

ASPECTOS TERMODINÂMICOS DA INTERAÇÃO ENTRE
FOSFOLIPASES A₂ DE VENENOS OFÍDICOS E INIBIDORES:
ESTUDO POR CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA

THIAGO REVERS DREYER

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Doutor no Programa de Pós-Graduação
em Biologia Geral e Aplicada, Área de
concentração Biomoléculas: Estrutura e Função.

Prof. Titular Marcos Roberto de Mattos Fontes

**BOTUCATU - SP
2017**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

ASPECTOS TERMODINÂMICOS DA INTERAÇÃO ENTRE
FOSFOLIPASES A₂ DE VENENOS OFÍDICOS E INIBIDORES:
ESTUDO POR CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA

THIAGO REVERS DREYER

ORIENTADOR PROF. TITULAR MARCOS ROBERTO DE MATTOS FONTES

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biomoléculas: Estrutura e Função.

BOTUCATU - SP
2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Dreyer, Thiago Revers.

Aspectos termodinâmicos da interação entre Fosfolipases A2 de venenos ofídicos e inibidores : estudo por calorimetria de titulação isotérmica / Thiago Revers Dreyer. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Marcos Roberto de Mattos Fontes
Capes: 20901003

1. Bothrops. 2. Crotalus. 3. Cobra venenosa - Veneno. 4. Calorimetria. 5. Fosfolipase A2 - Inibidores.

Palavras-chave: Asp49-PLA2; Calorimetria de titulação isotérmica; Fosfolipase A2; Lys49-PLA2; Veneno.

**“I have not failed.
I’ve just found 10000 ways that won’t work. “
Edison, T.A.**

Meus sinceros agradecimentos

À FAPESP e Capes, pelos Auxílios à Pesquisa de Projeto Temático (Processo FAPESP 13/24705-3) e Projetos Regulares (Processo FAPESP 15/17286-0, Processo Capes 23038.006271/2011-16) que financiaram os experimentos realizados.

À banca avaliadora, pela disponibilidade, colaboração e tempo dispendido!

Ao Prof. Marcos R. M. Fontes, pela orientação e paciência!

Aos Ilustres e diletos do laboratório, pelas colaborações e/ou pelas risadas e “zuerinhas”! Em especial ao Guilherme e Andrea, colaboradores contínuos nos projetos e experimentos sem fim!

Ao pessoal do Zé, pelos almoços regados à “tiradas” inenarráveis!

À Família “de sangue” e “de amor”, pela presença nos momentos necessários e apoio constante!

À Esposa, pelo suporte nos “perrengues” e pelas alegrias dos sucessos! Pelo Amor incondicional!

Resumo

Envenenamento por serpentes é um importante problema de saúde pública em vários países tropicais e subtropicais, pois além da mortalidade, pode resultar em sequelas permanentes como consequência de danos locais, representando assim um grande desafio à terapia utilizando antivenenos. As proteínas fosfolipases A₂ (PLA₂s) e fosfolipases A₂ homólogas de venenos têm um papel fundamental na complexa patogênese da necrose do músculo esquelético e seus mecanismos de ação são apenas parcialmente entendidos. Por isso, a busca por inibidores e da completa descrição do mecanismo de ação das PLA₂s e PLA₂s homólogas representam assuntos amplamente abordados no campo acadêmico-científico. Para o melhor entendimento desses mecanismos e a busca por novas moléculas inibidoras, o entendimento dos processos de reconhecimento molecular de pequenos ligantes e macromoléculas biológicas é fundamental e requer a completa caracterização da energética de ligação desses agentes e da correlação entre os dados termodinâmicos e cinéticos com as estruturas moleculares envolvidas na ligação. Para tanto, a calorimetria de titulação isotérmica (ITC) é a metodologia mais utilizada com este fim. Nesse trabalho, nossos objetivos foram: i) determinar os parâmetros termodinâmicos de moléculas candidatas a inibidores da atividade miotóxica de PLA₂s homólogas: bothropstoxina-I (BthTX-I) e moojenitoxina I (MjTX-I) e II (MjTX-II), purificadas do veneno de serpentes do gênero *Bothrops* e (ii) caracterizar a interação entre as componentes ácida (CA) e básica (CB) da crotoxina, obtida do veneno da serpente *Crotallus durissus terrificus*. As serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* são as principais responsáveis por acidentes ofídicos na América Latina e estas proteínas apresentam alta proporção do volume nestes venenos. Foi verificado por ITC que o ácido chicórico, composto vegetal atualmente extraído de várias plantas, que bloqueou a atividade miotóxica *in vitro*, se liga ao dímero de BthTX-I na proporção estequiométrica de 1:1 com média afinidade de ligação ($k_d = 8.47 \pm 1.26 \mu\text{M}$). Foi verificado ainda que o processo de ligação é entálpica e entropicamente favoráveis ($\Delta H = -3,97 \pm 0,14 \text{ kcal/mol}$, $-T\Delta S = -2,83 \text{ kcal/mol}$). Entretanto para apresentar energia livre semelhante à já apresentadas para outros inibidores virais ainda seria necessário diminuir a energia de ligação na ordem de -10 kcal/mol. Em relação às interações dos íons Zn^{2+} com a BthTX-I, a titulação se apresentou predominantemente exotérmica e a isoterma de ligação foi melhor ajustada considerando-se 3 eventos de ligação (*F*-test, $p < 0.05$), sendo que os íons Zn^{2+} tem baixa afinidade pela proteína ($k_{d1,2,3} = 83,3 \pm 25,4$, $62,1 \pm 25,1$ e $300,0 \pm 104,3 \mu\text{M}$). Em função da baixa afinidade, o íon não se apresenta como um bom inibidor, mas tem sua importância na explicação dos mecanismos estruturais da BthTX-I. A suramina, quando titulada à MjTX-I e MjTX-II, apresentou afinidade de ligação moderada-alta ($k_d = 0,56 \pm 0,23$ e $0,6 \pm 0,1 \mu\text{M}$, respectivamente) e complexos termogramas, em ambos casos, com grandes variações entálpicas, com processos endo e exotérmico ocorrendo durante a titulação. Em ambos os casos foi sugerido que esse comportamento demonstra processos de oligomerização com formação de dímeros e tetrâmeros, nos casos da MjTX-I e MjTX-II respectivamente. Nos experimentos calorimétricos realizados com os componentes da crotoxina, CA e CB, foi sugerido pelo termograma e isotermas obtidos que a CA é capaz de dissociar o tetrâmero formado por CB para formar a crotoxina. Ambos os eventos apresentaram afinidades de dissociação do tetrâmero e complexação da CA/CB da ordem de submicromolar enquanto o primeiro evento é entropicamente guiado enquanto o segundo é entálpicamente guiado.

Palavras chave: Fosfolipases A₂; calorimetria de titulação isotérmica; *Bothrops*; *Crotalus*; Lys49-PLA₂; Asp49-PLA₂

Abstract

Envenomation by snakebites is an important public health problem in many tropical and subtropical countries that, in addition to mortality, can result in permanent sequelae as a consequence of local damage, which represents a major challenge to antivenom therapy. Venom phospholipases A₂ (PLA₂s) and PLA₂-like proteins play an important role in the complex pathogenesis of skeletal muscle necrosis and their precise mechanism of action is only partially understood. Therefore, the search for inhibitors and the complete description of the mechanism of action of the PLA₂s and PLA₂-like represent a wide covered issues in the academic and scientific fields. For a better understanding of these mechanisms and the search for new inhibitory molecules, the understanding of the molecular recognition processes of small ligands and biological macromolecules is fundamental and requires the complete characterization of the binding energy of these agents and of the correlation between thermodynamic and molecular structures involved in the binding. For this purpose, isothermal titration calorimetry (ITC) is the most used methodology. In this work, our objectives were: (i) to determine the thermodynamic parameters of molecules candidates for inhibitors of myotoxic activity of PLA₂-like proteins: bothropstoxin-I (BthTX-I) and moojenitoxin-I (MjTX-I) and II (MjTX-II), purified from snake venoms of the bothropic genus and (ii) characterize the thermodynamics of the interaction between the acidic (CA) and basic (CB) components of the crotoxin, purified from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. Snakes of the genera *Bothrops* and *Crotalus* are the main responsible for ophidian accidents in Latin America and these proteins have a high proportion of the volume of these venoms. It was verified by ITC that chicoric acid, a vegetal compound extracted from several plants that blocks myotoxic activity of BthTX-I *in vitro*, binds to BthTX-I dimer at the stoichiometric ratio of 1:1 with medium binding affinity ($k_d=8.47\pm1.26$ μ M). It was also verified that the binding process is enthalpic and entropically driven ($\Delta H = -3.97\pm0.14$ kcal/mol, $-T\Delta S = -2.83$ kcal/mol). However, for the chicoric acid to have free energy similar to that already shown by other viral inhibitors, it would still be necessary to decrease its binding energy in the order of -10 kcal/mol. In relation to the interactions of the Zn²⁺ ions with BthTX-I, the titration was predominantly exothermic and the binding isotherm was better adjusted considering 3 binding events (F-test, $p<0.05$), with Zn²⁺ ions having low affinity for the protein ($k_{d1,2,3}= 83.3\pm25.4$, 62.1 ± 25.1 and 300.0 ± 104.3 μ M). Due to the low affinity, the ion does not present itself as a good inhibitor, but was important to explain the structural myotoxic mechanisms of Lys49-PLA₂s. Suramine, when titrated to MjTX-I and MjTX-II, had moderate to high binding affinity ($k_d= 0.56\pm0.23$ and 0.6 ± 0.1 μ M, respectively) and complex thermograms in both cases, with large enthalpic variations with endo and exothermic processes occurring during the titration. In both cases, it was suggested that their behavior demonstrates oligomerization processes with formation of dimers or tetramers, in the cases of MjTX-I and MjTX-II, respectively. In the calorimetric experiments performed with the components of crotoxin, CA and CB, it was suggested by the thermogram and isotherms obtained that CA is able to dissociate the tetramer formed by CB to form the crotoxin. Both events showed dissociation affinities of the tetramer and complexation of the CA/CB in the submicromolar range, being the first event entropically driven while the second is enthalpically driven.

Keyword: Phospholipases A₂; isothermal titration calorimetry; Bothrops; Crotalus; Lys49-PLA₂; Asp49-PLA₂

Sumário

Lista de Figuras	i
Lista de Tabelas.....	iv
Lista de Abreviações	v
Capítulo I.....	1
1.1. Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)	2
1.1.1. Métodos de detecção de calor.....	3
1.1.2. Relações termodinâmicas no fenômeno das interações moleculares	7
1.1.3. Características geométricas das isothermas de ligação e informações contidas nos resultados de ITC.....	8
1.1.3.1. Estequiometria.....	12
1.1.3.2. Variação de entalpia (ΔH).....	13
1.1.3.3. Constante de dissociação (k_d) e energia livre de ligação (ΔG)	17
1.1.3.4. Variação da entropia (ΔS)	19
1.1.4. Análise de dados de ITC.....	20
Capítulo II	25
2. Aspectos termodinâmicos da interação entre fosfolipases A_2 e fosfolipases A_2 homólogas de venenos de serpentes e inibidores	26
2.1. Importância do estudo de proteínas de veneno de serpentes	26
2.2. Fosfolipases A_2 e Fosfolipases A_2 homólogas e suas relações com venenos ofídicos....	27
2.2.1. Moojenitoxina I (MjTX-I).....	30
2.2.2. Moojenitoxina II (MjTX-II).....	33
2.2.3. Bothropstoxina I (BthTX-I)	34
2.2.4. Crotoxina.....	34
2.3. Mecanismos de ação das PLA_2 s e PLA_2 s homólogas e busca por inibidores	36
2.4. Objetivos.....	42
2.5. Metodologia.....	43
2.5.1. Isolamento das toxinas e ligantes utilizados	43
2.5.1.1. Bothropstoxina-I (BthTX-I).....	43
2.5.1.2. Crotoxina A (CA) e Crotoxina B (CB)	43
2.5.1.3. Moojenitoxina I e Moojenitoxina II (MjTX-I e MjTX-II).....	44
2.5.2. Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC).....	44
2.5.2.1. Estudos calorimétricos da BthTX-I e ácido chicórico	45
2.5.2.2. Estudos calorimétricos da BthTX-I e cloreto de zinco	45
2.5.2.3. Estudos calorimétricos da MjTX-I e suramina	46
2.5.2.4. Estudos calorimétricos da MjTX-II e suramina.....	46

2.5.2.5. Estudos calorimétricos da Crotoxina A (CA) e Crotoxina B (CB).....	46
2.6. Resultados e Discussão.....	48
2.6.1. Análise termodinâmica da interação entre BthTX-I e ácido chicórico	50
2.6.2. Análise termodinâmica da interação entre BthTX-I e cloreto de zinco	57
2.6.3. Análise termodinâmica da interação entre MjTX-I e suramina	63
2.6.4. Análise termodinâmica da interação entre MjTX-II e suramina.....	70
2.6.5. Análise termodinâmica da interação entre crotoxina A e B.....	76
3. Conclusões.....	81
Referências	82
Anexos – Artigos publicados	96

Lista de Figuras

- Figura 1.** Esquema ilustrativo de um microcalorímetro de titulação isotérmica (iTC₂₀₀, Malvern Instruments). (Esquerda) Desenho esquemático de um microcalorímetro iTC₂₀₀ no qual está ilustrado a (1) pipeta, (2) êmbolo da pipeta (azul escuro), (3) motor de rotação, (4) pipeta (azul claro), (5) célula de amostra (com a pipeta em seu interior), (6) isolante térmico, (7) célula de referência e (8) revestimento térmico externo. (Direita) Ampliação (*zoom*) do desenho esquemático da região das células de reação e referência e sistema de controle de temperatura composto por sensor de temperatura e aquecedores. Figuras Adaptadas de Malvern Instruments (www.malvern.com).4
- Figura 2.** Calorimetria de titulação isotérmica da titulação de íons cálcio (5 mM) em EDTA (0.4 mM), ambos diluídos em tampão MES (10 mM) à 25°C. (Painel superior) Dados brutos de calorimetria de titulação isotérmica (linha preta) e linha de base (linha vermelha). (Painel inferior) Isoterma da titulação, que representa a energia medida em cada injeção normalizada pela molaridade do titulante (eixo das ordenadas) em função da razão molar de titulante por titulado (eixo das abscissas).6
- Figura 3.** Simulação de isotermas ilustrando a dependência da forma da curva com o produto da constante de associação e a concentração total da macromolécula titulada. As curvas são simuladas para vários valores da inversa da constante de Wiseman (*c*), como descrito no gráfico. Adaptado de Perozzo et al., 2004.10
- Figura 4.** Termogramas e isotermas de ligação de experimentos de calorimetria de titulação isotérmica, entre espécies com estequiometria 1:1, representativos de uma reação endotérmica (esquerda) e exotérmica (direita). Adaptado de Rühmann e colaboradores (Rühmann et al., 2015).14
- Figura 5.** Representação esquemática do enovelamento de uma PLA2s do grupo II, gerada a partir do monômero da BthZ-I (Murakami et al., 2005).29
- Figura 6.** Representação esquemática do enovelamento da MjTX-I gerada a partir de seu monômero A (PDB 3T0R) (Salvador et al., 2013).31
- Figura 7.** Representação em forma de cartoon da MjTX-I em sua conformação tetramérica (PDB 3T0R) (Salvador et al., 2013).32
- Figura 8.** Estrutura cristalográfica da MjTX-II representada na forma de *cartoon*. Figura confeccionada no software PyMol (DeLano, 2002).33
- Figura 9.** Estruturas cristalográficas em forma de cartoon da crotoxina B (PDB 2QOG)(Marchi-Salvador et al., 2008) e da crotoxina (PDB 3R0L)(Faure et al., 2011). (A) Representação dos monômeros A (vermelho), B (salmão), C (Azul) e D (verde) da crotoxina B (Marchi-Salvador et al., 2008). (B) Representação das subunidades ácida (CA) (azul) e básica (CB) (verde) da crotoxina (Faure et al., 2011).35
- Figura 10.** Dímeros convencional (Esquerda, em azul) e alternativo (Direita, em verde) com resíduos do sítio miotóxico proposto por dos Santos e colaboradores (2009) destacados em vermelho.39
- Figura 11.** Mecanismo miotóxico de ação de Lys49-PLA2s botrópicas. Uma Lys49-PLA2s nativa é ativada pela entrada de uma molécula hidrofóbica no canal hidrofóbico, causando uma alteração alostérica (reorientação do monômero) que causa alinhamento do C-terminal e do MDoS (Lys20, Lys115 e Arg118) que possibilita o ancoramento à membrana e exposição do MDiS (Leu121, Phe125) ao solvente e em posição simétrica para ambos monômeros, que desestabiliza a membrana. Figuras confeccionadas no software PyMol (DeLano, 2002), com exceção da membrana modelo de 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina (POPC), adaptada de www.shutterstock.com.40
- Figura 12.** Calorimetria de titulação isotérmica (ITC) da interação entre ácido chicórico e BthTX-I. (Painel superior) Termograma obtido pela titulação de ácido chicórico (400 µM,

- pipeta) na BthTX-I (50 μ M, célula de reação), diluídos em solução aquosa com 5% piridina e 5% etanol, à 20°C. A linha preta representa a potência aplicada pelo microcalorímetro iTC₂₀₀ para manter as células de reação e controle à mesma temperatura e a linha vermelha representa a linha de base determinada pelo *add-on* do *software* Origin v.7.0 (OriginLab) para o cálculo das áreas dos picos. (Painel Inferior) Isoterma de ligação ajustada com polinômio de ligação com 1 sítio. Os pontos das isotermas (■) representam as áreas dos picos do termograma da titulação, calculados automaticamente no *add-on* do *software* Origin v.7.0 (OriginLab), e a linha preta representa o ajuste do modelo de ligação. 52
- Figura 13.** Estrutura cristalográfica do complexo BThTX-I/Ácido chicórico. (A) Representação da BthTX-I na forma de dímero convencional, em forma de *cartoon* (vermelho), e ácido chicórico (*sticks*, verde). (B) Nuvem de potencial eletrostático gerado para a BThTX-I com as cargas positivas em azul e as negativas em vermelho e o ácido chicórico em forma de *sticks* (verde)..... 53
- Figura 14.** Diagrama das ligações estabelecidas entre a molécula de ácido chicórico e a BthTX-I em sua conformação dimérica convencional. Traços pretos significam as ligações entre os átomos de carbono (pontos amarelos) e oxigênio (pontos vermelhos) da molécula de ácido chicórico. Figura confeccionada no *software* LigPlot (Wallace et al., 1995) com base na estrutura cristalográfica resolvida do complexo BthTX-I/Ácido chicórico. 54
- Figura 15.** Estrutura cristalográfica do complexo BThTX-I/Ácido chicórico. (A) Representação da BthTX-I na conformação de dímero alternativo, em forma de *cartoon* (vermelho), e ácido chicórico (*sticks*, verde). (B) Nuvem de potencial eletrostático gerado para a BThTX-I com as cargas positivas em azul e as negativas em vermelho e o ácido chicórico em forma de *sticks* (verde)..... 55
- Figura 16.** Representação tetramérica do complexo BthTX-I/Ácido chicórico. (Esquerda) Conformação tetramérica gerada pela simetria da unidade assimétrica com dois dímeros da proteína em sua conformação convencional (monômeros da mesma cor) ou dois dímeros em conformação alternativa (monômeros com cores diferentes). (Direita) Diagrama de interações da molécula de ácido chicórico com a estrutura tetramérica de BthTX-I. Os pontos amarelos e vermelhos denotam os átomos de carbono e oxigênio, respectivamente, e os traços pretos as ligações entre os átomos. 55
- Figura 17.** Calorimetria de titulação isotérmica (ITC) da interação entre ZnCl₂ e BthTX-I. (Esquerda) Termograma obtido pela titulação de ZnCl₂ (2000 μ M, pipeta) na BthTX-I (53 μ M, célula de reação), diluídos em tampão Tris HCl (100 mM), 100 mM NaCl, pH 7.0 à 25°C. A linha preta representa a potência aplicada pelo microcalorímetro iTC₂₀₀ para manter as células de reação e controle à mesma temperatura e a linha vermelha representa a linha de base determinada pelo *add-on* do *software* Origin v.7.0 (OriginLab) para o cálculo das áreas dos picos. (Direita) Isotermas de ligação ajustadas com modelos de ligação de 1 sítio (Painel superior), 2 sítios (Painel central) e 3 sítios (Painel inferior). Os pontos das isotermas (■) representam as áreas dos picos do termograma da titulação, calculados automaticamente no *add-on* do *software* Origin v.7.0 (OriginLab), e a linha vermelha representa o ajuste do modelo de ligação. 60
- Figura 18.** Estrutura cristalográfica do complexo BthTX-I/Zn²⁺, em forma de *cartoon* (verde), complexada aos íons zinco (esferas cinza) (PDB 4WTB). Desenhos representam a mesma estrutura rotacionadas em 90°. Figura confeccionada utilizando o *software* PyMOL (www.pymol.org). 61
- Figura 19.** Estrutura cristalográfica do dímero de MjTX-I (*cartoon*, verde) com suramina (*sticks*, vermelho). Figuras superiores estão rotacionadas em 90°. Figura inferior representa a nuvem de carga da proteína com cargas negativas em vermelho e cargas negativas em azul. 64
- Figura 20.** Titulação calorimétrica isotérmica de suramina em MjTX-I. (Painel superior) Termograma (potência aplicada pelo equipamento para manter ambas as células à mesma

