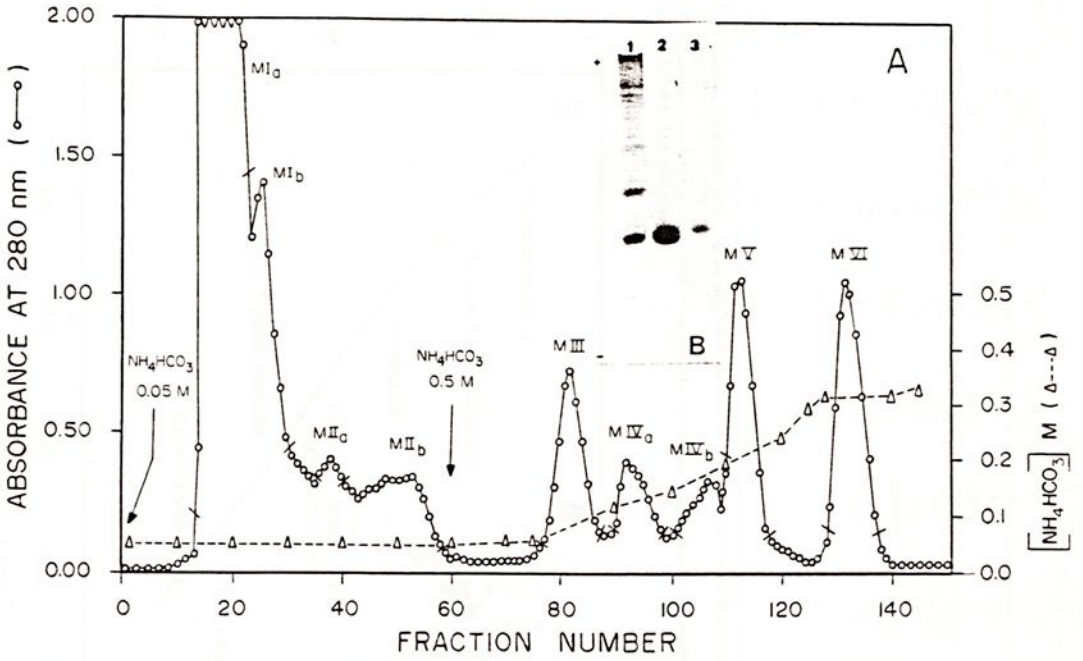


Fig. 1. (A) Chromatography of *B. moojeni* venom (200 mg) on a 2.0 × 20 cm column of CM-Sepharose which was previously equilibrated with 0.05 M, pH 8.0 NH_4HCO_3 buffer. Elution started with this buffer, followed by a continuous concentration gradient from 0.05 to 0.5 M at constant pH and 25 C. Flow rate: 20 ml h. [B (insert)] PAGE on a 10% (w v) gel in β-alanine buffer at pH 4.5, 15 mA, for 2 h. Lane 1: *B. moojeni* venom; lane 2: fraction M-V; lane 3: fraction M-VI.

Table 1. Percent recoveries (%Rec) and enzymatic activities of the several fractions from *B. moojeni* venom

Fraction	Protein		$A_{280\,nm}$		PLA$_2$ activity (U/mg)	Clotting activity MCD[a] (μg)	Hemorrhagic activity MHD[b] (μg)
	mg	%Rec	U	%Rec			
Whole venom	170.0	100.0	262.6	100.0	84.0	13.8	8.4
M-Ia	71.8	42.2	157.5	60.0	168.9	–	6.0
M-Ib	10.2	6.0	18.4	7.0	14.1	residual	residual
M-IIa	2.6	1.5	4.7	1.8	14.6	residual	–
M-IIb	10.5	6.2	12.0	4.6	14.8	16.6	residual
M-III	11.6	6.8	12.0	4.6	residual	20.8	–
M-IVa	14.0	8.2	7.3	2.8	residual	2.0	–
M-IVb	4.7	2.8	7.0	2.6	10.6	2.6	–
M-V	8.6	5.1	13.0	4.9	–	–	–
M-VI	11.4	6.7	16.6	6.3	–	–	–
Total	145.4	85.5	248.5	94.6			

[a]MCD: Minimum coagulant dose, μg of dry whole venom or fractions that clots 0.2 ml bovine citrated plasma in 1 min.

[b]MHD: Minimum hemorrhagic dose, minimum amount of venom or fractions that produces in mice a hemorrhagic spot of 10 mm diameter.

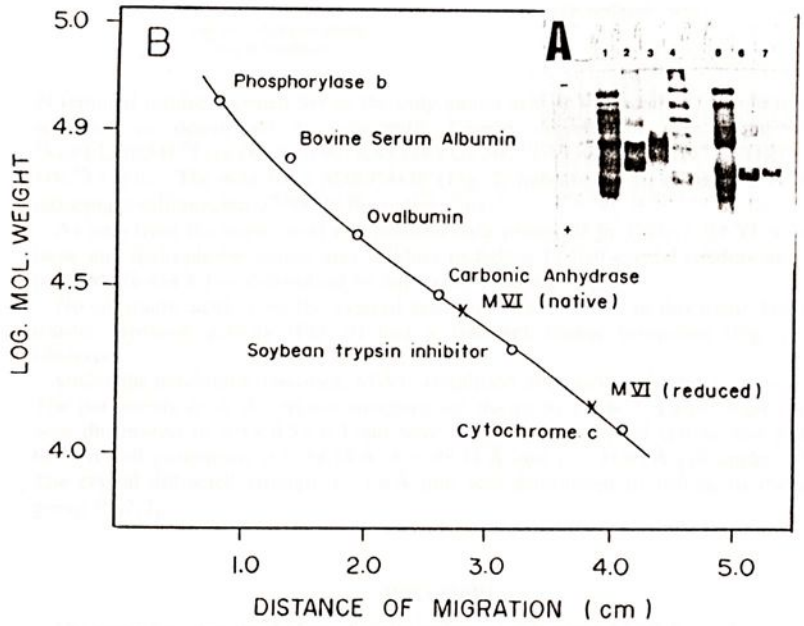


Fig. 2. [A (insert)] SDS-PAGE on a 15% (w/v) gel, at 15 mA, for 2 h 30 min. Lane 1: *B. moojeni* venom; lane 2: fraction M-V; lane 3: fraction M-VI; lane 4: mol. weight markers; lane 5: *B. moojeni* venom; lane 6: fraction M-V; lane 7: fraction M-VI. Fractions 1 to 3: native; fractions 4 to 7: dithiothreitol reduced. (B) Determination of the M_r of native and reduced M-VI.

Table 2. Amino acid composition of M-VI after hydrolysis with 5.3 N azeotropic HCl solution for 30 h at 110 C

Amino acid residue	M-VI
Asp	15
Thr	6
Ser	5
Glu	7
Pro	5
Gly	10
Ala	5
Half-Cys[a]	14
Val	5
Met	1
Ile	3
Leu	9
Tyr	10
Phe	2
Lys	19
His	1
Arg	5
Trp	n.d.[b]
Total	122 + Trp
Mol. weight	13887 + Trp

[a]Determined as cysteic acid after oxidation with performic acid and hydrolysis as above.
[b]Not determined.

N-terminal residue revealed Ser as the only amino acid at this position. The N-terminal sequence as determined by automatic Edman degradation was found to be ^{1}SLFELGKMI^{10}LQETG-KNPA^{20}KSYGVYGCNC^{30}GVGGRGKPKD^{40}ATDRCCYV-HK^{50}CCYK... The data from SDS-PAGE (Fig. 2) indicate an M_r of around 14000 in reducing conditions but 27000 in the native state.

As seen from the amino acid composition data presented in Table 2, M-VI is rich in basic and hydrophobic amino acid residues including 14 half-cystine residues/mol. The pI of M-VI was 8.2 as determined by isoelectric focusing (Fig. 3).

No enzymatic activity on the assayed substrates was detected in this toxin. However, drastic myotoxic activity (Fig. 4) and a transient edema formation (Fig. 5) was observed.

Under the conditions described, M-VI crystallized in an orthorhombic lattice (Fig. 6). The parameters from the crystal structure are shown in Table 3. Large single crystals with dimensions of $0.5 \times 0.5 \times 0.3$ mm were obtained. The crystal system was deduced to have cell parameters $a = 64.18$ Å, $b = 88.71$ Å and $c = 51.09$ Å (all angles = 90). The crystal diffracted strongly to 1.6 Å and was determined to belong to the space group $P2_12_12_1$.

DISCUSSION

The procedure described above for the isolation of fraction M-VI from the venom of *B. moojeni* is relatively simple, quick and efficient. It avoids the use of high buffer concentration for elution as well as dialysis and rechromatography. On basis of the data of Lomonte *et al.* (1990), who isolated myotoxins-I and -II from the same venom using

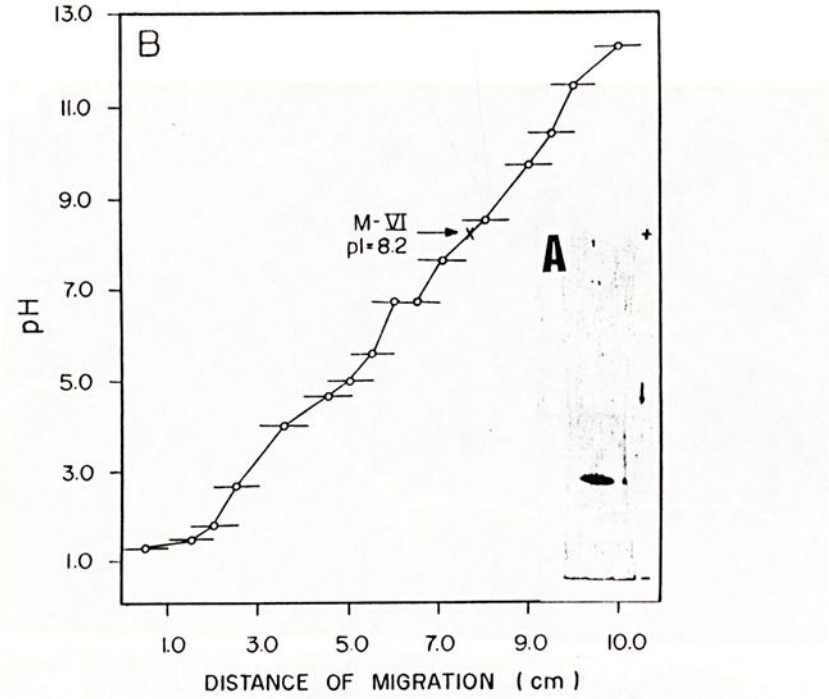


Fig. 3. [A (insert)] Electrofocusing of M-VI on polyacrylamide gel. A pre-focusing was performed at 100 V and 40 mA for 30 min, followed by focusing at 250 V and 40 mA for 30 min, 750 V (40 to 2 mA) for 2 h 15 min and finally at 1550 V (5 to 0 mA) for 1 h 15 min. (B) pH gradient from the isoelectric focusing. M-VI focused at pH 8.2.

0.75 M Tris–HCl buffer at pH = 7.0 and CM-Sephadex C-25, fraction M-VI (this work) was identified as myotoxin-II.

Raising the pH to 8.0 facilitated the elution of several fractions so that M-VI could be eluted at an ionic strength = 0.35 (0.35 M NH_4HCO_3) instead of 0.75 (0.75 M Tris HCl). In addition, NH_4HCO_3 is lyophilizable, permitting us to omit dialysis. Highly purified NH_4HCO_3, prepared by direct synthesis from $NH_3 + CO_2$ (Sampaio *et al.*, 1983), was used to buffer the system leaving no residue after lyophilization.

The last eluted fraction, M-VI, passed several purity tests, focused at pH 8.2 as a single band and produced a single amino acid residue after each step of Edman degradation up to the 53rd residue. Therefore no rechromatography was necessary. It is possible that the change from CM-Sephadex to CM-Sepharose contributed to higher resolution.

As seen in Table 1, PLA_2, hemorrhagic and coagulant activities are present in different fractions of the venom, thus suggesting the presence of different molecular structures expressing the same kind of activity or even strong molecular interaction not disrupted