- temperatura em função do tempo) da titulação de suramina (750 μM , pipeta) em MjTX-I (50 μM , célula de reação) à 25°C utilizando-se tampão bicarbonato de amônio (50 mM), pH 8.0. (Painel inferior) Isoterma de ligação (calor normalizado pela concentração de titulante em função da razão molar de suramina pela de MjTX-I) da titulação.66
- Figura 21.** Diagrama de ligações da suramina com o dímero de MjTX-I. A suramina está representada pelas esferas amarelas, vermelhas, azuis, verde conectadas por traços pretos, que denotam os átomos de carbono, oxigênio, nitrogênio e enxofre, respectivamente. As ligações polares são representadas por linhas verdes tracejadas enquanto os contatos hidrofóbicos são representados por semicírculos vermelhos. Figura confeccionada no *software* LigPlot (Wallace et al., 1995) com base na estrutura cristalográfica do complexo MjTX-I/suramina. 69
- Figura 22.** Estrutura cristalográfica da MjTX-II complexada com suramina. Superfície do dímero alternativo (verde) mostrando os aminoácidos Lys7, Leu10, Asn114, Lys116, Tyr119, Tyr121 e Phe126 (superfície em vermelho), que interagem com as moléculas de suramina (moléculas em azul).71
- Figura 23.** Formação tetramérica do complexo MjTX-II com suramina formada por dois dímeros na unidade assimétrica. Conformação oligomérica sugerida pelo software PISA, sendo observados dímeros alternativos de MjTX-II (dímeros com a mesma tonalidade de verde), dímeros convencionais (dímero formado por um monômero verde escuro e outro verde claro na parte superior do tetrâmero), suramina (azul) e moléculas de PEG4K (laranja).72
- Figura 24.** Titulação calorimétrica isotérmica de suramina em MjTX-II. (Painel superior) Termograma (potência aplicada pelo equipamento para manter ambas as células à mesma temperatura em função do tempo) da titulação de MjTX-II (45 μM) com suramina (600 μM) à 25 °C utilizando-se tampão bicarbonato de amônio (50 mM), pH 8,0. (Painel inferior) Isoterma de ligação (calor normalizado pela concentração de titulante em função da razão molar de suramina pela de MjTX-II) da titulação.73
- Figura 25.** Interação das moléculas de suramina com a estrutura cristalográfica da MjTX-II. As moléculas da esquerda e direita representam as moléculas ligadas nos diferentes monômeros, sendo os contatos polares representados pelas linhas tracejadas e os contatos hidrofóbicos pelas arcos irradiando raios (em vermelho). Figura desenhada utilizando-se o Ligplot (Wallace et al., 1995).75
- Figura 26.** Titulação calorimétrica isotérmica de crotoxina A (CA) em crotoxina B (CB). (Painel superior) Termograma (potência aplicada pelo equipamento para manter ambas as células à mesma temperatura em função do tempo) da titulação de CB (15 μM , célula de reação) com CA (240 μM , pipeta) à 25 °C utilizando-se tampão formato de amônio (50 mM), pH 6,55. (Painel inferior) Isoterma de ligação (calor normalizado pela concentração de titulante em função da razão molar de CA pela de CB) da titulação.78

Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Parâmetros termodinâmicos da interação entre ácido chicórico e BthTX-I determinados por ITC realizada à 20°C utilizando-se como tampão solução aquosa com 5% etanol e 5% piridina.52
- Tabela 2.** Parâmetros termodinâmicos da interação entre BthTX-I e íons zinco obtidos por calorimetria de titulação isotérmica. Constantes de dissociação (K_d) da interação BthTX-I:Zn²⁺ obtidas através do ajuste de modelos de ligação considerando 1, 2 ou 3 sítios independentes. A titulação foi realizada por 40 injeções (2 µL, 4s) de íons zinco (2000 µM)(pipeta) à BthTX-I (53 µM)(célula de reação) diluídos em 100 mM Tris HCl, 100 mM NaCl, pH 7.0 à 25°C.59
- Tabela 3.** Parâmetros termodinâmicos determinados por calorimetria de titulação isotérmica para a interação entre suramina e MjTX-I. Experimento realizado pela titulação de suramina (750 µM) em MjTX-I (50 µM) à 25°C diluídos em tampão bicarbonato de amônio (50 mM), pH 8.0.68
- Tabela 4.** Valores termodinâmicos para a ligação da suramina à MjTX-II. Resultados obtidos por calorimetria de titulação isotérmica (ITC) pela realização da titulação de suramina (600 µM) em MjTX-II (45 µM) à 25 °C diluídos em tampão bicarbonato de amônio (50 mM), pH 8,0.74
- Tabela 5.** Parâmetros termodinâmicos obtidos na titulação de crotoxina A (CA, 240 µM, pipeta) em crotoxina B (CB, 15 µM, célula de reação) diluídos em tampão formato de amônio (50 mM) pH 6.55 à 25 °C.79

Lista de Abreviações

Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
ATP	Adenosina trifosfato
BthTX-I	Bothropstoxina-I
CA	Crotoxina A
cal	Caloria, unidade de energia
Ca ²⁺	Íons cálcio
CB	Crotoxina B
CD	Dicroísmo circular
CRISPs	Proteína secretada rica em cisteína
CTX	Crotoxina
Cys	Cisteína
Da	Dalton, unidade de massa atômica
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
g	Gramma, unidade do Sistema Internacional de Unidades
Gln	Glutamina
His	Histidina
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
ITC	Calorimetria de titulação isotérmica
k	Quilo, prefixo de milhar no Sistema Internacional de Unidades
k_a	Constante de associação
k_d	Constante de dissociação
L	Litro, unidade de volume
Leu	Leucina
Lys	Lisina
m	Mili, prefixo de 1 por mil no Sistema Internacional de Unidades
M	Molar, unidade de concentração por volume
MDiS	Sítio de ruptura da membrana
MDoS	Sítio catiônico de docagem na membrana
mol	Unidade quantidade de substância no Sistema Internacional de Unidades
MjTX-I	Moojenitoxina-I
MjTX-II	Moojenitoxina-II
n	Nano, prefixo de 1 por bilhão no Sistema Internacional de Unidades
n	Estequiometria
NTD	Doenças Tropicais Negligenciadas
OMS	Organização Mundial da Saúde
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial hidrogeniônico
Phe	Fenilalanina
PLA2s	Fosfolipases A2
s	Segundo, unidade de tempo

Ser	Serina
TFA	Ácido trifluoracético
Tyr	Tirosina
Val	Valina
W	Watt, unidade de potência
Zn ²⁺	Íons zinco
3FTX	<i>Three-finger toxins</i>
μ	Micro, prefixo de 1 por milhão no Sistema Internacional de Unidades
ΔC_p	Variação da capacidade térmica
ΔG	Variação da energia livre
ΔH	Variação da entalpia
ΔS	Variação da entropia

1.1. Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

Um princípio fundamental de todo processo biológico é o reconhecimento e a organização molecular, e o estudo de como tais processos ocorrem é fundamental para o entendimento bioquímico dos organismos vivos (Ladbury & Chowdhry, 1996). Macromoléculas biológicas são capazes de interagir com várias moléculas, pequenas ou grandes, com um alto grau de especificidade e com alta afinidade. Um pré-requisito para o melhor entendimento das bases moleculares das interações entre biomoléculas é através da caracterização e quantificação da energética que governa a formação do complexo. Conhecer a termodinâmica resultante de uma reação é de fundamental importância para a caracterização do mecanismo molecular de ligação. A termodinâmica reflete os vários tipos de forças que governam a ligação, tal como os efeitos de entropia da absorção/liberação de moléculas de água, a restrição dos graus de liberdade das cadeias principais dos polipeptídeos e de seus grupos laterais e as contribuições entálpicas na formação de ligações (Doyle, 1997). Calorimetria é a única técnica que possibilita estudar diretamente as forças físicas básicas entre macromoléculas em detalhes através da medida de quantidades de calor ou de efeitos de calor (Perozzo et al., 2004).

A técnica de calorimetria de titulação isotérmica (*Isothermal Titration Calorimetry*, ITC) é utilizada para a obtenção direta das constantes de equilíbrio de ligação e da entalpia de ligação resultantes da interação entre macromoléculas ou entre macromoléculas e pequenos ligantes, sem o uso de espécies marcadoras de interação. Na maioria das metodologias de detecção, como espectroscopia de fluorescência ou de cintilação, o sinal experimental é proporcional ao total de ligante ligado à outra espécie (Biswas & Tsodikov, 2010). Entretanto, a calorimetria de titulação isotérmica se baseia na medida do calor liberado ou absorvido do ambiente, proporcional à taxa de interação de duas ou mais espécies em uma titulação, ou seja, na adição seriada de uma macromolécula em outra, à temperatura constante (Freire et al., 1990; Tellinghuisen, 2004).

ITC é a metodologia de maior precisão na determinação das constantes termodinâmicas relativas a uma interação molecular e permite a medida direta da entalpia de qualquer reação em condições isotérmica e isobárica. É o único método capaz de determinar a entalpia, entropia e a energia livre de ligação em apenas uma titulação, em uma única temperatura (Ladbury et al., 2010). É considerada a melhor metodologia para determinar a entalpia de ligação de várias reações, incluindo protonações, coprecipitação e interação proteína-ligante (Baranauskiene et al., 2009). Também é uma das técnicas que mais rápido se desenvolveu nos últimos anos no campo de interações moleculares, pois não requer imobilização, tampouco acoplamento das moléculas em substâncias fluorescentes para o estudo das ligações químicas e se beneficia das propriedades termodinâmicas intrínsecas de liberação ou absorção de calor que quase todas as reações

bioquímicas apresentam (Liang, 2008). Quando combinada com técnicas ortogonais, como cristalografia, espalhamento dinâmico de luz (DLS), dicroísmo circular (CD), etc., possibilita a descrição das interações entre macromoléculas biológicas, dados que podem ser usados no desenvolvimento e otimização de compostos farmacológicos, bem como na elucidação de fatores que determinam a especificidade de interações (Pierce et al., 1999; Klebe, 2015).

1.1.1. Métodos de detecção de calor

As medidas calorimétricas podem ser feitas, de modo geral, de 3 diferentes maneiras: (i) com mudança de temperatura (adiabático ou isoperibol); (ii) por condução de calor, e; (iii) por compensação de potência à temperatura constante (isotérmico). Os calorímetros de titulação utilizados atualmente são majoritariamente do modelo de compensação de potência, uma vez que a implementação de aparelhos com este modelo de medição possibilitou um melhor tempo de resposta, resultando em medidas mais precisas de pequenos calores da reação (McKinnon et al., 1984; Velazquez-Campoy & Freire, 2005).

Como exemplo de calorímetro do tipo de compensação de potência, podemos citar o microcalorímetro iTC₂₀₀ (Malvern Instruments), que é composto basicamente por: 2 células, uma de referência e uma de reação, nesta onde de fato ocorrerá a titulação e, sensores/controladores de temperatura encerrados em uma caixa termicamente isolada do ambiente externo. É composto também por uma micropipeta automática responsável por homogeneizar as soluções dentro da célula de reação e por fazer as injeções da titulação da espécie titulante na célula de reação, conforme descritos esquematicamente na figura 1.

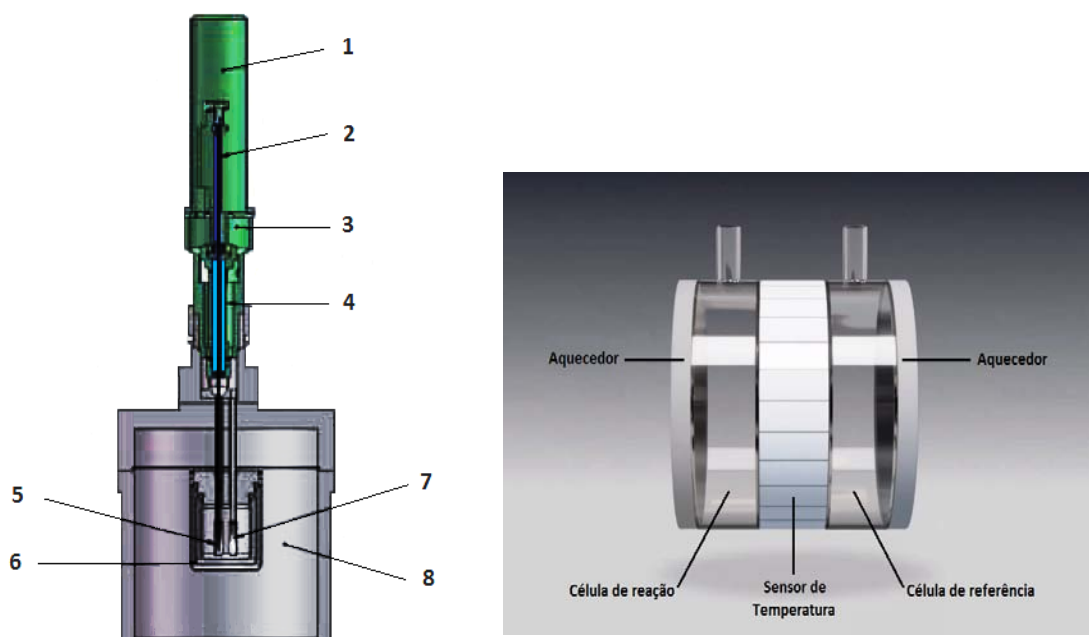


Figura 1. Esquema ilustrativo de um microcalorímetro de titulação isotérmica (iTC₂₀₀, Malvern Instruments). (Esquerda) Desenho esquemático de um microcalorímetro iTC₂₀₀ no qual está ilustrado a (1) pipeta, (2) êmbolo da pipeta (azul escuro), (3) motor de rotação, (4) pipeta (azul claro), (5) célula de amostra (com a pipeta em seu interior), (6) isolante térmico, (7) célula de referência e (8) revestimento térmico externo. (Direita) Ampliação (zoom) do desenho esquemático da região das células de reação e referência e sistema de controle de temperatura composto por sensor de temperatura e aquecedores. Figuras Adaptadas de Malvern Instruments (www.malvern.com).

Os calorímetros mais modernos (ITC₂₀₀, PEAQ-ITC, Malvern Instruments) apresentam volumes de células de reação diminutos (~200 µL) quando comparados aos modelos anteriores de volume de célula de ~1.4 mL (VP-ITC, GE HealthCare), por exemplo. Os instrumentos atuais possibilitam a medida de fluxos de calor da ordem de 0.1 µcal/s, determinando precisamente taxas de reação da ordem de 10⁻¹² mol/s e de constantes de dissociação da ordem de nanomolar (nM) (Freyer & Lewis, 2008). Com a apresentação do mais novo modelo de microcalorímetro (PEAQ-ITC, Malvern), as alterações de sensibilidade referem-se à melhoria do ruído de alta frequência, oferecendo maior confiança ao usuário quando a relação sinal-ruído é menor e, também foram implementadas novas rotinas de análise de dados, mais intuitivas e automatizadas, entretanto a concentração e volume necessário de amostra continuam os mesmos.

Nesse tipo de equipamento, anteriormente à titulação, uma potência constante (<1 mW) é aplicada à célula de referência. Este sinal aciona o aquecedor da célula de reação, e esta potência aplicada representa a linha de base (Fig. 2, painel superior, linha vermelha). A quantidade diretamente mensurada em um experimento de ITC é a potência de entrada dependente do tempo para manter as células de referência e de reação à mesma temperatura. Durante a injeção do titulante na célula de reação, calor é absorvido ou liberado dependendo se a natureza da interação entre as macromoléculas é endo ou exotérmica, respectivamente. Para uma reação exotérmica, a

temperatura na célula de reação tenderia a subir e com isso, a potência de *feedback* vai ser diminuída, para manter as duas células à mesma temperatura (Fig. 2, painel superior, linha preta). Nas reações endotérmicas, a potência vai ser aumentada para a manutenção da temperatura constante, uma vez que a interação vai retirar energia do ambiente (Velazquez-Campoy & Freire, 2005). O calor gerado ou absorvido durante a titulação é proporcional à fração de ligação da espécie titulante ao titulado. Por isso, é de extrema importância a correta determinação das concentrações iniciais das espécies titulante e titulada para as injeções iniciais, fazendo com que todo ou quase todo o titulante se ligue ao titulado, resultando em considerável sinal exo ou endotérmico, dependendo da natureza da associação no início da titulação (Freire et al., 1990; Pierce et al., 1999).

No termograma gerado em um experimento típico de ITC, os calores iniciais decorrentes da reação entre ambas as espécies são maiores que os gerados nas injeções subsequentes do titulante, pois no início da titulação há um excesso de sítios de ligação não ocupados na espécie titulada. Com isso, os calores gerados no início da titulação são resultado da reação “completa” do titulante adicionado. Com o prosseguimento da titulação, menores quantidades de titulante se ligam à espécie titulada e novas espécies passam a aparecer na célula de reação: titulante livre, titulado com sítios de ligação não ocupados e complexo formado. Já nas últimas injeções é de fundamental importância que a espécie titulada esteja toda saturada e que o calor gerado ou absorvido seja proporcional ao calor de diluição do titulante (Biswas & Tsodikov, 2010), acabando a titulação majoritariamente com moléculas do titulante livres e moléculas do complexo titulante-titulado formadas.

No tratamento dos dados gerados pelo calorímetro é possível calcular a variação de calor das reações de titulação através da integração da potência aplicada durante a titulação ($\mu\text{cal/s}$) normalizada pela concentração do titulante em função da razão molar das espécies titulante e titulada (painel inferior, Fig. 2). Com base nessa isoterma é possível determinar as variações de entalpia (ΔH), a estequiometria da titulação (n) e a constante de dissociação (k_d) entre as espécies tituladas. Com base nesses parâmetros é possível calcular a variação da entropia (ΔS) e a energia livre de ligação (ΔG).