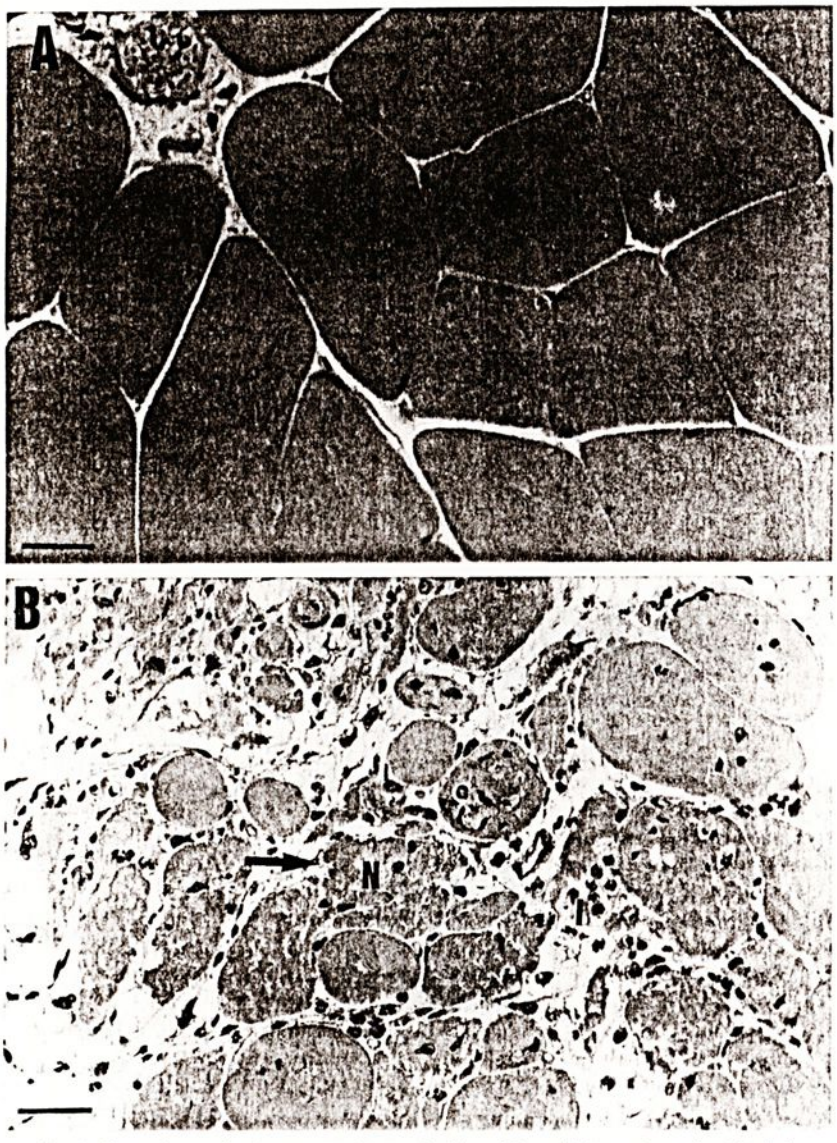


Fig. 4. Photomicrograph of gastrocnemius muscle slices (2.5 μm thickness) from the right limb of 18–22 g male mice. (A) control; (B) fraction M-VI (50 μg). Staining with toluidine blue. The bar represents 50 μm. N: necrosis of the muscle fibre; I: leucocitary infiltration.

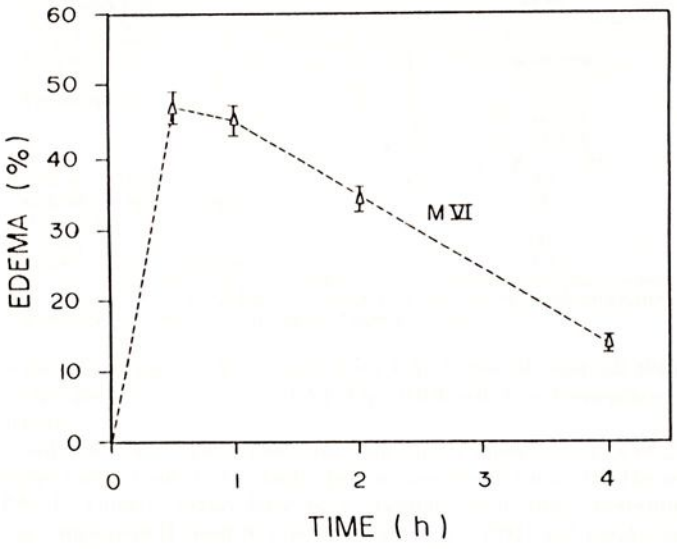


Fig. 5. Time-dependent edema induced by fraction M-VI (50 μg) in the paw of 180–200 g male Wistar rats.

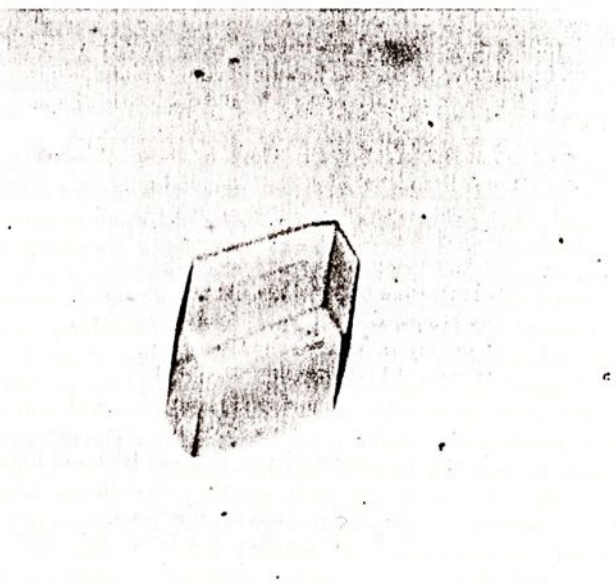


Fig. 6. Photomicrograph of a crystal of M-VI (0.3 mm) for the X-ray diffraction studies.

Table 3. Crystallographic parameters for *Bothrops moojeni* M-VI

X-ray diffraction data	M-VI
Crystal size (mm)	$0.5 \times 0.5 \times 0.3$
Crystal system	orthorhombic
Space group	$P2_12_12_1$
Cell dimensions	$a = 64.18$ Å
	$b = 88.71$ Å
	$c = 51.09$ Å
	$\alpha = \beta = \gamma = 90$
Volume per Dalton (Å^3)	2.7
Molecules in the asymmetric unit	2
Max resolution (Å)	1.6
R^a_{SYMREL}	5.5%
Number of days for growing	3–4

[a] $R_{SYMREL} = \Sigma|I_i - |I_{mean}|| \Sigma|I_{mean}|$, where I_i is the intensity of the ith observation of the reflection, and I_{mean} is the mean of these intensities.

by the ion-exchange process. As inferred from PAGE (not shown), all these fractions look still heterogeneous, except for M-VI [Fig. 1(B)], which is homogenous and lacks catalytic activity.

When in solution, this fraction dimerizes indicating a molecular mass of 27 kDa but, under reduction conditions, it dissociates to a monomeric form of 14 kDa as estimated by SDS-PAGE. Dimeric toxins have been encountered in other bothropic venoms. Examples are: myotoxin-II from *B. asper* (Francis *et al.*, 1991) and pyratoxins-I and -II from *B. pirajai* which showed diffuse bands around 28.5 kDa (Toyama *et al.*, 1995).