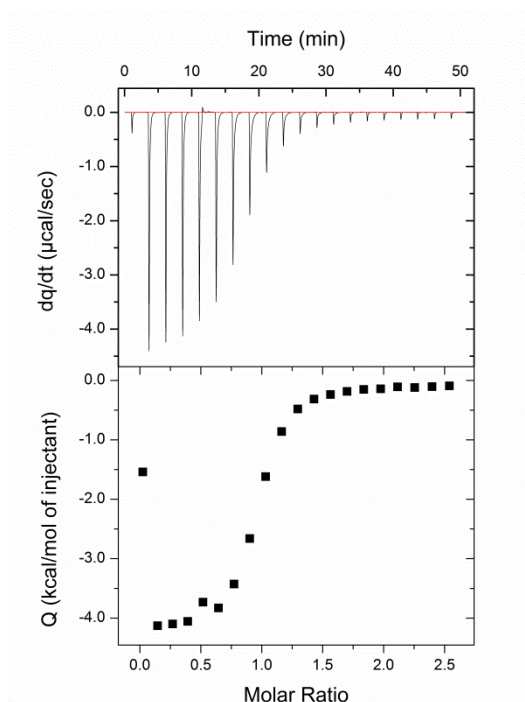


Figura 2. Calorimetria de titulação isotérmica da titulação de íons cálcio (5 mM) em EDTA (0.4 mM), ambos diluídos em tampão MES (10 mM) à 25°C. (Painel superior) Dados brutos de calorimetria de titulação isotérmica (linha preta) e linha de base (linha vermelha). (Painel inferior) Isoterma da titulação, que representa a energia medida em cada injeção normalizada pela molaridade do titulante (eixo das ordenadas) em função da razão molar de titulante por titulado (eixo das abscissas).

Há algumas razões para a crescente popularidade da técnica de calorimetria de titulação isotérmica no campo de ciência de proteínas: (i) a técnica é de fácil realização, resultando em uma grande quantidade de dados termodinâmicos com pouca quantidade de proteína; (ii) em alguns casos as constantes de dissociação são similares ou indistinguíveis para um conjunto de interações de proteína e ligantes, mas a determinação da entalpia e entropia ajudam na diferenciação entre os sítios; (iii) embora não seja possível obter a correlação completa entre os dados termodinâmicos e os cristalográficos, é possível chegar às conclusões comparando os dados com as alterações conformacionais das proteínas; (iv) os parâmetros termodinâmicos juntamente com a área de contato da interface formada na interação também ajudam no entendimento das interações (Liang, 2008). Entretanto, a metodologia também apresenta algumas desvantagens, tais como: em casos de interações complexas, em algumas vezes, é gasto um grande tempo e quantidades de amostras para se otimizar as condições de titulação; inabilidade em determinar constantes de dissociação menores que nanomolar (nM) e maiores que milimolar (mM) em apenas uma titulação, sendo necessários algumas vezes ensaios de competição, e; complexidade da análise dos dados para modelos complexos de ligação (Vega et al., 2015).

1.1.2. Relações termodinâmicas no fenômeno das interações moleculares

A descoberta e otimização de novas pequenas moléculas envolve várias propriedades físico-químicas do possível ligante, particularmente sua afinidade de ligação para o alvo receptor. Uma das formas de se otimizar o sistema é conhecendo as propriedades termodinâmicas que governam o processo de ligação. Este processo é multifatorial e inclui a formação de ligações de hidrogênio, interações de van der Waals e contatos hidrofóbicos, desolvatação, mobilidade residual, dinâmica e estrutura das águas ligadas às moléculas em estudo (Klebe, 2015). Por isso, uma das principais finalidades nas medidas calorimétricas de interação entre moléculas químicas é obter conhecimento de como os parâmetros termodinâmicos se relacionam com a estrutura do complexo formado (Baranauskienė et al., 2009). Um aspecto do conhecimento da termodinâmica de ligação de uma reação, ou seja, dos parâmetros ΔG , ΔH , ΔS e ΔC_p , é o impacto que eles podem ter na caracterização do mecanismo molecular de ligação, uma vez que a termodinâmica revela aspectos sobre a química funcional de uma interação. Os parâmetros supracitados refletem os vários tipos de forças moleculares que guiam a ligação, como, por exemplo, os efeitos entrópicos da absorção/liberação de moléculas de água e moléculas iônicas, a restrição dos graus de liberdade das cadeias principais e de grupos laterais de polipeptídeos, as contribuições entálpicas de formação/quebra de ligações, a área de superfície acessível à água, dentre outras (Doyle, 1997, Klebe, 2015).

Por exemplo, quando se estuda as interações de um composto que se liga à uma proteína alvo, o interesse principal é na elucidação de quais grupos funcionais do composto contribui para os parâmetros termodinâmicos. Ou seja, se busca quais mudanças químicas devem ser feitas no composto para deixá-lo termodinamicamente mais favorável, entálpica ou entropicamente, e para que sua ligação seja mais específica. Entretanto, essas correlações entre energia-estrutura não são bem conhecidas e a adição de alguns compostos funcionais pode ser bastante complicada (Baranauskienė et al., 2009). Mesmo assim, através de ITC já foi comprovado que determinados resíduos tem grande importância estrutural, pois após mutações sítio-dirigidas a formação do complexo proteína-peptídeo foi inibida (de Barros, em elaboração), bem como até alterações na quiralidade de compostos afetam a afinidade pelos seus alvos originais (Grecu et al., 2016).

Apesar da deconvolução de cada um dos parâmetros termodinâmicos à macromoléculas biológicas em nível atômico ser uma tarefa extremamente difícil e, em alguns casos inviável, vários progressos tem sido relatados. Há ao menos duas bases de dados para tentar ajudar na correlação dos dados termodinâmicos com os dados estruturais: (i) base de dados SCORPIO, que é composta de interações estruturais e termodinâmicas de ligações entre proteínas e um banco de dados de pequenos ligantes (Olsson et al., 2008) e; (ii) PDBcal (Li et al., 2008), composta por

uma vasta gama de dados termodinâmicos e dados estruturais de complexos receptor-ligante, que é composta por dados de energia livre, entalpia, entropia e capacidade térmica, medidas por ITC. Além disso, apresenta as condições experimentais utilizadas nos experimentos. Todavia, há alguns relatos de repetições de experimentos em diferentes laboratórios e calorímetros que mostram consideráveis discrepâncias entre os resultados (Baranauskienė et al., 2009), o que dificulta ainda mais relacionar padrões termodinâmicos a grupos específicos de ligações químicas.

1.1.3. Características geométricas das isotermas de ligação e informações contidas nos resultados de ITC

Considerando-se uma reação de titulação calorimétrica isotérmica na qual uma reação do tipo $M + L \rightleftharpoons ML$ ocorra, em que a substância M é uma macromolécula e está alocada na célula de reação, também chamada de titulado, L é um ligante e está colocado na pipeta, chamado titulante, e ML é o complexo formado durante a titulação. O equilíbrio entre as espécies pode ser descrito matematicamente pelas equações:

$$[M]_T = [M] + [ML] \quad (1)$$

$$[L]_T = [L] + [ML] \quad (2)$$

em que $[M]_T$ e $[L]_T$ representam as concentrações totais do titulado e do titulante e $[M]$, $[L]$ e $[ML]$ as concentrações na condição de equilíbrio do titulado, titulante e do complexo titulado-titulante, respectivamente. A condição de equilíbrio da reação é dada por:

$$[ML] = k_a[M][L] \quad (3)$$

em que k_a é a constante de associação entre as espécies.

Resolvendo as equações (1) e (2) em função da concentração do complexo ($[ML]$):

$$[M]_T = [ML] + \frac{[ML]}{(k_a([L]_T - [ML]))} \quad (4)$$

obtemos a equação quadrática a seguir:

$$[ML]^2 - [ML] \left([M]_T + [L]_T + \frac{1}{k_a} \right) + [M]_T[L]_T = 0 \quad (5)$$

que nos dá duas possíveis soluções, sendo a fisicamente relevante, a solução descrita abaixo:

$$[ML] = \frac{[M]_T + [L]_T + \frac{1}{k_a} - \sqrt{\left([M]_T + [L]_T + \frac{1}{k_a} \right)^2 - 4[M]_T[L]_T}}{2} \quad (6)$$

Usando o parâmetro adimensional " r " introduzido por Wiseman e colaboradores (Wiseman et al., 1989), a equação seguinte é obtida:

$$[ML] = [M]_T \frac{1 + r + X_R - \sqrt{(1 + r + X_R)^2 - 4X_R}}{2} \quad (7)$$

em que $r = 1/(k_a[M]_T)$ e $X_R = [L]_T/[M]_T$. E da equação acima se pode calcular a razão molar (X_R) do complexo formado

$$\frac{[ML]}{[M]_T} = \frac{1 + r + X_R - \sqrt{(1 + r + X_R)^2 - 4X_R}}{2} \quad (8)$$

A quantidade de calor total (Q_T) gerada ou absorvida no calorímetro devido à formação do complexo ML é dada por

$$Q_T = V_0[ML]\Delta H = V_0\Delta H[M]_T \frac{1 + r + X_R - \sqrt{(1 + r + X_R)^2 - 4X_R}}{2} \quad (9)$$

em que V_0 é o volume da cela de reação e ΔH é a entalpia de ligação.

A representação da isoterma de Wiseman, forma mais recomendada para apresentação dos resultados de ITC, é obtida pelo cálculo da derivada $dQ_T/V_0d[L]_T$, que é a forma diferencial equivalente ao calor incremental por injeção, ΔQ_T , normalizado pelo incremento molar do ligante injetado na cela de reação, Δn_{LT} ,

$$\frac{\Delta Q_T}{\Delta n_{LT}} \approx \frac{dQ_T}{V_0d[L]_T} = \frac{d[ML]}{d[L]_T} \Delta H \quad (10)$$

A derivada com respeito a $[L]_T$ pode ser convertida em uma derivada relacionada à razão molar, X_R , aplicando a relação

$$\frac{d}{d[L]_T} = \frac{d}{dX_R} \frac{dX_R}{d[L]_T} = \frac{1}{[M]_T} \frac{d}{dX_R} \quad (11)$$

que considera a concentração da macromolécula constante durante a titulação. Aplicando-se as equações (10) e (11) à equação (9), obtém-se a isoterma de Wiseman:

$$\frac{dQ_T}{V_0d[L]_T} = \left(\frac{1}{2} + \frac{1}{2} \frac{1 - r - X_R}{\sqrt{X_R^2 - 2X_R(1 - r) + (1 + r)^2}} \right) \Delta H \quad (12)$$

A isoterma de Wiseman (Wiseman et al., 1989) (Fig. 3) é a representação da $dQ_T/V_0d[L]_T$ em função da razão molar, X_R , que é calculada assumindo que não há diluição nem da macromolécula nem do ligante utilizados na titulação que, segundo Velazquez-Campoy (2015), é igual à obtida usando-se um quociente incremental ao invés da derivada em função de $[L]_T$, e da diluição da macromolécula e do ligante em função das injeções. Isso se deve ao fato que a diluição da macromolécula está implicitamente considerada quando do cálculo dos valores da razão molar ao longo da análise dos dados e, por isso, a aproximação na equação 11 fica pequena.

Como explicado no trabalho original de Wiseman e colaboradores (1989), o parâmetro adimensional $r = 1/k_a[M]_T = k_d/[M]_T$ determina o formato da isoterma de ligação (Fig. 3). Entretanto, o trabalho original foi discutido em função da constante " c ", dada pelo inverso de " r ",

$$c = 1/r = k_a[M]_T = [M]_T/k_d \quad (13)$$

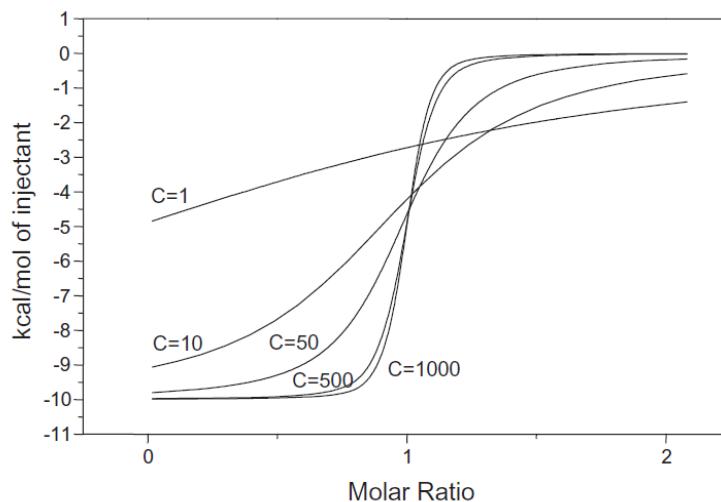


Figura 3. Simulação de isotermas ilustrando a dependência da forma da curva com o produto da constante de associação e a concentração total da macromolécula titulada. As curvas são simuladas para vários valores da inversa da constante de Wiseman (c), como descrito no gráfico. Adaptado de Perozzo et al., 2004.

Basicamente três diferentes regimes de afinidade de ligação podem ser descritos em função do parâmetro " c " descrito por Wiseman e colaboradores (1989): (i) regime de baixa afinidade ($c < 1$), em que a concentração inicial da espécie titulada é muito menor que a constante de dissociação (k_d) e a saturação será atingida apenas em altas concentrações do titulante (Turnbull & Daranas, 2003), ou seja, com $[L]_T > k_d$, uma vez que uma pequena fração do titulante se liga ao titulado. Com isso, não é possível determinar a entalpia de formação do complexo e, em algumas vezes, é possível determinar o K_d com precisão razoável; (ii) regime de alta afinidade ($c > 1000$), no qual a concentração do titulado é muito maior que a constante de dissociação ($M_0 \gg K_d$) e todo o titulante se liga ao titulado até sua saturação e nas ligações subsequentes não ocorre ligação. A formação do complexo é quase linear até a saturação do titulado, e por isso a isoterma de ligação parece uma função degrau, sendo que nessas titulações o ΔH é determinado com excelente precisão, enquanto o k_d é determinado com altos erros associados; (iii) regime de média afinidade ($10 < c < 1000$), é o mais informativo se realizado em condições ótimas. Neste regime, a isoterma de ligação contém um ponto de inflexão bem definido e a curva não se caracteriza por uma função degrau, e sim, nos casos mais simples de estequiometria 1:1, por uma curva sigmóide, sendo nessa titulação possível calcular tanto o k_d

quanto o ΔH com excelente confiabilidade (Biswas & Tsodikov, 2010). Em uma titulação ideal o ponto de inflexão deve ficar na metade da titulação e a variação de calor detectada deve ser grande o suficiente para possibilitar o cálculo do k_d e do ΔH em uma única titulação (Biswas & Tsodikov, 2010).

Vários trabalhos sobre o regime ideal do valor "c" foram reportados, afirmando que este deveria variar entre 10 e 100 (Thomson & Ladbury, 2004), 1 e 500 (Turnbull, 2005) e 5 a 1000 (Peters et al., 2009). Entretanto, diferentes metodologias de análises foram utilizadas, algumas com a inclusão de erros experimentais (Broecker et al., 2011) enquanto outras não continham erros experimentais nem de alta nem baixas frequências (Biswas & Tsodikov, 2010). Um dos trabalhos mais atuais sobre o tema defende a determinação da estequiometria e variação de entalpia com melhores intervalos de confiança para maiores valores de "c" enquanto o k_d pode ser calculado com a melhor precisão com valores de "c" próximos a 40 (Broecker et al., 2011).

Uma das características geométricas da isoterma de Wiseman é o ponto de inflexão da curva, que ocorre para titulações com valores de "c" maiores que 1. Este ponto é definido na maior inclinação da isoterma de ligação, que pode ser definido calculando-se a primeira (Eq. 14) e segunda derivada (Eq. 15) da isoterma da titulação em função da razão molar (X_R):

$$\frac{d}{dX_R} \left(\frac{dQ_T}{V_0 d[L]_T} \right) = - \frac{1}{2\sqrt{X_R^2 - 2X_R(1-r) + (1+r)^2}} \cdot \left(1 - \frac{(1-r-X_R)^2}{X_R^2 - 2X_R(1-r) + (1+r)^2} \right) \Delta H \quad (14)$$

$$\frac{d^2}{dX_R^2} \left(\frac{dQ_T}{V_0 d[L]_T} \right) = - \frac{3}{2} \frac{1-r-X_R}{\sqrt{(X_R^2 - 2X_R(1-r) + (1+r)^2)^3}} \cdot \left(1 + \frac{(1-r-X_R)^2}{X_R^2 - 2X_R(1-r) + (1+r)^2} \right) \Delta H \quad (15)$$

Resolvendo a equação 15, constata-se que o calor normalizado no ponto de inflexão é metade da entalpia de ligação (Eq. 16), independentemente do valor "c", e que a inclinação da reta é dependente da variação da entalpia e da constante "c" (Eq. 17), sendo proporcional à constante de dissociação (Velazquez-Campoy, 2015).

$$\frac{dQ_T}{V_0 d[L]_T} = \frac{1}{2} \Delta H \quad (16)$$

$$\frac{d}{dX_R} \left(\frac{dQ_T}{V_0 d[L]_T} \right) = - \frac{1}{4} \sqrt{c} \Delta H \quad (17)$$

Essas características geométricas têm grande importância uma vez que esses pontos podem ser informativos no início da análise de dados, pois o ponto de inflexão é

aproximadamente a metade da entalpia da reação, enquanto a inclinação da reta dá uma estimativa inicial para o cálculo da constante de dissociação (k_d) da reação.

Outra característica geométrica a ser destacada é a diferença dos interceptos com o eixo das ordenadas, ou seja, entre o suposto calor infinitesimal gerado por uma suposta injeção infinitesimal de titulante (Eq.18) e o calor gerado apenas pela diluição do titulante, ao final da titulação (Indyk & Fisher, 1998).

$$\lim_{X_R \rightarrow 0^+} \frac{dQ_T}{V_0 d[L]_T} = \frac{c}{c+1} \Delta H \quad (18)$$

Caso o valor da constante "c" seja bastante alto, essa diferença será muito próxima da entalpia de ligação da reação desde que todo o ligante se ligue ao titulado, que o calor por *mol* seja igual à entalpia molar de ligação e que o aumento da concentração de titulante seja igual ao aumento da concentração do complexo formado. Todavia, para pequenos valores de "c" a entalpia observada na titulação pode ser muito menor que a entalpia de ligação (Velazquez-Campoy, 2015).

O ponto de equivalência ou estequiométrico corresponde ao ponto de razão molar igual a 1 ($X_R = 1$), que é quase equivalente ao ponto de inflexão para valores de "c" grandes, enquanto para valores muito grandes de "c" ($c > 1000$), os pontos de equivalência e de inflexão correspondem à quase saturação completa do titulado.

Entretanto, apesar dos parâmetros geométricos permitirem uma estimativa inicial dos parâmetros de afinidade e de entalpia, eles devem ser refinados através de procedimentos de ajustes não linear das isotermas de ligação (Vega et al., 2015).

Os processos de ajustes dos dados são realizados tendo como base o conhecimento do tipo de interação entre a espécie titulada e titulante, sendo que alguns parâmetros devem ser incluídos no ajuste dos dados baseados nos modelos matemáticos que descrevem o equilíbrio da ligação: (i) estequiometria da reação; (ii) constante de associação (ou de afinidade) ou dissociação, k_a ou k_d , respectivamente; (iii) caracterização das contribuições entálpica e entrópica para a energia livre de ligação; (iv) caracterização de múltiplos sítios e cooperatividade positiva ou negativa para os casos de múltiplos sítios; (v) caracterização da dependência do equilíbrio de ligação com variáveis como pH, força iônica do tampão, entre outros (Freire et al., 1990). Os parâmetros acima relacionados estão abaixo explicados.

1.1.3.1. Estequiometria

A estequiometria, n , de uma reação descreve as relações quantitativas entre 2 ou mais substâncias em uma reação física ou química. Na calorimetria de titulação isotérmica, a

determinação da estequiometria de ligação tem um papel fundamental na caracterização dos mecanismos de ligação de macromoléculas biológicas (Doyle, 1997).