M-VI has a high content in Lys, Leu, Tyr and fourteen half-Cys residues. Its whole amino acid composition (Table 2) is very close to that of myotoxin-II (Lomonte *et al.*, 1990), strongly indicating that it is the same toxin. The absence of Cys at position 11 identifies M-VI as a class II PLA_2, in common with other myotoxins from bothropic venoms (Díaz *et al.*, 1995). The high content in Lys (~15% of the total residues) may be involved with a Lys-rich heparin-binding region which includes residues 115–129 (Gutiérrez and Lomonte, 1995). The heparin-binding ability of this region is believed to be enhanced by the close vicinity of Lys-36 and Lys-38 in similar myotoxins (Arni *et al.*, 1995).

The isoeletric point 8.2 is also very close to those of other myotoxins, such as bothropstoxins (Homsi-Brandeburgo *et al.*, 1988) and piratoxins (Mancuso *et al.*, 1995).

Fraction M-VI induced quick and drastic edema (45%/50 μg) with a maximum activity at 30 min, disappearing within 24 h. Myotoxin-II from *B. asper*, which is also devoid of PLA_2 and anticoagulant activity under the same conditions, is also able to induce a dose-dependent edema of 30%/38 μg (Lomonte and Gutiérrez, 1989).

The drastic necrosis produced by 50 μg of fraction M-VI was accompanied by a leucocyte infiltration of mainly polymorphonuclear leucocytes, demonstrating the intense inflammatory reaction caused by the toxin. No blood vessels were damaged, according to the hypothesis that the specific muscular injury induced by these toxins occurs directly via membrane alteration of the muscle cell (Gutiérrez and Lomonte, 1995).

A comparison between the N-terminal sequence of M-VI and those of other bothropic myotoxins with or without PLA_2 activity shows that its first 53 residues are highly homologous (85–95%) to those of the enzymatically inactive Lys 49 myotoxins but only 50–60% to those active Asp 49 PLA_2s. Residues Ser-1 and Glu-4 are believed to be highly conserved. Glu-4 forms an intra-helix hydrogen bond with the hydroxyl group of Ser-1 in the crystal structures of Lys 49 myotoxins from *Agkistrodon piscivorus pisci-*

vorus (Scott *et al.*, 1992). The proper conservation of the N-terminal sequence of these myotoxins seems to be fundamental for the binding of the toxin to the biomembrane (Diaz *et al.*, 1994). Since both Ser-1 and Glu-4 are present, it was expected that the whole sequence would reveal the substitution of one or more of the so considered strategic residues which forms the Ca^{2+} loop for PLA_2 activity, mainly Lys 49 for Asp 49. This provision was confirmed by the sequence data up to residue 53.

The crystal structure of M-VI, which is currently being determined, shows an orthorhombic form containing two toxin molecules in its asymmetric unit, thus characterizing a dimeric form. This dimeric form withstands solubilization and appears in solution under non-reducing conditions.

Acknowledgements—The authors are indebted to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support. Thanks are also due to Centro Interdepartamental de Química de Proteínas (CIQP) and to Dr E. C. Arantes for assistance in the amino acid analysis and electrofocusing, respectively, and to C. A. Vieira, O. A. B. Cunha, S. C. Silva and S. R. Rosa for general technical assistence.

REFERENCES

Alvarado, J. and Gutiérrez, J. M. (1988) Anticoagulant effect of myotoxic phospholipase A2 isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Viperidae). *Rev. Biol. Trop.* **36,** 563–565.

Arni, R. K., Ward, R. J., Gutiérrez, J. M. and Tulinsky, A. (1995) Crystal structure of a calcium-independent phospholipase-like myotoxic protein from *Bothrops asper* venom. *Acta Crystallographica D* **51,** 311–317.

Arni, R. K. and Ward, R. J. (1996) Phospholipase A2: A structural review. *Toxicon* **34,** 827–841.

Assakura, M. T., Furtado, M. F. and Mandelbaum, F. R. (1992) Biochemical and biological differentiation of the venoms of the lancehead vipers (*Bothrops atrox*, *Bothrops asper*, *Bothrops marajoensis* and *Bothrops moojeni*). *Comp. Biochem. Physiol.* **102B,** 727–732.

Bosch, H. (1980) Intracellular phospholipase A. *Biochim. Biophys. Acta* **604,** 191–246.

De Haas, G. H., Postema, N. M., Nieuwenhuizen, W. and Van Deenen, L. L. M. (1968) Purification and properties of phospholipase A from porcine pancreas. *Biochem. Biophys. Acta* **159,** 103–117.

Diaz, C., Alape, A., Lomonte, B., Olamendi, T. and Gutiérrez, J. M. (1994) Cleavage of the NH2-terminal octapeptide of *Bothrops asper* myotoxic lysine-49 phospholipase A2, reduces its membrane-destabilizing effect. *Arch. Biochem. Biophys.* **312,** 336–339.

Diaz, C., Lomonte, B., Zamudio, F. and Gutiérrez, J. M. (1995) Purification and characterization of myotoxin IV, a phospholipase A2 variant from *Bothrops asper* snake venom. *Natural Toxins* **3,** 26–31.

Ducrix, A. and Geige, R. (1992) *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins. A Practical Approach*. IRL Press at Oxford University Press, New York.

Francis, B., Gutiérrez, J. M., Lomonte, B. and Kaiser, I. I. (1991) Myotoxin II from *Bothrops asper* (Terciopelo) venom is a lysine-49 phospholipase A2. *Arch. Biochem. Biophys.* **284,** 352–359.

Gray, W. R. (1972) End group analysis using dansyl chloride. In *Methods in Enzymology*, eds. C. H. Hirs and S. N. Timasheff, Vol. 25-B, p. 121. Academic Press, New York.

Gutiérrez, J. M. and Lomonte, B. (1995) Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. Review article. *Toxicon* **33,** 1405–1424.

Higashi, T. (1990) *Process: A Program for Indexing and Processing RAXIS IIC Imaging Plate Data*. Rigaku Corporation, Japan.

Homsi-Brandeburgo, M. I., Queiroz, L. S., Santo-Neto, H., Rodrigues-Simioni, L. and Giglio, J. R. (1988) Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: Partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. *Toxicon* **26,** 615–627.

Itzhaki, R. F. and Gill, D. M. (1964) A micro-biuret method for estimating proteins. *Anal. Biochem.* **9,** 401–410.

Jancarik, J. and Kim, S. H. (1991) Sparse matrix sampling: A screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Crystalogr.* **24,** 409–411.

Kini, R. M. and Iwanaga, S. (1986a) Structure–function relationships of phospholipases. I: Prediction of presynaptic neurotoxicity. *Toxicon* **24,** 527–541.

Kini, R. M. and Iwanaga, S. (1986b) Structure–function relationships of phospholipases. II: charge density distribution and the myotoxicity of presynaptically neurotoxic phospholipases. *Toxicon* **24,** 895–905.

Krizaj, I., Bieber, A. L., Ritonja, A. and Gubensek, F. (1991) The primary structure of ammodytin I, a myotoxic phospholipase A2 homologue from *Vipera ammodytes* venom. *Eur. J. Biochem.* **202,** 1165–1168.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227,** 680–685.

Liu, C. S., Chen, J. M., Chang, C. H., Chen, S. W., Teng, C. M. and Tsai, I. H. (1991) The amino acid sequence and properties of an edema-inducing Lys-49 homolog from the venom of *Trimeresurus mucrosquamatus*. *Biochem. Biophys. Acta* **1077,** 362–370.

Lloret, S. and Moreno, J. J. (1993) Oedema formation and degranulation of mast cells by phospholipase A2 purified from porcine pancreas and snake venoms. *Toxicon* **31,** 949–956.

Lomonte, B. and Gutiérrez, J. M. (1989) A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothops asper* (Terciopelo). *Toxicon* **27,** 725–733.

Lomonte, B., Gutiérrez, J. M., Furtado, M. F., Otero, R., Rosso, J. P., Vargas, O., Carmona, E. and Rovira, M. E. (1990) Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. *Toxicon* **28,** 1137–1146.

Mancuso, L. C., Correa, M. M., Vieira, C. A., Cunha, O. A. B., Lachat, J.-J., Selistre de Araujo, H. S., Ownby, C. and Giglio, J. R. (1995) Fractionation of *Bothrops pirajai* snake venom and characterization of piratoxin-I, a new myotoxic protein. *Toxicon* **33,** 615–626.

Maraganore, J. M., Merutka, G., Cho, W., Welches, W., Kezdy, F. J. and Heinrikson, R. L. (1984) A new class of phospholipases A2 with lysine in place of aspartate 49. *J. Biol. Chem.* **259,** 13839–13843.

Nikai, T., Mori, N., Kishida, M., Sugihara, H. and Tu, A. T. (1984) Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin from the venom of *Crotalus atrox*. *Arch. Biochem. Biophys.* **231,** 309.

Reisfeld, R. A., Lewis, J. and Williams, D. A. (1962) Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gel. *Nature* **4838,** 281–283.

Sampaio, S. V., Laure, C. J. and Giglio, J. R. (1983) Isolation and characterization of toxic proteins from the venom of the brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon* **21,** 265–277.

Scott, D. L., Achari, A., Vidal, J. C. and Sigler, 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.

Selistre, H. S. and Giglio, J. R. (1987) Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of the snake *Bothrops insularis* (Jararaca ilhoa). *Toxicon* **25,** 1135–1144.

Spackman, D. H., Stein, W. H. and Moore, S. (1958) Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.* **30,** 1190–1206.

Toyama, M. H., Mancuso, L. C., Giglio, J. R., Novello, J. C., Oliveira, B. and Marangoni, S. (1995) A quick procedure for the isolation of dimeric piratoxins-I and II, two myotoxins from *Both ops pirajai* snake venom. N-terminal sequencing. *Biochem. and Molec. Biology Int.* **37,** 1047–1055.

Vesterberg, O. (1972) Isoelectric focusing of proteins in polyacrylamide gels. *Biochem. Biophys. Acta* **257,** 11–13.

ANEXO 3

Protein and Peptide Letters, Vol. 4, No. 5, pp. 329-334, 1997
Bentham Science Publishers B.V.
0929-8665/94 $ 5.00 + .00

CRYSTAL STRUCTURE OF MYOTOXIN-II: A MYOTOXIC PHOSPHOLIPASE A2 - HOMOLOGUE FROM *BOTHROPS MOOJENI* VENOM.

W.F. de Azevedo Jr.[1*], R.J. Ward[1], F.R. Lombardi[1], J.R. Giglio[2], A.M. Soares[2], M.R.M. Fontes[3] and R.K. Arni[1]

1. Department of Physics, IBILCE/UNESP, C. P. 136, CEP 15054-000, São José do Rio Preto-SP, Brazil.
2. Department of Biochemistry, FMRP/USP, CEP 14-49-900, Ribeirão Preto-SP. Brazil.
3. Department of Biophysics, UNESP-Botucatu, Botucatu - SP, Brazil.

Abstract

The crystal structure of Myotoxin-II (MjTX-II), a Lys49 PLA_2-homologue from *Bothrops moojeni* venom has been determined and refined at 2.0 Å to a crystallographic residual of 19.7% (R_{free}=28.1%). MjTX-II is a dimer in the crystal, with the monomers in the asymmetric unit related by a two-fold symmetry axis running through the dimer interface. The dimers of MjTX-II and the Lys49 PLA_2 from *B. asper* venom are similar, however the relative orientations of the monomers suggests a flexible dimer interface, which serves as a hinge between the two molecules.

1. Introduction

Phospholipases A_2 (PLA_2; EC 3.1.1.4, phosphatide *sn*-2 acylhydrolases) hydrolyze the *sn*-2 ester bond of phospholipids [1] showing enhanced activity at lamellar or membrane surfaces [2,3]. Intracellular PLA_2s are involved in phospholipid metabolism and signal transduction [4], whereas extracellular PLA_2s are found in mammalian pancreatic juices, the venoms of snakes, lizards and insects. Based on their high primary sequence similarity, extracellular PLA_2s are separated into classes I, II and III [5-7]. Class II PLA_2s are found in snake venoms of *Crotalidae* and *Viperidae* species, and include the sub-family of Lys49 PLA_2 homologues [8].

The coordination of the Ca^{2+} ion in the PLA_2 calcium-binding loop includes an aspartate at position 49. In the catalytically active PLA_2's, this calcium ion plays a critical rôle in the stabilization of the tetrahedral transition state intermediate in the catalytic mechanism [9]. The conservative substitution Asp49-Lys results in a decreased calcium affinity with a concomitant loss of catalytic activity [9,10], and naturally occurring PLA_2-homologues showing the same substitution are catalytically inactive [11,12]. However, the Lys49 PLA_2s possess cytolytic and myotoxic activities [13,14] and furthermore retain the ability to disrupt the integrity of both plasma membranes and model lipid

bilayers by a Ca^{2+}-independent mechanism [15,16] for which there is no evidence of lipid hydrolysis [17]. Lys49 PLA_2 homologues have been isolated from several *Bothrops sp.* venoms including *B. moojeni* [18]. Therefore, in order to improve our understanding of the molecular basis of the myotoxic and Ca^{2+}-independent membrane damaging activities, we have determined the crystal structure of MjTX-II, a Lys49 homologue from the venom of *B. moojeni*. The model presented has been determined at 2.0 Å resolution and refined to a crystallographic residual of 19.7% (R_{free}=28.1%).