Com base nas concentrações de ambas as espécies em interação, a estequiometria de ligação pode ser determinada através da razão molar das espécies no ponto de inflexão do termograma. No processo de análise de dados, o valor da estequiometria pode ser utilizado como um valor variável, a ser ajustado no processo de minimização de erros dos parâmetros experimentais, como pode ser mantido fixo, caso se tenha informação do sistema em estudo. Outra possibilidade é ajustá-la para um valor conhecido de estequiometria, baseando-se no conhecimento prévio do sistema em estudo e de fatores de correção de concentração da espécie titulada e/ou titulante (Broecker et al., 2011). Ademais, em casos em que a estequiometria seja bem conhecida, o seu valor pode servir apenas para correção da concentração, geralmente da solução titulada, a qual se tem maior dificuldade no preparo quando comparada à solução titulante, para a qual a concentração, via de regra, é tida como conhecida com maior precisão (Tellinghuisen, 2004).

Uma grande quantidade de fatores pode influenciar o valor da estequiometria, fazendo com que seu valor seja um valor não inteiro. Os principais determinantes para isso são: erro nas concentrações da espécie titulada ou titulante (Freyer & Lewis, 2008), ligação inespecífica, degradação ou baixa qualidade do titulado (estado inativo, sem *folding* correto) (Tellinghuisen, 2004; Grüner et al., 2014). Por isso, a análise da estequiometria da reação também pode ser considerada um excelente parâmetro de qualidade na análise de ensaios de ligação de diferentes lotes de proteínas purificadas em diferentes condições, bem como na análise de proteínas recombinantes expressas em diferentes linhagens celulares ou mesmo em testes de estabilidade de congelamento-descongelamento (Doyle, 1997).

1.1.3.2. Variação de entalpia (ΔH)

A entalpia, H , é definida como

$$H = U + pV \quad (19)$$

em que U é a energia interna, p a pressão do sistema e V o volume. Entretanto, considerando que em um experimento de calorimetria de titulação isotérmica a pressão é constante durante a titulação, pode-se assumir que a variação da entalpia é igual à variação de energia, q , devido à reação química da titulação

$$\Delta H = q \quad (20)$$

As interações entre duas ou mais moléculas geralmente são acompanhadas de liberação ou absorção de energia do meio onde acontecem e, por isso, são caracterizadas como reações

exotérmica ou endotérmica, respectivamente. Nas reações de calorimetria por titulação isotérmica tais comportamentos são representados na Fig. 4, sendo o termograma e a isoterma de ligação de uma reação endotérmica representada no painel esquerdo, enquanto uma reação exotérmica está à direita. As reações endotérmicas e exotérmicas são caracterizadas, por uma variação de entalpia positiva ($\Delta H > 0$) e negativa ($\Delta H < 0$) (Fig. 4), sendo que contribuem, respectivamente, de forma favorável ou desfavoravelmente para a energia livre de ligação (Pierce et al, 1999).

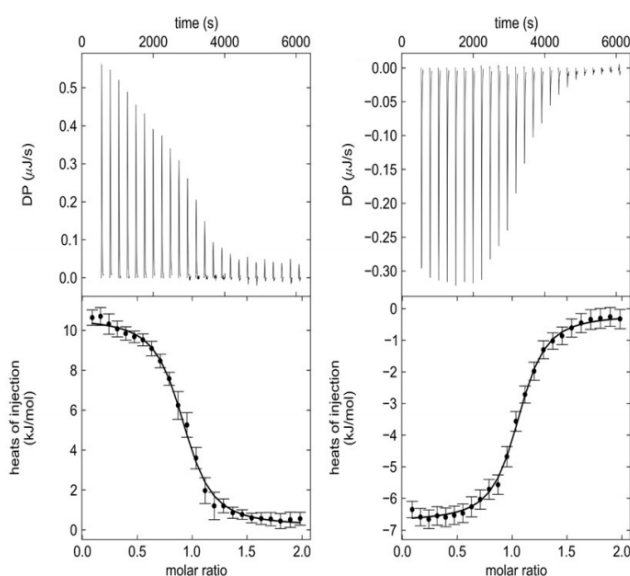


Figura 4. Termogramas e isotermas de ligação de experimentos de calorimetria de titulação isotérmica, entre espécies com estequiometria 1:1, representativos de uma reação endotérmica (esquerda) e exotérmica (direita). Adaptado de Rühmann e colaboradores (Rühmann et al., 2015).

A variação de calor medido pelo calorímetro durante as titulações reflete não somente o calor liberado ou absorvido decorrente da interação entre as espécies titulada e titulante, mas representa os efeitos de calor totais no interior da célula de reação. Por isso, além do calor intrínseco da interação, a medida experimental de calor tem contribuições provenientes de eventos não específicos como diluição das espécies titulada e titulante no tampão, calor de agitação, diferenças de temperatura entre a célula de reação e a pipeta, dentre outras. Essas contribuições devem ser determinadas pela realização de experimentos controle, para assim, se obter o calor apenas da interação entre as espécies titulada e titulante. Em geral, as contribuições não específicas são pequenas e, em algumas vezes desprezíveis, enquanto o calor da diluição da espécie titulante pode ser significativo e deve ser levada em conta na análise de dados. Em alguns casos, caso a saturação do titulado ocorra antes das últimas injeções, e caso o calor de diluição do titulante não seja concentração-dependente, pode-se atribuir o calor das últimas injeções da titulação como sendo o calor de diluição da espécie titulante (Perozzo et al., 2004).

Mesmo com a determinação e subtração dos calores inespecíficos, vários outros processos ainda podem estar contribuindo para a variação de entalpia observada (ΔH_{obs}) como, por exemplo, entalpia intrínseca da interação titulante-titulado (ΔH_{bind}), mudança no estado de protonação do ligante e da macromolécula livre ou ligada, mudança na solvatação devido à ligação titulado-titulante, mudanças conformacionais, dentre outros (Perozzo et al., 2004; Freire, 2005). Caso haja protonação/desprotonação na complexação das espécies, esta vai depender da entalpia de ionização do tampão (ΔH_{ion}), que pode ser determinada repetindo-se a titulação, no mesmo pH e temperatura, com tampões com diferentes entalpias de ionização, que possibilitará determinar o número de prótons (n_{H^+}) liberados ($n_{H^+} > 0$) ou absorvidos ($n_{H^+} < 0$) pelo tampão e então calcular a entalpia intrínseca de ligação (ΔH_{bind}) através da equação abaixo (Perozzo et al., 2004):

$$\Delta H_{obs} = \Delta H_{bind} + n_{H^+} \Delta H_{ion} \quad (21)$$

Outra forma de minimizar os efeitos de protonação/desprotonação é utilizando-se um tampão com baixa entalpia de ionização (Freyer & Lewis, 2008).

As contribuições entálpicas devido às alterações conformacionais não são facilmente determinadas, sendo em alguns experimentos possível apenas caso haja uma série de outras medidas calorimétricas com uma série de compostos relacionados e pode ser facilmente implementada em rotinas de otimização de fármacos, sendo frequentemente constante para uma mesma família de fármacos (Freire, 2005). Já em medidas com ligantes diferentes, essa contribuição é geralmente incorporada à variação de entalpia intrínseca da ligação.

Espera-se que ao final da análise de dados a entalpia intrínseca seja determinada, uma vez que é um dos fatores principais na verificação da qualidade das ligações na formação do complexo, e resultante da formação e quebra de muitas ligações químicas individuais, como ligações de hidrogênio, pontes salinas, interações de van der Waals entre a espécie titulada e titulante e da reorganização do solvente próximo à superfície da macromolécula (Perozzo et al., 2004; Freire, 2005; Velazquez-Campoy et al., 2006). Cada uma dessas interações contribui individualmente para produzir contribuições favoráveis ($\Delta H < 0$) ou desfavoráveis ($\Delta H > 0$), podendo a somatória destas resultar em uma variação menor que as variações específicas de cada interação (Fisher & Singh, 1995). Por isso, a dissecção da contribuição de cada ligação é extremamente difícil uma vez que a contribuição efetiva de uma ligação específica é o balanço entre a entalpia da reação da ligação entre a macromolécula e o solvente (Velazquez-Campoy et al., 2006; Ladbury et al., 2010).

A entalpia intrínseca da interação é composta de duas contribuições distintas e conflitantes: a entalpia favorável associada com a formação de ligações de hidrogênio e contatos

de van der Waals e a entalpia desfavorável associada à desolvatação de grupos polares (Freire, 2004). As interações de van der Waals são maximizadas por uma geometria perfeita entre o titulante e o titulado, enquanto a força das ligações de hidrogênio é máxima quando a distância e ângulo entre os átomos aceptores e doadores é ótima. Caso as distâncias e os ângulos estejam em regiões subótimas, a contribuição entálpica de uma ligação de hidrogênio além de poder ser menor ou mesmo nula, pode também se tornar desfavorável. A explicação para isso é que os grupos aceptores e receptores da ligação fazem ligações de hidrogênio com a água antes da interação. Na energética de ligação, a questão real é quão forte é a ligação de hidrogênio do titulado com o titulante em relação à ligação que o mesmo grupo fazia com a água anteriormente à interação, uma vez que as interações com a água são refletidas na entalpia de solvatação desses grupos (Freire, 2008). Por isso, uma variação de entalpia favorável ($\Delta H < 0$) é um indicativo que o titulante estabelece com a espécie titulada interações fortes o suficiente para compensar a entalpia desfavorável associada com a desolvatação (Ladbury et al., 2010). Entretanto, se uma entalpia de ligação desfavorável ($\Delta H > 0$) é observada, geralmente, isso indica que os grupos polares do titulante e titulado não formam ligações fortes e que a entalpia de desolvatação predomina (Freire, 2008).

Quando se trata de desenho e otimização de novos fármacos, alguns pesquisadores escolhem um modelo inicial que já possua variação de entalpia favorável na interação em um *screening* inicial. Esse tipo de ligação contribui não apenas para a afinidade, mas quando combinada com complementaridade de forma, ela também aumenta a seletividade, especialmente se os ligantes são direcionados a sítios doadores ou receptores únicos na molécula alvo. Apesar dessas aparentes vantagens, a otimização entálpica tem sido notoriamente difícil de ser implementada especialmente se comparada à otimização entrópica (Freire, 2008), pois apesar dos ganhos serem significativos em caso de formação de uma ligação em condições ótimas, as penalidades na entalpia de solvatação também são significantes se as ligações forem fracas ou não forem feitas de forma otimizada (Davies et al., 2003; Freire, 2004). E, como a energia requerida para desolvatar um grupo polar é substancial, a adição simples de grupos químicos com potencial de interação com o objetivo de estabelecer interações não covalentes podem consideravelmente reduzir a afinidade resultante (Ladbury et al., 2010).

Entretanto, é de fundamental importância que se busque compostos com diversas ligações de hidrogênio favoráveis ao seu alvo, pois além de, possivelmente, deixar a ligação entálpicamente favorável, deixa o composto menos susceptível às mutações que ocorrem frequentemente, por exemplo, em alguns tipos de vírus (Freire, 2005).

Outra forma de se mensurar a variação de entalpia é fazendo a medida espectrofotometricamente em diferentes temperaturas. Esta medida é realizada em função da dependência da temperatura da constante de associação, dada por:

$$\frac{\partial \ln K_a}{\partial \left(\frac{1}{T}\right)} = -\frac{\Delta H}{R} \quad (22)$$

$$\frac{\partial^2 \ln K_a}{\partial \left(\frac{1}{T}\right)^2} = \frac{T^2 \Delta C_p}{R} \quad (23)$$

Entretanto, esta metodologia apresenta algumas desvantagens: (i) por razões práticas, nem sempre é possível cobrir um vasto intervalo de temperaturas para estimar a constante de associação; (ii) entalpia e entropia são temperatura-dependentes e a energia livre é pouco dependente da temperatura nas condições experimentais geralmente utilizadas. Por isso, a compensação da entalpia-entropia faz com que seja difícil obter valores confiáveis da primeira e segunda derivada da constante de associação, ambas mensuradas diretamente por calorimetria; (iii) erros sistemáticos inerentes à métodos não calorimétricos que geram erros associados consideráveis (Chaires, 1997; Horn et al., 2002; Velazquez-Campoy & Freire, 2005).

Diversos estudos já foram realizados anteriormente e mostraram que o cálculo da entalpia de van't Hoff pode gerar um valor aproximado muito longe do real (Naghbi et al., 1995; Liu & Sturtevant, 1995) mesmo em casos em que mínimos quadrados lineares resultaram um bom coeficiente de correlação, tirando a influência da temperatura no sistema em estudo (Arena et al., 2015; Horn et al., 2002; Arena et al., 2016). Com isso, podemos afirmar que a técnica calorimétrica, é o melhor método para mensurar as entalpias de ligação de um sistema em interação.

1.1.3.3. Constante de dissociação (k_d) e energia livre de ligação (ΔG)

Outra característica que, assim como a variação de entalpia, é medida diretamente na isoterma de ligação é a constante de associação (k_a) ou afinidade, que está relacionada com a constante de dissociação (k_d) através da equação

$$k_d = \frac{1}{k_a} \quad (24)$$

sendo estas diretamente relacionadas à energia livre da ligação (ΔG) através da equação

$$\Delta G = -RT \ln(k_a) = RT \ln(k_d) \quad (25)$$

A energia livre de ligação é o parâmetro termodinâmico mais importante de uma ligação, uma vez que seu valor, em condições específicas de concentrações dos reagentes, direciona o

equilíbrio biomolecular. Se o valor de ΔG é negativo, a reação de ligação ou transição conformacional será espontânea numa medida ditada pela magnitude do ΔG . Se o sinal é positivo, a magnitude da variação especifica a quantidade de energia necessária para a formação dos produtos da reação. Além disso, este parâmetro quantifica a afinidade da ligação entre 2 moléculas em uma interação (Ladbury et al., 2010), determina a estabilidade do complexo formado e ainda é uma ferramenta analítica de caracterização fenomenológica da relação estrutura-função (Perozzo et al., 2004).

A afinidade de ligação de uma molécula pelo seu alvo resulta do balanço entre as forças de solvatação e das forças atrativas. Como regra, grupos químicos polares e apolares contribuem de forma diferente para a afinidade e seletividade devido à diferenças em suas características termodinâmicas. Enquanto a desolvatação de grupos polares e apolares é ligada à uma favorável variação de entropia ($-T\Delta S < 0$), a variação da entalpia de desolvatação de grupos polares é desfavorável ($\Delta H > 0$) e cerca de dez vezes maior (Freire, 2004) que a de grupos apolares, esta também sendo desfavorável (Kawasaki & Freire, 2011).

A afinidade entre as espécies titulada e titulante é máxima quanto maior e mais negativo for o ΔG , sendo que seus valores alvo, em regimes de otimização de fármacos, são da ordem de -12 a -16 kcal/mol. Esses valores correspondem à constantes de dissociação (k_d) da ordem de nano à décimos de nanomolar (nM). Entretanto, o valor da energia livre é composto pela soma das variações de dois diferentes termos, entálpico e entrópico

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (26)$$

e, por isso, valores de afinidade extremamente alta são obtidos geralmente quando tanto a entalpia quanto a entropia contribuem favoravelmente à ligação (Kawasaki & Freire, 2011), no caso, quando $\Delta H < 0$ e $-T\Delta S < 0$. Já foi observado que diferentes contribuições do ΔH e do ΔS resultaram no mesmo valor de ΔG e, por conseguinte, na mesma afinidade para uma molécula alvo. Entretanto, compostos com iguais afinidades, mas otimizados entálpicamente ou entropicamente não são equivalentes, pois suas interações que dão origem a entalpias ou entropias favoráveis são diferentes (Freire, 2004), podendo gerar diferentes especificidades e diferentes propriedades farmacológicas (Chaires, 2008). Por isso, devem-se estudar ambos os fatores uma vez que são cruciais para o entendimento detalhado da energia livre de ligação e a fim de melhor entender o processo de obtenção e otimização de moléculas a um alvo específico.

1.1.3.4. Variação da entropia (ΔS)

A variação da entropia (ΔS) de ligação não é determinada diretamente pela isoterma de ligação, mas em função da energia livre e da variação da entalpia de ligação, ambas variáveis observáveis na isoterma, através da equação

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (27)$$

A variação de entropia é composta principalmente pela entropia de solvatação e pelas alterações entrópicas conformacionais. A entropia de solvatação é favorável ($\Delta S > 0$ ou $-T\Delta S < 0$) e se origina da liberação de moléculas de água decorrente da desolvatação total ou parcial devido à ligação do titulante ao titulado. Uma entropia de solvatação favorável é a força predominante associada à energia livre de grupos hidrofóbicos (Freire, 2004). Sabe-se que a variação energética devido à desolvatação de um grupo polar é da ordem de 5-9 kcal/mol (Kawasaki & Freire, 2011), enquanto de grupos apolares é aproximadamente 10 vezes menor (Freire, 2004).

Quase todas as reações de ligação devem superar as penalidades entrópicas. A primeira variação de entropia desfavorável resulta da perda, em alguns casos, de no mínimo 6 graus de liberdade rotacionais e translacionais resultantes da ligação de 2 macromoléculas para formar um complexo, sendo que esta variação energética pode chegar a -15 kcal/mol ($\Delta S < 0$). A segunda perda se origina da restrição de ligações rotacionais individuais devido à formação do complexo, como por exemplo, quando uma molécula fica restrita à uma conformação particular quando ligada ao seu sítio receptor. Esta perda energética pode ser de aproximadamente -0.6 kcal/mol por ligação ($\Delta S < 0$). Essas perdas energéticas podem ser evitadas através do desenho de novas moléculas com ligações rígidas que possibilitem um encaixe perfeito no sítio receptor (Chaires, 2008).

Quando se trata do processo de descobrimento ou otimização de fármacos, a variação de entropia é mais fácil de ser otimizada quando comparado à variação de entalpia (Freire, 2008), uma vez que a otimização entrópica se deve, principalmente, à hidrofobicidade. Neste caso, a seletividade aumenta primeiramente pela complementaridade de forma e pela suposição da probabilidade de ligação por formas geometricamente similares (Freire, 2004). Entretanto, foi verificado após o sequenciamento de vários genomas que a ligação por complementaridade de forma é válida apenas para alguns alvos, pois vários alvos pertencem a proteínas de uma mesma família com sítios de ligação muito similares (Velazquez-Campoy & Freire, 2005), levando à ligação em alvos incorretos.

1.1.4. Análise de dados de ITC

Em uma análise termodinâmica o objetivo é determinar ΔG , ΔH , ΔS e suas dependências em função da temperatura, dada por ΔC_p , uma vez que estes 4 parâmetros fornecem a completa descrição da energética que governa as interações moleculares (Perozzo et al, 2004).

A análise dos dados de ITC é realizada pela estimação dos parâmetros variáveis (n , k_a e ΔH) através do ajuste dos dados de calor cumulativo ou dos calores individuais de cada injeção. A análise em função dos calores individuais, como citado anteriormente, é preferível, pois elimina as incertezas associadas com cada injeção sucessiva, que são maiores nos dados cumulativos (Freire et al., 1990).

Os dados experimentais de calorimetria de titulação isotérmica são geralmente apresentados na forma da isoterma de Wiseman (Wiseman et al., 1989). Esta forma de representação consiste na análise do gráfico do calor incremental por injeção de titulante normalizado pela molaridade do titulante (eixo das ordenadas) em função da razão molar do titulante pela do titulado (eixo das abscissas). Uma das vantagens desse tipo de representação é que caso outra titulação seja feita com o mesmo sistema de estudo, mas com diferentes volumes de injeção e/ou diferentes concentrações das espécies titulada ou titulante, a isoterma vai ser a mesma devido à normalização pela concentração da espécie titulante. Além disso, o uso da razão molar como a variável independente torna mais fácil a determinação da estequiometria da reação pelo ponto de inflexão, caso este exista, e caso as concentrações sejam determinadas com erros mínimos. Pela isoterma da ligação também é possível, através de suas características geométricas, obter dados preliminares sobre os parâmetros termodinâmicos (Velazquez-Campoy, 2015). Entretanto, apesar de algumas estimativas serem obtidas pelas formas geométricas da isoterma de ligação, valores de maior precisão são obtidos somente através do ajuste dos dados por polinômios de ligação (Freire et al., 2009; Vega et al., 2015; Velazquez-Campoy, 2015).

Com o intuito de determinar os parâmetros termodinâmicos relevantes às interações entre as moléculas, alguns passos comumente são seguidos (Velazquez-Campoy et al., 2004): primeiramente ajustar uma linha de base no termograma e realizar a integração dos picos. A linha de base pode ser determinada tanto de forma automática quanto manualmente no *add-on* do *software* Origin (v. 7.0, OriginLab), fornecido pelo fabricante, ou apenas automaticamente pelo *software* NITPIC (Keller et al., 2012; Scheuermann & Brautigam, 2015). Após, faz-se a checagem das concentrações das espécies titulada e titulante, que podem ser averiguadas inicialmente pela estequiometria da ligação, e caso seja necessário, fazer as correções nas mesmas e, em seguida, estimar os calores de diluição, ou pelas últimas injeções da titulação realizada ou através de experimentos controle, caso o calor de diluição da espécie titulante seja

concentração dependente. O calor de diluição, ou mesmo de interações inespecíficas, deve ser subtraído dos calores calculados nas injeções da titulação para melhor estimativa dos dados termodinâmicos. O último passo é determinar o modelo de ligação a ser utilizado para ajustar os dados da isoterma de ligação da titulação (Velazquez-Campoy et al., 2004).

Os polinômios de ligação, introduzidos por Wyman (1948, 1964) e revisados mais recentemente por Wyman e Gill (1990), introduziram um embasamento geral de termodinâmica estatística do estudo das interações entre ligantes e macromoléculas. Os polinômios são equivalentes à função partição, contém toda a informação sobre o sistema e permite a determinação das constantes termodinâmicas experimentais observáveis como o número de moléculas ligadas (n), variação de entalpia (ΔH), afinidade (k_a) entre as espécies. Ao contrário dos modelos de parâmetros dependentes, os parâmetros que definem os polinômios de ligação têm validade geral. Os polinômios de ligação são uma descrição matemática dos processos biológicos, físicos e químicos que descrevem a interação entre as espécies tituladas, nos quais as variáveis dependentes (calor ou fluxo de calor) são definidas como função das variáveis independentes (molaridade de titulante) e de outros parâmetros do modelo. Por isso, usa-se o modelo mais simples possível e que corrobore as informações já conhecidas do sistema em estudo, de modo que as equações de modelo sejam utilizadas para determinar os melhores valores para os parâmetros de ajuste à isoterma, como a k_a , ΔH e estequiometria (Freyer & Lewis, 2008). Caso não se tenham informações acerca do sistema em estudo, diferentes modelos podem ser ajustados aos dados experimentais e o modelo mais adequado, ou seja, o que apresentar melhor ajuste dos dados pode ser escolhido estatisticamente (Sant'Anna et al., 2016, Borges et al., 2017).

A metodologia de calorimetria de titulação isotérmica avançou muito nos últimos anos, entretanto, a análise de dados ainda se apresenta, em alguns casos, com limitações significativas. Por isso, todos os experimentos devem ser realizados de modo que as fontes de incertezas como quantificação do calor liberado pelo equipamento, erros nas concentrações das espécies titulada e titulante, erros na linha de base por problema no equipamento ou variações ambientais, variações das soluções tampão utilizadas; problemas nas operações com o equipamento, como bolhas de ar ou uso de velocidades de agitação não ótimas (Baranauskiene et al., 2009; Pethica, 2015; Tellinghuisen, 2003; Tellinghuisen, 2005; Keller et al., 2012; Tellinghuisen & Chodera, 2011), sejam minimizadas ou determinadas e subtraídas na análise de dados. Dentre os problemas frequentemente encontrados na análise dos dados obtidos podemos enumerar alguns: (i) problemas na determinação da linha de base; (ii) análise de dados com modelos de alta complexidade de um sistema sobre o qual não se tenham outras informações obtidas por

metodologias ortogonais; (iii) variações encontradas na realização do mesmo experimento entre diferentes laboratórios e operadores.

Em relação à integração da área dos picos, a linha de base (Fig. 2, linha vermelha) tem papel crucial e está sujeita à artefatos e ruídos de curta e longa escalas temporais (Keller et al., 2012). Esses artefatos são limitantes principalmente em estudos com baixas variações de entalpia ou para interações entre compostos com altas afinidades, nos quais são necessárias pequenas concentrações do titulante em relação ao titulado para garantir que uma fração dessas espécies estejam não ligadas. De modo particular, estas condições estão mais presentes nos calorímetros mais atuais, que se utilizam de menores volumes das espécies titulada e titulante (Brautigam et al., 2016). Os algoritmos de integração da área dos picos dos termogramas utilizados pelos fabricantes, em vários casos não são satisfatórios e, em várias titulações requerem que a linha de base seja calculada manualmente, baseada na inspeção visual do usuário (Keller et al., 2012), condição na qual podem ser introduzidos vies no estudo, uma vez que os resultados da isoterma são usados para avaliar se é necessária uma nova linha de base ou não (Scheuermann & Brautigam, 2015).

Uma das proposições para resolver esse problema está baseada no *software* NITPIC (Keller et al., 2012), que se baseia em uma metodologia automática de determinação dos picos baseado na análise da forma destes por decomposição de valores singulares em combinação com modelagem de mínimos quadrados das linhas de base pré e pós-injeções. Desse modo, o *software* pode efetivamente filtrar contribuições de ruído de curta duração e eventos acidentais, como bolhas de ar, no traçado da linha de base. A metodologia também possibilitou, pela primeira vez, estimar erros estatísticos para os pontos individuais da isoterma de ligação. Por sua vez, estes resultados melhoraram os limites de detecção para sistemas de alta afinidade e de baixa variação de entalpia e possibilitou a determinação dos parâmetros termodinâmicos (Keller et al., 2012). Entretanto, em sistemas que apresentaram baixo ruído, poucas variações da linha de base em longa escala temporal e com altos calores por injeção ($>50 \mu\text{J}$), o *software* Origin foi melhor na determinação das linhas de base quando comparado ao *software* NITPIC (Keller et al., 2012). Nas novas versões do *software* NITPIC (Brautigam et al., 2016), foram implementadas novas rotinas que agora também possibilitam a análise em larga escala, inviáveis no *software* Origin (v. 7.0).

Outra limitação significativa, e que também demonstra claramente a complexidade e a limitação da análise de dados é quando da realização de uma titulação em que as espécies tenham interação com modelos não padrão, ou seja, tenham 2 ou mais sítios de ligação, apresentem cooperatividade entre os sítios, dentre outros casos (Brautigam et al., 2016). O

software comercial de análise de dados que acompanha o equipamento (Origin v.7.0, OriginLab) apresenta poucos modelos de ligação já implementados e, por isso, algumas vezes o usuário deve desenvolver suas próprias rotinas de ajuste ou usar as já implementadas assumindo algumas simplificações (Vega et al, 2015), uma vez que em alguns casos, mesmo no *software* distribuído não há convergência dos dados no processo de minimização de erros.

Com o intuito de possibilitar análises mais complexas, o *software* SEDPHAT, inicialmente proposto para análise de dados de ultracentrifugação analítica, teve implementadas algumas rotinas para análise de dados de calorimetria de sistemas mais complexos (com mais de 1 sítio, cooperatividade, etc) (Houtman et al., 2007). Posteriormente, em novas versões foram também implementados algoritmos para análises globais de mais de um termograma e também a inclusão de dados provenientes de outras técnicas biofísicas ortogonais, como espalhamento dinâmico de luz, ressonância plasmônica de superfície, fluorescência, dentre outros (Zhao et al., 2015; Zhao & Schuck, 2015).

O processo de análise de dados de ITC é um processo iterativo, uma vez que primeiramente são definidos valores iniciais estimados dos parâmetros que vão modelar as equações do modelo de ligação desejado. Com estes valores são geradas curvas teóricas que são comparadas aos dados originais e estimativas de erros são feitas (Freire et al., 2009). Estes erros são minimizados através de algoritmos de minimização amplamente conhecidos (Newton-Raphson, Levenberg-Marquardt, etc.) até que a função erro seja minimizada ou mudanças não significativas desta sejam observadas (Vega et al., 2015).

Vários parâmetros devem ser incluídos na descrição dos modelos de ligação como, por exemplo, o número de sítios de ligação ou estequiometria da reação, força de associação entre as espécies, expressa em termos da constante de dissociação ou da variação de energia livre. Em caso de caracterização de múltiplos sítios, verificar se há cooperatividade entre os sítios, e se é positiva ou negativa, caracterização das contribuições entálpica e entrópica da associação e, se possível, caracterizar a dependência do equilíbrio de reação em função de variáveis como pH e força iônica das soluções tampão utilizadas (Freire et al., 1990).

Em casos complexos como de ligação em dois ou mais sítios, a maioria dos modelos já delineados assumem que as macromoléculas não sofrem alterações induzidas pelos ligantes como oligomerização ou mesmo mudanças de enovelamento (*folding*) (Doyle, 1997). Caso seja comprovado que tais alterações estejam ocorrendo, as variações calorimétricas medidas durante a titulação vão incluir as contribuições de tais eventos e, por isso, se tornam necessários modelos matemáticos capazes de analisar independentemente os eventos de ligação e processos de oligomerização (Vega et al., 2015; Salvador et al., 2015). Nesses casos, quando interações

complexas são estudadas e os *softwares* comerciais não são capazes de ajustar os dados adequadamente, a análise dos dados é feita majoritariamente através de polinômios de ligação, que são as equações matemáticas que vão modelar o sistema em estudo e possibilitarão a determinação dos parâmetros termodinâmicos e cinéticos da reação (Brown, 2009; Freire et al., 2009; Martinez et al., 2013; Vega et al., 2015).

2. Aspectos termodinâmicos da interação entre fosfolipases A₂ e fosfolipases A₂ homólogas de venenos de serpentes e inibidores

2.1. Importância do estudo de proteínas de veneno de serpentes

Envenenamento por picada de serpentes foi incluída na listagem das 24 condições e doenças tropicais negligenciadas (*neglected tropical diseases*, NTD) listadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2009 (Williams et al., 2010), e está entre as que mais causam mortes (WHO, 2014). Milhares de pessoas morrem anualmente como resultado de envenenamento por serpentes (Mohapatra et al., 2011; Kasturiratne et al., 2008) e essas estatísticas ainda podem estar subestimadas (Kasturiratne et al., 2008, Habib et al., 2015). Além disso, dependendo da espécie de serpente em questão, quando não causam mortes, podem deixar sequelas, sendo que necrose da região afetada está entre as consequências mais temidas pelos envenenamentos (Fernandes et al., 2014). Em algumas regiões da África, por exemplo, há poucas fontes de soros antiveneno efetivas, seguras e acessíveis (Brown, 2012) e, além disso, alguns tipos de soros amplamente utilizados estão sendo descontinuados do mercado e outros produtos alternativos antiveneno estão sendo utilizados, mas ainda sem evidências de efetividade e segurança (Alirol et al., 2015).

Estudos recentes sugerem que em algumas regiões como na África Ocidental, seriam necessários investimentos da ordem de US\$35 milhões para controlar as consequências dos envenenamentos por serpentes (Habib et al., 2015). Essa estimativa, quando comparada com os valores gastos e casos de soros antiofídicos em desenvolvimento em relação ao desenvolvimento de fármacos/vacinas para outras NTD como dengue, por exemplo, os índices são muito baixos, mesmo com diversas chamadas de ações emitidas por Organizações públicas e privadas e por institutos de pesquisas (Cheng & Winkel, 2001; Gutiérrez et al., 2013; Habib et al., 2015). Alguns dos fatores que mitigam as pesquisas e o desenvolvimento de novas terapias antiveneno são a baixa lucratividade, imprevisibilidade e fragmentação do mercado, que dificultam os investimentos das indústrias farmacêuticas (Brown, 2012). Entretanto, enquanto uma terapia realmente eficiente e segura não for desenvolvida, as estimativas de mercado continuarão sendo especulativas (Williams et al., 2010).

Os casos mais severos de envenenamento por serpentes são relacionados às espécies da família Elapidae e Viperidae. As espécies que causam o maior número de picadas e fatalidades são as *Echis* sp. no norte da África, *Bothrops asper* e *B. atrox* nas Américas Central e do Sul e *Naja* sp. e *Bungarus* sp. na Ásia. Entretanto, várias outras espécies, embora não responsáveis por um grande número de casos mundialmente constituem um sério problema em regiões específicas (Gutiérrez et al., 2006).

Estudos clínicos demonstram que geralmente os soros antiofídicos são eficazes na neutralização das toxinas responsáveis por efeitos sistêmicos como, por exemplo, hemorragia (Gutiérrez et al., 2006). Entretanto, essa terapia não é eficaz em danos aos tecidos próximos à picada, não pela falta de anticorpos neutralizantes, mas sim pelo rápido desenvolvimento da patologia local, que dificulta o acesso dos anticorpos à essas áreas antes de danos irreversíveis ocorrerem (Gutiérrez et al., 1998). Os danos locais são causados geralmente por fosfolipases A_2 miotóxicas, que tem como alvo o sarcolema e induzem uma degeneração aguda das fibras musculares, enquanto as metaloproteinases degradam componentes da matriz extracelular e levam à perda da integridade de microvasos sanguíneos (Fernandes et al., 2014).

Por isso, é de fundamental importância o desenvolvimento de novas terapias que sejam efetivas e interrompam os efeitos locais, pois apesar de, em alguns casos, não serem fatais, podem gerar graves sequelas, levando até a amputação de membros (Gutierrez et al., 2006, Fernandes et al., 2014).

2.2. Fosfolipases A_2 e Fosfolipases A_2 homólogas e suas relações com venenos ofídicos

As fosfolipases A_2 (PLA₂s) são enzimas caracterizadas por sua habilidade de hidrolisar especificamente a ligação ester *sn*-2 de substratos fosfolipídicos (Gutiérrez & Lomonte, 2013). As enzimas são classificadas em grupos baseados em suas sequências, massa molecular, padrões de ligações de dissulfetos, necessidade por cálcio, etc, e formam uma superfamília que atualmente contém 15 grupos separados e identificados, e diversos subgrupos (Burke & Dennis, 2009a; Schaloske & Dennis, 2006). Há 5 principais categorias de PLA₂s: as PLA₂ de baixa massa molecular secretadas (sPLA₂s); PLA₂s de alta massa molecular citosólicas Ca^{2+} -dependentes (cPLA₂s); PLA₂s Ca^{2+} -independentes (iPLA₂s); as acetilhidrolases de fator de ativação de plaquetas e; as PLA₂s lisossomais (Burke & Dennis, 2009b).

As sPLA₂s foram as primeiras PLA₂s descobertas e estão entre os componentes mais abundantes dos venenos de serpentes avançadas da superfamília Colubroidea, incluindo-se as famílias Viperidae e Elapidae, consideradas muito venenosas (Fry & Wüster, 2004). Estudos mostram que em algumas espécies de serpentes, as frações de PLA₂s podem chegar a 60% do volume do veneno (Calvete et al., 2009) e que estas toxinas estão ligadas à imobilização e morte das presas (Freitas et al., 1990), apresentando acelerado processo adaptativo e evolutivo para adquirir diversas e potentes funções de toxicidade (Nakashima et al., 1995) relacionadas à musculatura esquelética, junções neuromusculares e sistema hemodinâmico (Montecucco et al., 2008).

Estudos evolutivos demonstraram que as PLA₂s de venenos de serpentes se originaram de dois eventos distintos: de enzimas pancreáticas não tóxicas (grupo I) na família Elapidae e de enzimas inflamatórias (grupo II) na família Viperidae (Fry & Wüster, 2004). A estrutura tridimensional bem como a maquinaria catalítica foram altamente conservadas, entretanto alterações principalmente nos aminoácidos expostos durante a evolução possibilitou que as PLA₂s de veneno de serpentes desempenhassem uma variedade de atividades tóxicas (Kini & Chan, 1999), se adaptando ao reconhecimento de alvos moleculares e interferindo em processos fisiológicos (Kini & Evans, 1989; Gutiérrez & Lomonte, 2013).

Estudos sobre a atividade catalítica e toxicidade mostraram que as propriedades interfaciais de ligação e a especificidade de ligação a um alvo variam de acordo com as PLA₂s estudadas e que as reações de hidrólise de fosfolipídios é apenas uma das etapas do processo (Montecucco et al., 2008). Além disso, embora a maioria dos efeitos tóxicos das PLA₂s cataliticamente ativas são dependentes da hidrólise de fosfolipídios, efeitos não relacionados à catálise deste grupo de enzimas também foi mostrado (Stefansson et al., 1990).

A atividade enzimática das PLA₂s de veneno de serpentes causa a hidrólise da ligação *sn*-2 dos fosfolipídios, gerando um ácido graxo livre e um lisofosfolipídio. Ambos os produtos têm fator preponderante na geração de segundos mensageiros que tem importantes fatores fisiológicos. O ácido araquidônico, quando liberado da posição *sn*-2 dos fosfolipídios pode ser convertido em eicosanóides através da ação de uma variedade de enzimas (Funk, 2001) que podem exercer uma ampla gama de efeitos fisiológicos e patológicos. O lisofosfolipídio pode ser convertido em ácido lisofosfatídico ou ser acetilado, se transformando em fatores ativadores de plaquetas, que também apresentam uma variedade de papéis fisiológicos (Prescott et al., 2000; Burke & Dennis, 2009b).

Os grupos I e II das PLA₂s de venenos de serpentes possuem uma rede catalítica formada pelos aminoácidos His48, Asp49, Tyr52 e Asp99 (Arni & Ward, 1996). Junto com esses resíduos do *loop* de ligação de cálcio, o resíduo Asp49 coordena o íon cálcio, essencial para a hidrólise de fosfolipídios (Scott et al., 1990). Por isso, a habilidade em coordenar cálcio e a presença do resíduo Asp49 são fundamentais para as sPLA₂s apresentarem atividade catalítica. Entretanto, algumas mutações do resíduo Asp49 por Lys49 foram relatadas em algumas espécies (Lomonte et al., 2003), sendo, nestas, determinada ausência de atividade catalítica de PLA₂ e, por isso, estas variantes são chamadas de PLA₂-like ou PLA₂ homólogas (Lomonte et al., 2009). As alterações mais comuns no resíduo 49 são substituições de Asp por Lys, entretanto outros aminoácidos já foram relatados (Ser, Arg, Gln, Asn) e várias características estruturais e funcionais já foram descritas. Entretanto ainda há alguns detalhes fundamentais de seu modo de

ação que não são completamente conhecidos (Lomonte et al., 2009), embora novos trabalhos tem ajudado a desvendar tais mecanismos (dos Santos et al., 2009; Fernandes et al., 2013, 2014, 2015; Salvador et al., 2013a, 2013b, 2015).

As PLA₂s homólogas têm características estruturais das do grupo II de sPLA₂s, geralmente com 120-122 aminoácidos estabilizados por 7 pontes dissulfetos conservadas. Comumente são encontradas em forma de homodímeros em solução, são estabilizados por forças não covalentes e tendem a se dissociar apenas em meios ácidos (pH) (Angulo et al., 2005). A maioria das PLA₂s homólogas apresentam pontos isoelétricos básicos, são ricas em resíduos de Arg e Lys, e essa característica apresenta papel fundamental no reconhecimento de seu alvo (Murakami et al., 2007).