2. Experimental Methods.

MjTX-II from *B. moojeni* was purified as previously described [18], and the protein (15.0 $mgml^{-1}$) was crystallized using conventional hanging-drop vapour diffusion and the sparse matrix methods [19]. Large single crystals 0.5 x 0.5 x 0.3 mm were obtained using a HEPES buffer (pH 7.5) and 2.0 M ammonium sulphate with 2.0% (w/v) polyethyleneglycol 400 (Sigma) as reported previously [20]. X-ray diffraction data of a single MjTX-II crystal were collected at room temperature (24 ^{0}C) with a Rigaku R-AXIS-IV imaging plate area detector using a Rigaku RU300 rotating anode X-ray generator operated at 50kV and 100mA, and data were processed using the program package PROCESS [21]. The crystal structure of MjTX-II was solved by molecular replacement using the program AMoRe [22] and the atomic coordinates of myotoxin II, a Lys49 PLA_2 homologue from the venom of *Bothrops asper* [23]. Reflections in the resolution range 20.0 to 4.0 Å were used for the rotation search, and the solution giving the highest correlation was used in the translation function. After a cycle of simulated annealing using the program X-PLOR [24], the electron density maps were visually examined using the program FRODO [25] and where necessary side chain atom positions were fitted manually. Solvent water molecules were subsequently located and their positions and temperature factors were refined. The refinement converged to a conventional crystallographic residual of 19.7% (R_{free}=28.1%) using X-ray diffraction intensities in the resolution range 5.0 to 2.0 Å. Root-mean-square (rms) differences from ideal geometries for bond lengths, angles and dihedrals were calculated with X-PLOR 3.1 [24]. The overall stereochemical quality of the final model for MjTX-II was assessed by the program PROCHECK [26]. Atomic models were superposed using the program LSQKAB from CCP4 [27]. Hydrogen bonds were assigned with the program HBPLUS [28].

3. Results

The final model of myotoxin-II from *B. moojeni* (MjTX-II) consists of 1886 protein atoms and 129 solvent water molecules. As presented in Table 1, overall deviations from ideal stereochemistry in the final model is low, and the Ramachandran plot indicates a clustering of peptide conformations in the energetically most favorable regions (data not shown). The quality of the electron density is generally excellent, and Figure 1 presents a stereo diagram of a representative region of the electron density at the interface between the two monomers. However, electron densities for residues Asn 88 and its equivalent in the second monomer (Asn 288), together with residues at the C-terminus are weak, probably due to high disorder in these regions. The ribbon diagram of the MjTX-II dimer is presented in Figure 2. The structure is similar to that determined for other venom PLA_2's isolated from *Bothrops* species [29]. Using the standard PLA_2 residue numbering scheme [5], seven disulphide bridges typical of class II PLA_2s (27:125, 29:45, 44:105, 50:133, 51:98, 61:91, 84:96) stabilize the structure, which comprises an N-terminal α-helix (residues

unesp

Table 1. Diffraction data collection and refinement statistics for MjTX-II from *Bothrops moojeni*.

		R_{factor} † (%)	19.7
Space group	$P2_12_12_1$	R_{free} ‡ (%)	28.1
Cell dimensions (Å)	a=50.83	B values* ($Å^2$)	
	b=64.55	Main Chain	30.70
	c=88.95	Side chains	33.69
		Waters	32.15
No. of unique reflections	17121	Deviation (rms)	
Completeness of data		bond lengths (Å)	0.013
to 2.0 Å (%)	84.0	bond angles (degrees)	1.851
R_{sym}* (%)	4.9	dihedrals (degrees)	23.076
Resolution (Å)	5.00-2.00	No. of water molecules	129

*R_{sym} = 100 x $\Sigma|I(h) - \langle I(h)\rangle|/\Sigma I(h)$, with $I(h)$, observed intensity and $\langle I(h)\rangle$, mean intensity of reflection h over all measurements of $I(h)$. †R_{factor} = 100 x $\Sigma|F_o-F_c|/\Sigma(F_o)$, the sums being taken over all reflections with $F/\sigma(F) > 2$ cutoff. ‡R_{free} = R_{factor} for 10% of the data, which were not included during crystallographic refinement. *B values = average B values for all non-hydrogen atoms.

2-12), linked by a single helical turn and the Ca^{2+} binding loop (25-35) to the second α-helix (40-55). A short antiparallel β-sheet (75-84), referred to as the β-wing, leads to a third helix (90-107) which is anti-parallel to the second. As demonstrated in Figure 2, MjTX-II is a dimer in the crystalline state, which is stabilized by interactions between the tips of the β-wings and the final residues of the N-terminal α-helices, an interaction similar to that previously reported for the homologous myotoxin II from *Bothrops asper* (BaspTX-II) [23]. The two monomers, designated as molecules A and B, are related by a near-perfect twofold rotational axis which runs through the dimer interface. Superpositioning of Cα atoms of the constituent monomers yields an rms difference of 0.42 Å.

The crystal structure of MjTX-II reveals that the Nζ atom of Lys49 occupies the position of the calcium ion in the catalytically active Asp49 PLA_2s, as has also been previously observed for the structures of both BaspTX-II [23] and the Lys49 homologue from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* [30,31]. The Nζ atom of Lys49 forms hydrogen bonds with the main-chain carbonyl oxygen atoms of the calcium binding loop, and provides a structural basis for the loss of Ca^{2+} ion binding, and the concomitant loss of catalytic activity [23,30,31]. The MjTX-II dimer is stabilized

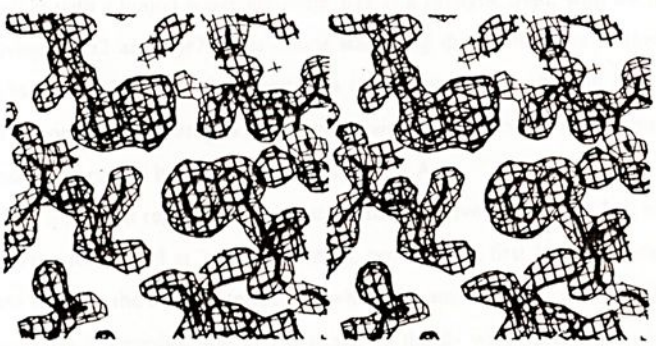


Figure 1.Stereo diagram of the electron density for the interface regions of the MjTX-II monomers.