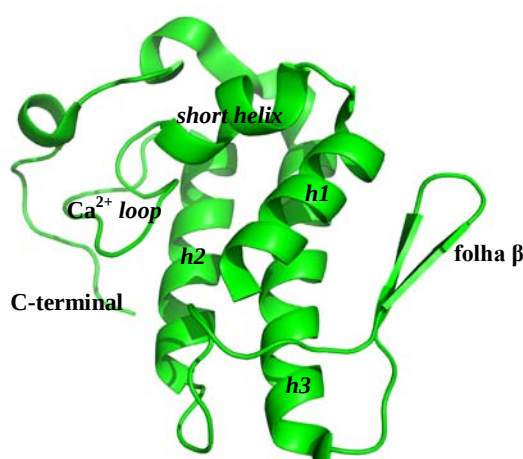


Figura 5. Representação esquemática do enovelamento de uma PLA₂s do grupo II, gerada a partir do monômero da BthZ-I (Murakami et al., 2005).

Letalidade das presas é uma das características que pode ser praticamente descartada desse grupo de proteínas, uma vez que apresenta potência menor que as PLA₂s ativas cataliticamente. O principal efeito *in vivo* das PLA₂s homólogas é a miotoxicidade, que é exercida rapidamente e apenas no local e tecidos adjacentes à inoculação, em contraste com as ações sistêmicas de outros tipos de toxinas (Lomonte et al., 2009). Foi sugerido que as miotoxinas PLA₂s homólogas não se ligam apenas à fibras musculares mas também a outros tipos celulares ou à matriz celular e com isso atinge uma área adjacente abrangente do tecido muscular (Gutiérrez et al., 2008). Também já foi relatado que devido à grande quantidade de veneno inoculado por algumas serpentes durante a picada, as PLA₂s homólogas apresentem ação miotóxica nos tecidos adjacentes à inoculação (Lomonte et al., 2009). Acredita-se que o sítio

inicial de interação dessas proteínas é o sarcolema, que leva à perda de permeabilidade gerando influxo de cálcio e liberação de íons potássio e ATP, entre outros marcadores (Cintra-Francischinelli et al., 2010).

As PLA₂s homólogas mais estudadas são as Lys49-PLA₂s, que apresentam as mutações Asp49→Lys e Tyr28→Asn que inibem a coordenação de cálcio (Arni & Ward, 1996; Fernandes et al., 2010; Lomonte & Rangel, 2012; Fernandes et al., 2015). Entretanto, vários anos foram necessários para se provar que elas não possuem atividade catalítica, sendo comprovada apenas com a produção de Lys49 (Ward et al, 2002) e Ser49 (Petan et al., 2007) PLA₂s recombinantes, que não continham frações de PLA₂s catalíticas, que possivelmente deixavam traços de atividade catalítica em estudos anteriores (Fernández et al., 2013).

Neste trabalho foram abordadas 4 diferentes proteínas, PLA₂ e PLA₂s homólogas, de serpentes das espécies *Bothrops* e *Crotalus*.

2.2.1. Moojenitoxina I (MjTX-I)

A serpente *Bothrops moojeni* é encontrada nas regiões central e do sudeste do Brasil e em algumas regiões da Argentina, Paraguai e Bolívia, habitando principalmente os ecossistemas de Cerrado e Florestas de Araucárias (Borges & Araujo, 1998). Seu estudo tem importância clínica e científica, pois é relatado um alto número de acidentes ofídicos com essa serpente, uma vez que ela apresenta comportamento agressivo, tem um maior tamanho comparada a outras serpentes do mesmo gênero e apresenta boa resposta adaptativa à mudanças ambientais (Melgarejo, 2003).

A MjTX-I, uma Lys49-PLA₂s constituinte do veneno da *B. moojeni*, apresenta preservadas as estruturas secundárias clássicas desse grupo de proteínas: -hélice N-terminal, uma hélice curta (“*short*” *helix*), um *loop* de coordenação de Ca²⁺ não funcional, duas α -hélices antiparalelas, duas folhas β curtas anti paralelas e um *loop* C-terminal (Salvador et al., 2013a) (Fig. 6).



Figura 6. Representação esquemática do enovelamento da MjTX-I gerada a partir de seu monômero A (PDB 3T0R) (Salvador et al., 2013).

Entretanto, tem algumas particularidades estruturais quando comparada à outras Lys49-PLA₂s, pois tem uma mutação Tyr→Val na posição 119 que é essencial para a estabilização do dímero alternativo e para a atividade miotóxica (Salvador et al., 2013b). A Tyr119 de ambos monômeros faz ligações de hidrogênio quando um ligante está presente no canal hidrofóbico ou com a região da His48, induzindo o arranjo estrutural correto do sítio miotóxico pela organização do C-terminal (dos Santos et al., 2009; Marchi-Salvador et al., 2009). Além disso, a MjTX-I apresenta maiores diferenças na região C-terminal quando comparada à outras Lys49-PLA₂s além da mutação no resíduo Tyr119→Val, como Tyr117→Arg, Lys127→Asp e Asp130→Arg. E, como esses resíduos mutados apresentam características físico-químicas diferentes dos presentes em outras Lys49-PLA₂s, isto pode ser um dos fatores responsáveis pela atividade miotóxica mais baixa da MjTX-I, quando comparada à outras Lys49-PLA₂s (Salvador et al., 2013a). Quando comparada à MjTX-II e à BthTX-I apresenta 85% e 95% de identidade, respectivamente.

Outra diferença da MjTX-I em relação a outras Lys49-PLA₂s refere-se ao seu estado oligomérico. A estrutura cristalográfica obtida por Salvador e colaboradores (2013a) apresenta uma conformação oligomérica tetramérica, enquanto a maioria das Lys49-PLA₂ apresenta-se como dímero (Fernandes et al., 2010; dos Santos et al., 2009) ou eventualmente monomérica (Ambrosio et al., 2005). Na interface do dímero A/B o contato é feito por 7 ligações de hidrogênio e 4 pontes salinas enquanto na interface do dímero C/D estão presentes 4 ligações de hidrogênio e 3 pontes salinas. Apesar de haver diferentes números de ligação, as que são comuns entre as interfaces A/B e C/D ocorrem entre os mesmos resíduos. Também foi observado que a presença de uma molécula de PEG 4000 na interface A/B forma interações hidrofóbicas entre o ligante e os monômeros, deixando-o mais compacto. Além disso, a ausência do PEG 4000 na

interface C/D aparentemente permite um pequeno deslocamento do monômero D e um deslocamento da folha β , quando comparado aos outros monômeros. Ademais, os monômeros formam dois dímeros convencionais, conforme a estrutura dimérica convencional proposta (Arni & Ward, 1996), sendo que esses dois dímeros (A/B e C/D) estão ligados por um grande número de contatos de van der Waals que contribuem para a estabilização oligomérica (Salvador et al., 2013a) (Fig. 7).



Figura 7. Representação em forma de cartoon da MjTX-I em sua conformação tetramérica (PDB 3T0R) (Salvador et al., 2013).

Entretanto, no mesmo estudo (Salvador et al., 2013a) foi observado que o estado oligomérico era ditado pela força iônica da solução tampão utilizada, uma vez que quanto maior a concentração do tampão utilizado (Tris HCl) mais complexo era o estado oligomérico observado e que eram esperados estados oligoméricos mais complexos em condições próxima da fisiológica. Já em estudos mais recentes (Salvador et al., em elaboração) foi verificado que quando utilizado um tampão com menor força iônica (bicarbonato de amônio, por exemplo) resultados obtidos por espalhamento dinâmico de luz sugerem que o estado oligomérico predominante era o monomérico.

Em relação à atividade miotóxica desta proteína, mais baixa que a apresentada por outras Lys49-PLA₂s, pode ser decorrente de: i) alterações estruturais e mutações nos resíduos da região C-terminal; ii) formação oligômeros, como tetrâmeros, em condições próximas à fisiológica; iii) formação do dímero convencional (Salvador et al., 2013a).

2.2.2. Moojenitoxina II (MjTX-II)

A MjTX-II é uma Lys49-PLA₂ básica de 122 aminoácidos e massa molecular de 13.5 kDa (Lomonte et al., 1990; Watanabe et al., 2005), purificada do veneno da *B. moojeni*. Ela apresenta atividade miotóxica caracterizada pelo aumento dos níveis séricos de creatina quinase e alterações morfológicas em tecido muscular de camundongos quando estudada *in vivo* e *in vitro* (Stabeli et al., 2006; Cavalcante et al., 2007; Salvador et al., 2013b). Sua estrutura é estabilizada por 7 pontes dissulfeto e preserva estruturas clássicas desse grupo de proteínas como α -hélice N-terminal, *short helix*, *loop* não funcional de ligação de Ca²⁺, 2 α -hélices antiparalelas, 2 cadeias curtas de folhas β e um *loop* C-terminal (Salvador et al., 2013b) (Fig. 8).



Figura 8. Estrutura cristalográfica da MjTX-II representada na forma de *cartoon*. Figura confeccionada no software PyMol (DeLano, 2002).

O estado oligomérico visto por espalhamento dinâmico de luz (DLS) indica um raio hidrodinâmico de 2.3 nm, correspondendo a uma massa molecular calculada de 23kDa, indicando que esta proteína se apresenta em forma dimérica em solução (Salvador et al., 2013b). O mesmo estado oligomérico é verificado para outras Lys49-PLA₂s por outras metodologias como espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) (Murakami et al., 2007), DLS (Fernandes et al., 2010) e por cristalografia (dos Santos et al., 2009; Magro et al., 2003). Entretanto, já foi demonstrado que em meio ácido o dímero de Lys49-PLA₂s tendem a se dissociar (de Oliveria, 2001).

A MjTX-II apresenta 122 resíduos, 1 a mais que várias outras Lys49-PLA₂s botrópicas conhecidas. Essa diferença se originou pela inserção de uma Asparagina (Asn) na posição 120 e uma mutação na posição 121 (His→ Tyr), que gera particularidades na região C-terminal da proteína. Com isso não há a formação de ligação de hidrogênio entre as Tyr119 de ambos

monômeros, que é provavelmente compensada pela criação de duas outras ligações de hidrogênio com a participação do resíduo Tyr121 (Salvador et al., 2013b). Com base nisso, Salvador e colaboradores (2013b) sugerem que a MjTX-II requira inibidores específicos ou modificados quando comparados com outras moléculas capazes de inibir outras Lys49-PLA₂s pela interação com seu canal hidrofóbico.

Em relação à potência de bloqueio neuromuscular, foi verificado que a MjTX-II apresenta potência 5 vezes maior quando comparada à MjTX-I (Salvador et al., 2013a), entretanto quando comparada à outras Lys49-PLA₂s como a BthTX-I (Cavalcante et al., 2007), apresenta potência de bloqueio similar.

2.2.3. Bothropstoxina I (BthTX-I)

A BthTX- I é uma proteína miotóxica isolada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu*, isolada primeiramente por Homsí-Brandeburgo e colaboradores (1988). Assim como as demais Lys49-PLA₂s não apresentam atividade catalítica, tem 121 resíduos, massa calculada de aproximadamente 14 kDa (Cintra et al., 1993) e as mesmas características estruturais já descritas para a MjTX-II, dado que apresentam alta similaridade de sequência, com identidade de 95% (Salvador et al., 2013b).

Estudos por espalhamento dinâmico de luz mostraram que a proteína apresenta-se como monômero quando diluída em meio ácido e dimérica quando em condição de pH básico e que à 18°C mostrou a menor polidispersidade entre as temperaturas varridas (10, 18, 25°C) (Cardoso et al., em elaboração).

Em relação à atividade miotóxica mostrou-se dose e tempo dependente, tendo realizado bloqueio irreversível das contrações musculares evocadas indiretamente nas preparações frênico-diafragmáticas de camundongos (Cardoso et al., em elaboração).

2.2.4. Crotoxina

O primeiro componente de veneno animal purificado e cristalizado foi a crotoxina (Slotta, 1938), que é o componente mais abundante do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* (Faure & Bon, 1988). A crotoxina é um complexo heterodimérico β -neurotóxico composto por uma componente básica, uma fosfolipase A₂ pouco tóxica, chamada de crotoxina B (componente B, CB), e uma componente ácida, não tóxica e não enzimática chamada de crotapotina ou crotoxina A (componente A, CA) (Sampaio et al., 2010).

Apesar de ser a primeira toxina animal purificada e cristalizada, poucos grupos tiveram sucesso na análise e refinamento dos dados cristalográficos (Achari et al., 1985; Santos et al.,

2007; Marchi-Salvador et al., 2008; Faure et al., 2011) provavelmente devido ao alto número de isoformas. Marchi-Salvador e colaboradores (2008) obtiveram cristais utilizando-se um pool de isoformas de CB, tendo obtido tetrâmeros compostos por dímeros, cada um formado pelas isoformas CB_c e CB_{a2} (Fig. 9). Posteriormente, Faure e colaboradores (2011) reassociaram todos os 16 possíveis complexos CA-CB e tiveram sucesso na cristalização e processamento dos dados cristalográficos de apenas 1 estrutura, formada pelas isoformas CA_{a2} e CB_b, que forneceu a primeira estrutura em alta resolução de CA (Fig. 9). Ela é formada por 3 cadeias polipeptídicas (α , β e γ) ligadas por pontes dissulfeto que são formadas pós -translação de um precursor de uma PLA₂ homóloga, conhecido como pro-CA (Bouchier et al., 1991; Faure et al., 1991). Foi verificado também que apesar da conservação da sequência primária do *loop* de ligação de Ca²⁺ e a presença de resíduos críticos (Tyr28, Gly30, Gly32 e Asp49), a estrutura cristalográfica revelou que o *loop* não estava presente na CA (Faure et al., 2011). A estrutura da crotoxina B apresenta as características estruturais das PLA₂ do grupo IIA: sítio catalítico (resíduos His48, Asp99, Tyr52, Tyr73), *loop* de ligação de Ca²⁺, interface com superfície de ligação e 7 ligações dissulfeto conservadas (Saul et al., 2010; Marchi-Salvador et al., 2008).

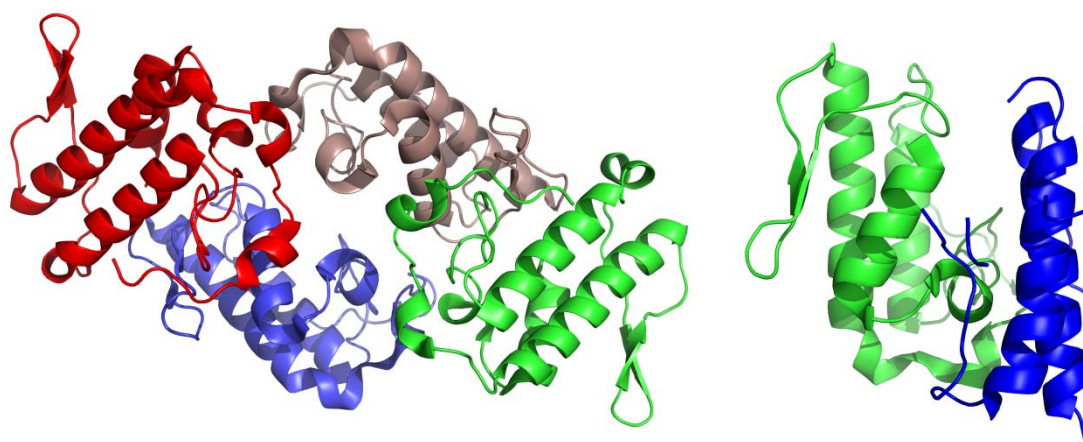


Figura 9. Estruturas cristalográficas em forma de cartoon da crotoxina B (PDB 2QOG)(Marchi-Salvador et al., 2008) e da crotoxina (PDB 3R0L)(Faure et al., 2011). (A) Representação dos monômeros A (vermelho), B (salmão), C (Azul) e D (verde) da crotoxina B (Marchi-Salvador et al., 2008). (B) Representação das subunidades ácida (CA) (azul) e básica (CB) (verde) da crotoxina (Faure et al., 2011).

A caracterização bioquímica desta toxina revelou diversas isoformas isoladas de amostras individuais e de várias amostras de diferentes exemplares de *C. d. terrificus*, mostrando uma alta diversidade das subunidades da crotoxina (Faure & Bom, 1987, 1988; Faure et al., 1994). Quatro isoformas de cada subunidade foram purificadas (CA₁, CA₂, CA₃, CA₄ e CB_{a2}, CB_b, CB_c e CB_d), sendo que as 4 isoformas de CA e as CB_{a2} e CB_c, de CB, foram completamente sequenciadas (Faure & Bom, 1991; Faure et al., 1991, 1993, 1994). As isoformas de CB apresentaram pequenas alterações nas propriedades enzimáticas e farmacológicas da CTX enquanto quando

complexadas à CA, as isoformas CB_b, CB_c e CB_d são mais tóxicas, tem menor atividade enzimática e dissocia da CA mais rapidamente que a isoforma CB_{a2} (Faure et al., 1993). Essas diferenças específicas funcionalmente podem estar relacionadas com pequenas alterações nos resíduos superficiais expostos e na interface entre as subunidades (Saul et al., 2010; Faure et al., 2011).

Apesar do mecanismo molecular de neurotoxicidade pré-sináptica da crotoxina não ser complementamente conhecido, foi verificado na estrutura cristalográfica (Faure et al., 2011) os sítios da ligação hidrofóbica CA-CB. Foi visto também que a CA bloqueia a interface hidrofóbica da superfície de interação da CB, e com isso mascara os resíduos importantes para a interação da CB com fosfolipídeos, diminuindo sua adsorção à membrana fosfolipídica (Krizaj et al., 1996, 1997; Faure et al., 2003), levando à crotoxina a interagir com receptores específicos como o CAPT (R48) na junção neuromuscular (Faure et al., 2012). Levando-se em consideração esse mecanismo, pode-se dizer que o mecanismo bioquímico da crotoxina é um exemplo de potenciação molecular (Marchi-Salvador et al., 2008). Considerando a ligação da crotoxina ao receptor específico, uma vez que é formado um complexo transiente (CA-CB-R48), seguido-se da liberação da CA, pode-se sugerir que a região completamente exposta próxima do Trp80 da CB_b do complexo da crotoxina, localizado no lado oposto da interface CA-CB pode também ser um importante resíduo de ligação da crotoxina ao seu receptor específico (Faure et al., 2011).

Além das atividades biológicas clássicas atribuídas à crotoxina como neurotoxicidade (Bon et al., 1979; Vital Brazil et al., 2000), mio (Conte et al., 2008; Gutiérrez et al., 2008), nefro (Amora et al., 2006), e cardiotoxicidades (Hernández et al., 2007), possivelmente devido às suas inúmeras isoformas, numerosos estudos tem mostrado também que esta toxina apresenta atividade imunomodulatória (Rangel-Santos et al., 2004; Castro et al., 2007), antiinflamatória (Sampaio et al., 2005), antitumoral (Yan et al., 2006) e analgésica (Zhu et al., 2008; Gutierrez et al., 2008).

2.3. Mecanismos de ação das PLA₂s e PLA₂s homólogas e busca por inibidores

Fosfolipases A₂ são enzimas que catalizam a hidrólise dos glicerolfosfolipídeos de forma dependente de cálcio, e representam o componente mais abundante nos venenos das serpentes da família Viperidae (Gutierrez & Ownby, 2003).

O mecanismo de ação catalítica das PLA₂s foi inicialmente proposto por Verheij e colaboradores (1980) baseado na comparação estrutural com serinoproteases. Nesse modelo, o mecanismo envolve a ação da PLA₂ mediada por uma base que utiliza uma molécula de água como um nucleófilo, que gera hidrólise de fosfolipídios em diferentes fases, como monomérico,

micelar ou de fases de bicamadas lipídicas, sendo que ocorre um aumento considerável na atividade catalítica quando ocorre formação de micelas por agregados de fosfolipídios monoméricos (Verheij et al., 1981; Kini, 2003). Posteriormente, foi verificado por Scott e colaboradores (1990) que as fosfolipases secretadas não eram enzimas acyl clássicas intermediárias, como ocorre no mecanismo proposto primeiramente com base na ação das serinoproteases. Nesse modelo, conhecido como *single-water mechanism*, as PLA₂s se utilizam do seu sítio catalítico His48, juntamente com o Asp49, para polarizar uma água estrutural que então ataca os grupos carbonil, sendo que o íon Ca²⁺, ligado no *loop* de coordenação de cálcio, estabiliza o complexo transitório tetramérico formado. Após a desestabilização desse complexo, ocorre a liberação dos produtos da hidrólise e três moléculas de água se dirigem para a região do sítio ativo.

Posteriormente, um novo modelo proposto, conhecido como *assisted-water mechanism* sugeriu que 2 moléculas de água estariam envolvidas na formação e hidrólise do complexo transitório tetramérico (Rogers et al., 1996; Edwards et al., 2002). Neste modelo, a molécula de água que gera o ataque nucleofílico é coordenada pelo Ca²⁺. E esta molécula de água estabiliza outra molécula de H₂O, que faz ligações de hidrogênio com a His48 e Asp99. Tal mecanismo é suportado cristalograficamente por um mutante His48Gln de uma PLA₂ humana do grupo IIA, que apresenta atividade catalítica significativa (Edwards et al., 2002).

Em ambos os mecanismos propostos, o íon Ca²⁺, coordenado pelo oxigênio do Asp49, serve como um eletrófilo durante a catálise (Scott, 1997; Edwards et al., 2002). De forma geral, a catálise por enzimas PLA₂s secretadas podem ser resumidas da seguinte forma: i) ligação do íon Ca²⁺ ao substrato; ii) catálise mediada por uma base; iii) formação e quebra do complexo tetramérico transitório; iv) liberação do produto de reação (Murakami et al., 2006). O *loop* de coordenação de cálcio forma uma das barreiras do canal hidrofóbico e, por isso, é importante na interação enzima-substrato (Banumathi et al., 2001). Na ausência de Ca²⁺, o *loop* fica mais flexível e durante a catálise, o Ca²⁺ direciona o posicionamento estereoespecífico do substrato no sítio ativo e o Ca²⁺ eletrofílico polariza a ligação éster e estabiliza o estado de transição (Scott, 1997). O íon Ca²⁺ ligado, também suporta as interações das enzimas sPLA₂ com agregados micelares, vesículas, monocamadas e membranas, uma vez que as forças eletrostáticas tem um papel fundamental na ligação com esses substratos (Scott et al., 1994).

Foi verificado também que quando a Asp49 é substituída por outros resíduos como a Lys, por exemplo, a proteína não é capaz de coordenar Ca²⁺, levando à perda da atividade catalítica (Doley et al., 2010), e por isso, um diferente mecanismo de ação das PLA₂s homólogas se faz necessário. Diversas estruturas e estudos foram realizados até a identificação de 13 aminoácidos

próximos ao C-terminal que eram capazes de causar morte celular (Lomonte et al., 1994). Estudos posteriores com mutações sítio dirigidas com a proteína BthTX-I de *Bothrops jararacussu* indicaram 5 resíduos que apresentam papel estrutural fundamental nos mecanismos de ação miotóxica (Ward et al., 2002; Chioato et al., 2002).

Além da substituição do resíduo 49, atribuída à incapacidade para coordenação do cálcio, outras características estruturais parecem estar relacionadas à ausência da atividade catalítica como, por exemplo, o resíduo Lys122 que é conservado em todas Lys49-PLA₂s mas incomum às PLA₂s catalíticas. Diversos estudos (Fernandes et al., 2010; Delatorre et al., 2011; Salvador et al., 2013b) relataram a alta mobilidade deste resíduo e sugeriram que este pode apresentar diversas funções relacionadas à atividade miotóxica como, por exemplo, auxiliar na ancoragem de ácidos graxos no canal hidrofóbico com eventual hiperpolarização da Cys29. Outro aminoácido, a Tyr28, parece ter grande influência na coordenação do cálcio, uma vez que quando substituída por uma asparagina, presente em todas as Lys49-PLA₂s, deixa o *loop* de coordenação de cálcio mais aberto, pois causa um aumento da distância entre os carbonos (C_α) dos resíduos 28 e 33, fazendo com que a região fique pouco mais instável (Fernandes et al., 2014). Por isso, a inatividade catalítica das Lys49-PLA₂s pode ser explicada por estas duas substituições, Y28N e D49K (Fernandes et al., 2010).

Outro fator que parece ter ligação com a atividade miotóxica é o estado oligomérico, sendo que as Lys49-PLA₂s apresentam-se como dímero, a menos que em meio ácido, onde há a tendência a monomerização. Foi observado também pela análise da cela unitária de estruturas cristalográficas de diferentes Lys49-PLA₂s duas possíveis configurações: (i) estabilizada por interações entre as pontas das folhas β e resíduos das hélices do N-terminal (Arni et al., 1995), dímero chamado de "dímero convencional", e; (ii) estabilizada por contatos entre os *loops* de ligação de cálcio e C-terminal formando uma via de ligação entre o sítio ativo de ambos monômeros (Murakami et al., 2007), estrutura chamada de "dímero alternativo" (dos Santos et al., 2009). O dímero alternativo apresenta-se mais compacto que o convencional, com um maior número de contatos, sendo o mais provável que ocorra em solução. Esta conformação também foi corroborada por análises por espalhamento de raios-X a baixo ângulo (Murakami et al., 2007). Assim, baseando-se na estrutura cristalográfica do dímero alternativo, na qual os C-terminais estão na interface dimérica, foi proposto que o sítio miotóxico destas toxinas é composto pelos resíduos Lys20, Lys115 e Arg118 (dos Santos et al., 2009) (Fig. 10).

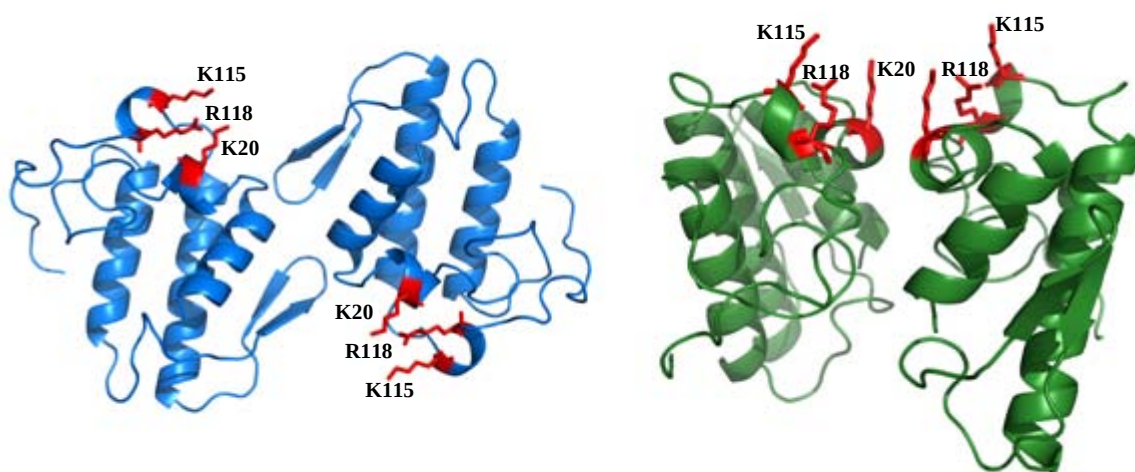


Figura 10. Dímeros convencional (Esquerda, em azul) e alternativo (Direita, em verde) com resíduos do sítio miotóxico proposto por dos Santos e colaboradores (2009) destacados em vermelho.

Posteriormente, novos estudos sugeriram que estes resíduos seriam os responsáveis por ancorar a toxina nos grupos fosfatidil das camadas aniônicas lipídicas das membranas. E com base nos resíduos altamente conservados do C-terminal (Lys115 e Arg118) e eventualmente auxiliado por outros resíduos catiônicos expostos (Lys20, Lys80, Lys122, Lys127) foi proposto o sítio catiônico de docagem na membrana (*cationic membrane-docking site* - MDoS) (Fernandes et al., 2013). Também foi observado, quando considerado o dímero alternativo, que os resíduos hidrofóbicos Leu121 e Phe125, altamente conservados (98%) nas Lys49-PLA₂s botrópicas, estão mais expostos ao solvente e tem uma redução da sua área superficial não acessível ao solvente. E que, após ligação de uma molécula no canal hidrofóbico, estes resíduos ficam alinhados em ambos monômeros (Fernandes et al., 2013), aumentando assim o potencial miotóxico das proteínas (dos Santos et al., 2009). Com base nisso, e na alta hidrofobicidade e índices de permeabilidade (Kyte & Doolittle, 1982; Wimley & White, 1996; Naoi et al., 1977) destes resíduos, Fernandes e colaboradores (2013) sugeriram que o sítio hidrofóbico esteja relacionado com a ruptura de membrana, nomeando-o então como sítio de ruptura de membrana (*membrane-disruption site* - MDiS) (Fernandes et al., 2014).

Com isso, o mais novo mecanismo de ação das Lys49-PLA₂s botrópicas proposto (Fig. 11) envolve uma transição alostérica e participação de dois sítios independentes de interação com a membrana através dos seguintes passos (Fernandes et al., 2014): i) ligação de molécula hidrofóbica no canal hidrofóbico; ii) ativação alostérica do dímero alternativo com exposição dos resíduos do MDoS e MDiS ao solvente; iii) ancoragem da proteína à membrana pelo MDoS; iv) penetração da proteína (MDiS) e desorganização da membrana; v) morte celular.

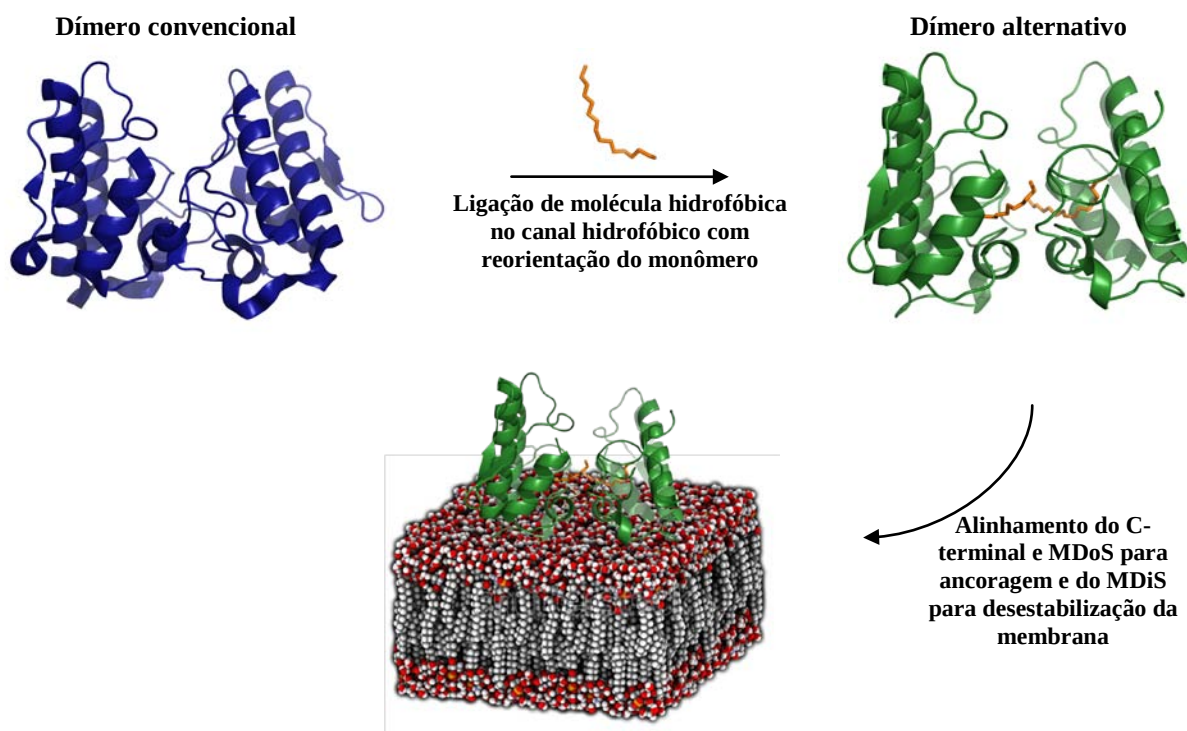


Figura 11. Mecanismo miotóxico de ação de Lys49-PLA2s botrópicas. Uma Lys49-PLA2s nativa é ativada pela entrada de uma molécula hidrofóbica no canal hidrofóbico, causando uma alteração alostérica (reorientação do monômero) que causa alinhamento do C-terminal e do MDoS (Lys20, Lys115 e Arg118) que possibilita o ancoramento à membrana e exposição do MDiS (Leu121, Phe125) ao solvente e em posição simétrica para ambos monômeros, que desestabiliza a membrana. Figuras confeccionadas no software PyMol (DeLano, 2002), com exceção da membrana modelo de 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina (POPC), adaptada de www.shutterstock.com.

Os ácidos graxos que se ligam ao canal hidrofóbico supostamente são provenientes da hidrólise de fosfolipídios por PLA₂s catalíticas, o que evidencia a ação sinérgica de ambas classes de proteínas (Cintra-Francischinelli et al., 2009). E a penetração das Lys49-PLA₂s na membrana acabam por desestabilizar esta, causando perda de permeabilidade e influxo de íons e posteriormente morte celular (Gutiérrez et al., 2003; Montecucco et al., 2008).

A elucidação dos mecanismos de ação é de vital importância, pois evidencia novas rotas para desenvolvimento de possíveis inibidores que complementem a terapia convencional e que possam inibir os efeitos locais causados por estas toxinas. Por isso, entendemos que a busca por novos ligantes deve ser focada nas regiões que desempenham um papel estrutural e funcional vitais para a ação da toxina. Por isso, são buscados inibidores que possam se ligar nos sítios ativos da proteína, bloqueando o MDoS para evitar a ancoragem da proteína à membrana ou ao MDiS para bloquear a permeabilidade da membrana celular. Também pode ser procurado outro tipo de ligante que bloqueie o canal hidrofóbico, bloqueando a entrada de uma molécula hidrofóbica e consequentemente evitando que ocorra a alteração conformacional do dímero

convencional para o alternativo, uma vez que na primeira conformação ela apresente atividade miotóxica reduzida (dos Santos et al., 2009).

2.4. Objetivos

Caracterizar termodinamicamente as interações entre PLA₂ homólogas com diferentes moléculas candidatas a inibidores da ação miotóxica e entre os componentes da crotoxina, a crotapotina e a crotoxina B.

2.4.1. Objetivos específicos

Determinar os parâmetros termodinâmicos e cinéticos da interação entre:

- BthTX-I, Lys49-PLA₂ obtida do veneno da serpente *Bothrops jararacussu*, e ácido chicórico e íons zinco;
- Suramina e as Lys49-PLA₂s MjTX-I e MjTX-II, obtidas do veneno da serpente *Bothrops moojeni*;
- A crotapotina, ou crotoxina A (CA), e a Asp49-PLA₂ crotoxina B, subunidades da crotoxina, purificadas do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*.

Relacionar o modo da interação entre os candidatos a inibidor com os mecanismos de bloqueio da ação miotóxica propostos para as PLA₂s homólogas.

2.5. Metodologia

2.5.1. Isolamento das toxinas e ligantes utilizados

2.5.1.1. Bothropstoxina-I (BthTX-I)

A BthTX-I foi isolada a partir do veneno bruto, obtido comercialmente, da serpente *Bothrops jararacussu*. Uma alíquota de 10 mg de veneno bruto foi diluído em 500 µL de tampão bicarbonato de amônio (50 mM, pH 7,9) e centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O protocolo de fracionamento do veneno bruto e obtenção da fração de BthTX-I foi adaptado do protocolo originalmente proposto (Cintra et al., 1993; Homsí-Brandeburgo et al., 1988) e realizado através de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) de exclusão molecular em um sistema Äkta Purifier (GE Healthcare) com uma coluna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) utilizando-se tampão bicarbonato de amônio (50 mM, pH 7,9) como fase móvel. Posteriormente foi realizada uma nova etapa de purificação por troca iônica no mesmo sistema HPLC utilizando-se uma coluna HiTrap SP FF (GE Healthcare) com um gradiente de bicarbonato de amônio (50-1000 mM, pH 7,9).

A pureza da amostra foi aferida por cromatografia de fase reversa com a coluna µRPC C2/C18 SC 2.1/10 (GE Healthcare) utilizando-se gradiente de acetonitrila (0-66,7% em ácido trifluoracético (TFA) 0,1%) no mesmo sistema HPLC.

As amostras foram concentradas até a concentração desejada utilizando-se filtros concentradores Vivaspín (GE Healthcare).

O ligante, candidato a inibidor de atividade miotóxica, titulado à BthTX-I foi o ácido chicórico (C7243, Sigma Aldrich, St. Louis, EUA), que, segundo o fabricante, tem pureza superior a 95%, e por isso foi utilizado sem qualquer tipo de purificação prévia aos experimentos calorimétricos. Também foram realizadas titulações com cloreto de zinco (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) na proteína. Ambas as soluções não tiveram nenhum tratamento prévio, com exceção do ajuste de pH entre as soluções da titulação entre a BthTX-I e cloreto de zinco.

2.5.1.2. Crotoxina A (CA) e Crotoxina B (CB)

As frações de Crotoxina A e Crotoxina B foram obtidas pela purificação do veneno bruto, obtido comercialmente, da serpente *Crotalus durissus terrificus* por HPLC de exclusão molecular seguida por uma etapa de fase reversa utilizando-se um cromatógrafo ÄKTA Purifier (GE Healthcare), conforme previamente descrito (Oliveira et al., 2002; Hernandez-Oliveira et al., 2005).

O veneno bruto (15 mg) foi diluído em 500 µL de tampão bicarbonato de amônio (50 mM, pH 8,0) e então centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi aplicado em uma coluna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) equilibrada com bicarbonato de amônio (1 M, pH 8,0). As frações de CTX obtidas na etapa de HPLC de exclusão molecular foram liofilizadas e armazenadas a -20 °C. Para separar as subunidades CA e CB foi realizada uma etapa de HPLC de fase reversa, sendo nesta, alíquotas de 2 mg de CTX dissolvidas em ácido trifluoracético (TFA)(tampão A) e aplicado em uma coluna C18 (Sephasil Peptide 4.65m/250, Pharmacia Biotech) pré-equilibrada com tampão A. As proteínas foram eluídas com gradiente linear (0-100% B) de 0,1% TFA em 66,6% de acetonitrila (tampão B). As frações de CA e CB foram liofilizadas e armazenadas a -20 °C até seu uso.

2.5.1.3. Moojenitoxina I e Moojenitoxina II (MjTX-I e MjTX-II)

As proteínas MjTX-I e MjTX-II foram isoladas do veneno bruto, obtido comercialmente, da serpente *Bothrops moojeni*. Alíquotas do veneno foram diluídas em tampão bicarbonato de amônio (50 mM, pH 8,0) e centrifugadas a 10000 rpm a 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi submetido à HPLC de troca iônica utilizando-se um gradiente de 0,05 – 0,5 M de bicarbonato de amônio, pH 8,0 em uma coluna CM-FF (GE Healthcare) previamente equilibrada com bicarbonato de amônio (50 mM, pH 8,0). O protocolo utilizado foi otimizado por Soares e colaboradores (1998) baseando-se no protocolo originalmente proposto (Lomonte et al., 1990).