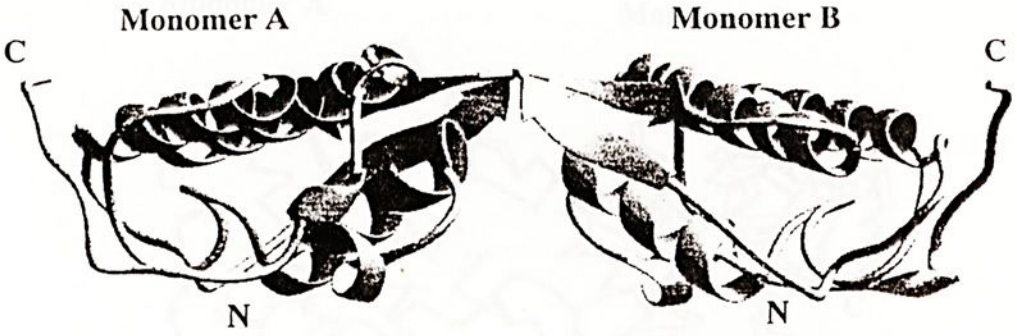


Figure 2. Ribbon diagram of the MjTX-II dimeric structure. The N- and C-termini are labeled in both monomers.

mainly by intermolecular hydrogen bonds and salt-bridges, and the observed 6 hydrogen bonds and 5 water bridges between monomer A and B gives rise to a highly polar dimer interface. Two interactions are conserved between the MjTX-II and BaspTX-II; (i) the salt-bridges between Lys80 in monomer A with the carboxyl oxygen of Glu12 in monomer B together with the reciprocal interaction, and (ii) hydrogen bonds between Trp77 in the monomer A and main chain oxygen atoms in monomer B [23] However, whereas the dimeric interactions at the MjTX-II dimer interface involves a network of 5 solvent water molecules, the BaspTX-II dimer interface is stabilized solely by direct protein interactions. A Cα superposition using monomer A from each dimer gives an rms differences of 0.64 Å and the same analysis using both monomers B gives and rms of 0.71 Å respectively. The dimeric structure of MjTX-II is similar to the BaspTX-II dimer, however as shown in Figure 3 the superposition of the dimers using monomer A alone reveals significant differences in the main-chain positions of monomer B, with an average displacement 1.41 Å. Reduced differences in the superposed monomer B main-chain positions are observed closer to the dimer interface, suggesting that this region serves as a hinge permitting changes in the relative orientations between the monomers.

4. Discussion

Consistent with the structures of all class I/II PLA_2s, the crystal structure of MjTX-II demonstrates that the positions of the amino-acid residues His48, Tyr52, Tyr73 and Asp99 are fully conserved. In the catalytically active PLA_2s, the Asp99/His48 pair together with a bound water molecule acts as a catalytic triad, with the interconnected pattern of hydrogen bonds involving Tyr52 and Tyr73 side chains stabilizing the orientations of these key catalytic residues [32]. As previously observed [23,30,31], the orientation of the Lys49 side chain in both the MjTX-II molecules positions the Nζ atom to both permit hydrogen bonds with main-chain carbonyl oxygen atoms in the calcium binding loop, and to fill the position occupied by the Ca^{2+} ion in Asp49 PLA_2s.

Dimerization may play an important regulatory role in catalytically active PLA_2's [33,34], and the X-ray structure of MjTX-II from *B. moojeni*, determined at 2.0 Å resolution, provides the first high resolution structure of a dimeric PLA_2. A diad axis runs through the dimer interface, in which the amino acids located at the C-terminal end of the first helix and the loop region preceding the first β-strand of the β- wing form hydrogen bonds and salt-bridges which leaves the putative "catalytic" sites exposed to the solvent. This is in contrast to the dimeric PLA_2 structure

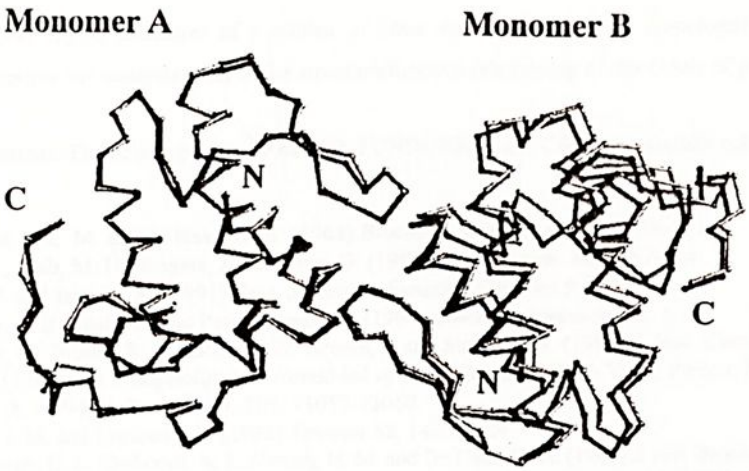


Figure 3.Superposition of Cα atoms from the dimers of MjTX-II (grey lines) and BaspTX-II (dark lines). The orientation of the dimers is presented at ~90° in comparison to Fig.2 to highlight the movement of monomer B. The N- and C-termini are labeled.

from *Crotalus atrox* [35], in which the catalytic residues are shielded from the solvent and face an internal cavity, and the β-wing region is fully exposed to the solvent. In this case a Ca^{2+} induced quaternary structural transition has been proposed which would expose the active sites to permit substrate binding. Although the amino acids involved in the dimeric interaction (Glu12, Trp77 and Lys80) in the structure of MjTX-II are fully conserved in all Lys49 PLA_2 homologues [8], the Lys49-PLA_2 homologue from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* [30,31] exist as a monomer in the crystalline state. In this crystal structure the electron density of the β-wing region is disordered, indicating the importance of the formation of dimerization for the stabilization of this region, and biochemical studies are required to evaluate whether the monomeric form is an artifact of crystallization. Although the crystal structure of MjTX-II is highly similar to that of the BaspTX-II, the superposition of the two dimers reveals a difference in the relative orientations between the constituent monomers. The low values for the main chain rms differences of the superpositions with both monomer A and B from each dimer indicate the monomers are largely invariant structures. This suggests that a relative motion of the monomers gives rise to the differences observed between the two dimers, and as a result of this movement the MjTX-II dimer adopts a more open conformation when compared to the BaspTX-II.

Hydration changes have been observed in the conformation changes of many allosteric proteins [36], and dehydration of the protein lipid interface has been suggested to be a factor promoting the structural transition associated with the E*-to-E*L transition in porcine PLA_2 [37]. It is tempting to speculate that the more open dimer conformation observed in the MjTX-II dimer is a result of the hydration of the interface region. Hydration changes on lipid binding may promote quaternary structural changes in dimeric Lys49 PLA_2 homologues, and such structural changes in the membrane associated protein may result in re-organization of the lipid bilayer, leading to loss of membrane integrity and have relevance for the Ca^{2+}-independent membrane damaging activity. We are currently

refining the X-ray crystal structures of a number of other dimeric Lys49 PLA_2 homologues, and a comparative analysis will improve our understanding of the structure/function relationship of this family of proteins.

Acknowledgements: Financial support of FAPESP, FUNDUNESP and CNPq is gratefully acknowledged.

References

[1] van Deenen, L. L. M. and de Haas, G. H. (1963) *Biochem. Biophys. Acta* **70**, 538-553.
[2] Jain, M. K., Gelb, M. H., Rogers, J. and Berg, O. (1995) *Meth. Enzym.* **249**, 567-614.
[3] Ramirez, F. and Jain, M. K. (1991) *Prot. Structure, Function Genetics* **9**, 229-239.
[4] Mukherjee, A. B. Miele, L. and Pattabiraman, N. (1994) *Biochem. Pharmac.* **48**, 1-10.
[5] Renetseder, R., Brunie, S., Dijkstra, B. W. Drenth, J, and Sigler, P. B. (1985) *J. biol. Chem.* **260**, 11627-11636.
[6] Waite, M. (1987) *The Phospholipases: Handbook of Lipid Research.* New York: Plenum Press.
[7] Dennis, E. A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 13057-13060.
[8] Gutiérrez, J. M. and Lomonte, B. (1995) *Toxicon* **33**, 1405-1424.
[9] Van den Bergh, C. J., Slotboom, A. J., Verheij, H. M. and De Haas, G. H. (1989) *J. cell. Biochem.* **39**, 379-390.
[10] Li, Y., Yu, B. -Z., Zhu, H., Jain, M. K. and Tsai, M. -D. (1994) *Biochemistry* **33**, 14714-14722.
[11] Homsi-Brandeburgo, M. I., Queiroz, L. S., Santo-Neto, H., Rodrigues-Simoni, L. and Giglio, J. R. (1988) *Toxicon* **26**, 615-627.
[12] Francis, B., Gutiérrez, J. M., Lomonte, B. and Kaiser, I. I. (1991) *Arch. Biochem. Biophys.* **284**, 352-359.
[13] Lomonte, B., Tarkowski, A. and Hanson, L. A. (1994a) *Toxicon* **32**, 1359-1369.
[14] Mancuso, L. C., Correa, M. M., Vieira, C. A., Cunha, O. A. B., Lachat, J. -J., Selistre de Araújo, H. S., Ownby, C. L. and Giglio, J. R. (1995) *Toxicon* **33**, 615-626.
[15] Díaz, C., Gutiérrez, J. M., Lomonte, B. and Gene, J. A. (1991) *Biochem. Biophys. Acta* **1070**, 455-460.
[16] Rufini, S., Cesaroni, P., Desideri, A., Farias, R., Gubensek, F., Gutierrez, J. M., Luly, P., Massoud, R., Morero, R., Pedersen, J. Z. (1992) *Biochemistry* **31**, 12424-12430.
[17] Pedersen, J. Z., de Arcuri, B. F., Moreno, R. D. and Rufini, S. (1994) *Biochem. Biophys. Acta.* **1190**, 177-180. 1994.
[18] Lomonte, B., Gutiérrez, J. M., Furtado, M. F., Otero, R., Rosso, J.-P., Vargas, O., Carmona, E. and Rovira, M. E. (1990) *Toxicon* **28**, 1137-1146.
[19] Jancarik, J. and Kim, S. -H. (1991) *J. appl. Cryst.* **24**, 409-411.
[20] Soares, A. M., Rodrigues, V. M., Homsi-Brandenburgo, M. I., Toyama, M. H., Lombardi, F. R., Arni, R. K and Giglio, J. R. (1997). *Toxicon* (submitted).
[21] Higashi, T. (1990) *J. appl. Cryst.* **23**, 253-257.
[22] Navaza, J. (1994) *Acta. Cryst.* **A50**, 157-163.
[23] Arni, R. K., Ward, R. J., Gutiérrez, J. M. and Tulinsky, A. (1995) *Acta Cryst.*, **D51**, 311-317.
[24] Brünger, A. T. X-PLOR Version 3.1: A System for Crystallography and NMR (Yale University Press, New Haven, 1992).
[25] Jones, T. A. (1978) *J. appl. Crystallogr.* **11**, 268-272.
[26] Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. and Thornton, J. M. (1993) *J. appl. Cryst.* **26**, 283-291.
[27] CCP4. The SERC(UK) Collaborative Computing Project No. 4: A Suite of programmes for protein Crystallography, (distributed from Daresbury Laboratory, Warrington WA44AD, UK; 1979).
[28] McDonald, I. K. and Thornton, J. M. (1994) *J. Mol. Biol.* **238**, 777-793.
[29] Arni, R. K. and Ward, R. J. (1996) *Toxicon* **34**, 827-841.
[30] Holland, D. R., Clancy, L. L., Muchmore, S. W., Rydel, T. J., Einspahr, H. M., Finzel, B. C., Heinrickson, R. L. and Watenpaugh, K. D. (1990) *J. biol. Chem.* **266**, 17649-17656.
[31] Scott, D. L., Achari, A., Vidal, J. C. and Sigler, P. B. (1992) *J. biol. Chem.* **267**, 22645-22657.
[32] Kuipers, O. P., Franken, P. A., Hendricks, R., Verheij, H. M. and de Haas, G. (1990) *Prot. Engng.* **4**, 199-204.
[33] Tomasselli, A. G., Hui, J., Fisher, J., Zurcher-Neely, H., Reardon, I. M., Oriaku, E. O., Kezdy, F. J. and Heinrickson, R. L. (1989) *J. biol. Chem.* **264**, 10041-10047.
[34] Cordella-Miele, E., Miele, L. and Mukherjee, A. B. (1990) *J. biol. Chem.* **265**, 17180-17188.
[35] Brunie, S. Bolin, J., Gerwith, D. and Sigler, P. B. (1985) *J. biol. Chem.* **260**, 9742-9749.
[36] Parsegian, V. AA., Rand, R. P., Colombo, M. and Rau, D. C. (1994) *Adv. Chem.* **235**, 177-96.
[37] Jain, M. K. and Maliwal, B. P. (1993) *Biochemistry* **32**, 11838-11846.

Received on August 25, 1997, accepted on September 2, 1997