O pico correspondente às frações de MjTX-I e de MjTX-II tiveram suas purezas aferidas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 13 % em condições desnaturante (Tris HCl pH 6,8, Sodium Dodecyl Sulfate (SDS); β-mercaptoetanol; azul de bromofenol).

As amostras foram concentradas utilizando-se filtros Vivaspin (GE Healthcare).

O ligante utilizado foi o sal sódico de suramina (suramin sodium salt, S2671, SigmaAldrich) que foi utilizado sem qualquer purificação prévia.

2.5.2. Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

Todos os experimentos de calorimetria de titulação isotérmica foram realizados em um microcalorímetro iTC₂₀₀ (GE Healthcare). Os calores de agitação e diluição de todas as reações foram determinados em experimentos controle e foram subtraídos das titulações anteriormente à determinação dos parâmetros termodinâmicos. Em cada um dos complexos de interação estudados, algumas características próprias do sistema como concentração, pH, tampão e temperatura foram alteradas a fim de otimizar as condições experimentais para que fornecessem os resultados com os menores erros associados e estão descritas abaixo. Os termogramas e

isotermas de ligação apresentados são representativos de cada titulação, uma vez que após a otimização, os experimentos foram realizados, no mínimo, em duplicata.

A análise dos dados foi realizada com as seguintes etapas: (i) ajuste de linha de base no termograma e cálculo das áreas dos picos e subtração dos calores de diluição da espécie titulada, que foi realizada no software Origin, fornecido pelo fabricante, ou no software Nitpic (Keller et al., 2012; Scheuermann & Brautigam, 2015), de acordo com a característica da curva observada; (ii) análise do melhor modelo de ligação a ser utilizado baseando-se nos termogramas obtidos e nos dados de metodologias ortogonais utilizadas (cristalografia, espalhamento dinâmico de luz, espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)); (iii) aplicação do modelo dos polinômios de ligação para determinação das constantes termodinâmicas do sistema. Foram utilizados polinômios de ligação (Freire et al., 2009) adaptados de Vega e colaboradores (2015) com o intuito de determinar as constantes de dissociação gerais (β) e específicas (k_d), de acordo com o tipo de interação, as variações de entalpia geral de cada evento (ΔH) e específica de ligação a cada sítio de interação (Δh), variação de entropia (ΔS) e se havia cooperatividade entre os sítios ou eventos de ligação. Os polinômios foram implementados em ambiente MatLab (R2015a, Mathworks) e os termogramas e isotermas foram confeccionados no *add-on* do software Origin (v. 7.0, OriginLab) fornecido pela fabricante do equipamento (Malvern, Reino Unido).

2.5.2.1. Estudos calorimétricos da BthTX-I e ácido chicórico

A titulação foi realizada através de 20 injeções, a primeira com volume de 0,4 μ L (descartada anteriormente à análise de dados) e as 19 restantes de 2 μ L (duração de 4 s) de ácido chicórico (400 μ M) (na pipeta) à célula de reação contendo BthTX-I (50 μ M). As injeções foram feitas a cada 240 segundos, à 20 °C, sob constante agitação de 1000 rpm. Tanto a proteína quanto a espécie titulante estavam diluídas em solução aquosa com 5% de piridina e 5% de etanol. A potência de referência (*Reference Power*) entre a célula de reação e de controle foi de 9 μ cal/s. O calor de diluição do ácido chicórico foi obtido pela sua titulação, nas mesmas condições supracitadas, na célula de reação contendo apenas a solução aquosa com 5% de piridina e 5% de etanol, sem adição de BthTX-I.

2.5.2.2. Estudos calorimétricos da BthTX-I e cloreto de zinco

A titulação foi realizada através de 40 injeções, a primeira com volume de 0,4 μ L (descartada anteriormente à análise de dados) e as 39 restantes de 1 μ L (duração de 2 s) de cloreto de zinco (2000 μ M) à célula de reação contendo BthTX-I (53 μ M). As injeções foram espaçadas em 240 segundos e a titulação foi realizada a 25 °C com agitação constante de 1000

rpm. As espécies titulada e titulante estavam diluídas em tampão Tris HCl (100 mM), 100 mM NaCl, pH 7,0, entretanto o cloreto de zinco (titulante) teve de ter seu pH ajustado pela adição de hidróxido de sódio. A potência de referência aplicada entre as células de reação e controle foi de 10 μ cal/s. Foram realizados experimentos controle para verificar se havia diferença de pH entre as soluções de diluição das espécies titulada e titulante e para determinar o calor de diluição do cloreto de zinco, que foram subtraídos da titulação BthTX-I/ ZnCl_2 anteriormente à análise de dados.

2.5.2.3. Estudos calorimétricos da MjTX-I e suramina

A interação entre a MjTX-I e a suramina foi determinada pela titulação composta por 20 injeções (primeira de 0,4 μ L (excluída anteriormente à análise de dados) e as demais 19 de 2 μ L com duração da injeção de 0,8 e 4 s, respectivamente) de suramina (750 μ M) à célula de reação contendo MjTX-I (50 μ M) espaçadas entre si por 240 s. Ambas espécies, titulada e titulante, estavam diluídas em tampão bicarbonato de amônio (50 mM, pH 8,0). As titulações foram realizadas à 25°C, aplicando-se uma potência de referência entre as células de reação e controle de 5 μ cal/s, e ambas as espécies ficaram sob constante agitação de 1000 rpm.

2.5.2.4. Estudos calorimétricos da MjTX-II e suramina

As titulações foram realizadas por 20 injeções de 2 μ L com duração de 4 s (exceção da primeira injeção de 0,4 μ L, descartada anteriormente à análise de dados) de sal sódico de suramina (600 μ M) à célula de reação contendo 45 μ M de MjTX-II. As injeções foram repetidas a cada 240 s, com agitação constante de 1000 rpm. As titulações foram realizadas aplicando-se potência de referência de 5 μ cal/s entre as células de reação e controle, à 25 °C, sendo ambas as soluções diluídas em tampão bicarbonato de amônio (50 mM, pH 8,0). Os calores de diluição da suramina foram determinados em experimentos controle pela adição da mesma solução titulante à célula de reação contendo apenas o tampão utilizado.

2.5.2.5. Estudos calorimétricos da Crotoxina A (CA) e Crotoxina B (CB)

Os experimentos calorimétricos foram realizados a 25 °C, com ambas proteínas diluídas em tampão formato de amônio (50 mM, pH 6,55). As titulações foram compostas de 1 injeção de 0,4 μ L, excluída anteriormente à análise de dados, e de outras 19 injeções de 2 μ L (duração de 4 s) de CA (240 μ M) à célula de reação contendo CB (15 μ M) a cada 180 s. A potência de referência (*Reference Power*) aplicada entre as células de reação e controle foi de 10 μ cal/s. A primeira injeção de 0,4 μ L (duração de 0,8 s) foi excluída anteriormente à análise de dados. Os

calores de diluição da CA foram calculados pela titulação desta à célula de reação contendo apenas tampão, e os calores de diluição da CB foram calculados pela injeção de tampão à célula de reação contendo solução de CB. Ambas as titulações controle foram realizadas nas mesmas condições citadas anteriormente.

2.6. Resultados e Discussão

Um dos maiores desafios atualmente na área de toxinologia é a elucidação dos mecanismos de ação das proteínas constituintes dos venenos de diferentes animais peçonhentos e, com base nisso, desenvolver terapias alternativas para o tratamento de lesões decorrentes de envenenamento que não são neutralizadas pela soroterapia convencional.

Os venenos podem ser bastante diferentes, com micro ou macrovariações, mas eles também compartilham vários compostos ao longo dos níveis taxonômicos. Ao longo do processo evolutivo, os répteis venenosos tiveram várias moléculas regulatórias de diversas vias metabólicas recrutadas como constituintes de seus venenos (Fry, 2004), e como a seleção evolutiva parece ser limitada, as proteínas dos venenos pertencem a um pequeno número de famílias protéicas (Calvete et al., 2007). Entretanto, esta pequena diversidade de proteínas sofreu uma rápida evolução *in situ*, resultando na atuação em diversas atividades mesmo com uma mesma estrutura molecular conservada. Estas formas estruturais são vistas repetidamente dentro dos constituintes dos venenos, particularmente entre as toxinas *three-finger* (3FTX) (Kini, 2002; Pawlak et al., 2006, 2009), as PLA₂ (Nakashima et al., 1995; Kini, 2003; Chuman et al., 2000), serinoproteases que afetam a homeostase (Deshimaru et al., 1996; Serrano & Maroun, 2005), proteínas secretadas ricas em cisteínas (CRISPs) (Yamazaki & Morita, 2004), desintegrinas (Juárez et al., 2008) e metaloproteases (Matsui et al., 2000).

Quando se trata de acidentes ofídicos por serpentes, as PLA₂ e PLA₂ homólogas têm um papel fundamental na necrose de músculos esqueléticos, que podem resultar em perda de tecido, incapacidade e sequelas permanentes como amputações (Gutiérrez & Lomonte, 1995; Fernandes et al., 2015).

Na América Latina, uma das maiores causadoras de acidentes ofídicos são as serpentes do gênero *Bothrops* (de Oliveira, 2009; Williams et al., 2010). Nestas serpentes, grande parte do volume do veneno é composto por PLA₂ e PLA₂ homólogas, que são responsáveis pela mionecrose nas áreas adjacentes à picada e, por isso, estas proteínas apresentam elevada importância terapêutica (Murakami et al., 2007). Em nosso trabalho foram estudadas 3 diferentes PLA₂ homólogas, a BthTX-I da serpente *Bothrops jararacussu*, e a MjTX-I e MjTX-II, ambas da serpente *Bothrops moojeni*, complexadas a diferentes candidatos a inibidores.

Outra serpente que apresenta relevante importância é a *Crotalus durissus*, amplamente distribuída geograficamente no Brasil, também causando um elevado número de mortes decorrente de envenenamento (Cardoso, 2003). O veneno dessa serpente é capaz de dissociar a transmissão neuromuscular e provocar sintomas de mialgia, causando paralisia progressiva. Em pessoas acometidas por envenenamento por esta serpente, a neurotoxicidade sistêmica é

frequentemente acompanhada de rabdomiólise, causando necrose tubular aguda e falha renal, que representa a causa primária da morte (Azevedo-Marques et al., 2009; Vital-Brazil, 1966a,b). A neuro e miotoxidades devido ao envenenamento pela picada da *C. durissus* é atribuída à alta concentração de crotoxina (Warrell, 2004), uma PLA₂ heterodimérica que exibe neurotoxicidade pré-sináptica (Bon et al., 1989; Bon, 1997; Sampaio et al., 2010) que também foi alvo de nossos estudos.

Desvendar as relações estrutura-função das interações proteína-ligante é fundamental no campo das ciências moleculares (Olsson et al., 2008), e com esse intuito diversos estudos estruturais e funcionais já foram realizados com essas subclasses de proteínas buscando-se novos inibidores (Ticli et al., 2005; Marcussi et al., 2007; Lomonte et al., 2009; dos Santos et al., 2011). Entretanto, descobrir e otimizar inibidores baseando-se apenas em estudos cristalográficos e funcionais não é prático e demanda muito tempo. Por isso, metodologias ortogonais como espectroscopias de fluorescência e no visível, ressonância magnética nuclear e calorimetria são essenciais e necessárias para complementar os estudos de descoberta e otimização de fármacos (Henry, 2001). Apenas dados estruturais, mesmo quando acoplados a sofisticadas técnicas computacionais não são capazes de definir precisamente os modos das ligações moleculares ou mesmo predizer suas afinidades de ligação. Por isso, a caracterização termodinâmica da interação destas proteínas com moléculas candidatas à inibidores da atividade miotóxica é importante nos campos tanto da ciência básica quanto aplicada, incluindo biofísica molecular e de *drug design* (Klebe, 2015; Kantonen et al., 2017; Olsson et al., 2008).

A calorimetria de titulação isotérmica é o único método capaz de determinar não apenas a constante de dissociação (k_d), mas também a variação de entalpia (ΔH) em uma única medida em uma única temperatura (Wiseman et al., 1989; Velazquez-Campoy et al., 2004; Ladbury & Chowdhry, 1996; Ladbury et al., 2010). Além disso, as informações geradas por ITC como variação de entalpia de ligação e afinidade entre as espécies titulada e titulante fornecem informações sobre a física das interações não covalentes e nos ajudam em nosso objetivo de definir os modos de ação de drogas inibidoras (Kantonen et al., 2017). Também, se fosse nosso objetivo, através da calorimetria também poderiam ser determinados os efeitos e entender em um nível mais profundo as alterações na afinidade de ligação entre os compostos após substituições moleculares (Weber & Salemme, 2003; Chaires, 2008; Klebe, 2015).

Esse trabalho apresenta relevância aplicada à saúde humana, uma vez que pode auxiliar na busca de inibidores para as proteínas não neutralizadas pela soroterapia convencional, além disso, apresenta grande importância acadêmica uma vez que apresenta análises de complexas interações, enquanto a maioria dos trabalhos relatados utilizando-se calorimetria de titulação

isotérmica apresentava até pouco tempo apenas modelos de interação de apenas 1 sítio. Isso ocorria, pois estudos de ligação de pequenas moléculas à proteínas podem se tornar extremamente complexos, pois muitos sítios protéicos não são conhecidos ou processos desencadeados pela complexação das espécies titulada e titulante, como oligomerização, não são completamente entendidos (Falconer, 2016). Como será visto nas próximas seções, foram analisados casos de ligações simples com estequiometria 1:1, como no caso entre BthTX-I e ácido chicórico, e mais complexos, como no caso BthTX-I/ Zn^{2+} , além dos casos que indicam oligomerização (MjTX-I e MjTX-II com suramina) e cooperatividade nos eventos de ligação (CA/CB).

2.6.1. Análise termodinâmica da interação entre BthTX-I e ácido chicórico

Já foram relatados diversos estudos relacionando a eficácia de extratos naturais e seus compostos bioativos na inibição dos efeitos miotóxicos (Ticli et al., 2005; Aung et al., 2011a; dos Santos et al., 2011), paralisante (dos Santos et al., 2011), hemolítico (Agoro, 1978) e hemorrágico (Aung et al., 2011b) de diversas fosfolipases A_2 de diferentes venenos. Em nosso estudo, foi verificada a termodinâmica da interação entre a BthTX-I e o ácido chicórico, composto vegetal fenólico, isolado pela primeira vez a partir das folhas de *Cichorium intybus* (Scarpati & Oriente, 1958), e depois em uma ampla gama de plantas de diferentes ordens (Lee & Scagel, 2013).

O termograma da titulação do ácido chicórico em BthTX-I apresentou comportamento apenas exotérmico. O calor gerado nas últimas injeções da titulação não foram tão baixos (Fig. 12, painel superior) quanto os vistos em outros trabalhos de nosso grupo (Salvador et al., 2015; de Barros et al., 2016) devido ao uso de solventes orgânicos como piridina e etanol para a diluição da espécie titulante. Com o intuito de minimizar o calor de diluição dessas espécies, foram usadas soluções tampão com a mesma composição para diluir as espécies titulante e titulada, entretanto pequenas diferenças podem ter acontecido, pois o preparo das soluções tampão era diferente. Enquanto a BthTX-I era diluída na solução pronta (solução aquosa com 5% de piridina e 5% de etanol), o ácido chicórico era diluído em piridina (50%) e etanol (50%) e posteriormente diluído para obtenção de soluções com volume final de 5% de etanol e 5% de piridina, conforme já realizado por Grüner e colaboradores (2014) com outros ligantes pouco solúveis. Entretanto, isso tem pouca influência na análise da variação de entalpia (ΔH), pois o calor obtido pelo possível *mismatch* entre os tampões foi determinado através da titulação controle, realizada pela titulação de ácido chicórico na solução tampão usada para diluir a proteína. Os valores encontrados na titulação de diluição da solução de ácido chicórico (titulação

controle) foram constantes, ou seja, não eram concentração-dependente e seus valores foram muito próximos aos encontrados na última injeção da titulação ácido chicórico/BthTX-I. Os valores da energia obtidos na titulação controle foram descontados da titulação ácido chicórico/BthTX-I anteriormente à análise de dados.

As áreas dos picos foram determinadas automaticamente pelo *Add-on* do software Origin (v.7.0) fornecido pelo fabricante, uma vez que o termograma apresentou excelente relação sinal/ruído e não apresentou artefatos de baixa nem de alta frequência. A determinação dos parâmetros termodinâmicos foi realizada após a subtração dos calores obtidos na reação controle, dos dados obtidos na titulação do ácido chicórico com a BthTX-I em si.

Baseando-se no formato da isoterma obtida (Fig. 12, painel inferior), que apresenta valores da constante de Wiseman (Wiseman et al., 1989) próximos ao regime ótimo (Broecker et al., 2011), a análise de dados foi realizada deixando-se o valor da estequiometria flutuante, assim foram determinados os valores da estequiometria (n), variação de entalpia (ΔH) e constante de dissociação (k_d). Optou-se por deixar a estequiometria flutuante uma vez que deste modo reduz-se a sensibilidade dos parâmetros termodinâmicos calculados (k_d e ΔH) à possíveis erros de determinação da concentração da espécie titulada (Grüner et al., 2014; Tellinghuisen & Chodera, 2011). Esse mesmo procedimento pode ser realizado no *Add-on* do software Origin (v.7.0) fornecido pelo fabricante, enquanto no software Sedphat, por exemplo, ele é deixado fixo, mas para o melhor refinamento dos dados sugere-se e, o software possibilita, o cálculo do erro das concentrações das espécies titulada e titulante explicitamente (Brautigam et al., 2016; Houtman et al., 2007; Zhao et al., 2015), deixando que o usuário decida qual concentração, da espécie titulante ou titulada, ou de ambas espécies, devem ser corrigidas. No caso do Sedphat, após calcular o erro associado às concentrações, ele refaz o refinamento dos dados considerando o valor ajustado da concentração para a determinação dos parâmetros termodinâmicos.

Com base nisso, foram determinados os parâmetros termodinâmicos e cinéticos descritos na tabela 1 e com base nesses dados foi obtida a isoterma de ligação representada na figura 12.

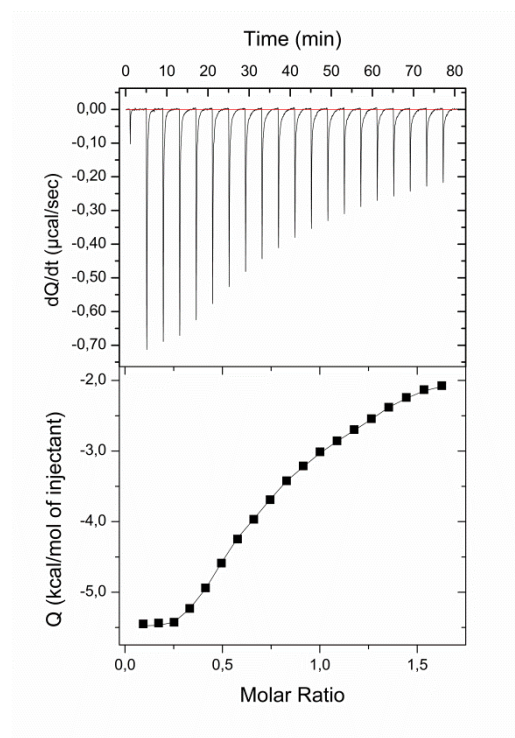


Figura 12. Calorimetria de titulação isotérmica (ITC) da interação entre ácido chicórico e BthTX-I. (Painel superior) Termograma obtido pela titulação de ácido chicórico (400 μM , pipeta) na BthTX-I (50 μM , célula de reação), diluídos em solução aquosa com 5% piridina e 5% etanol, à 20°C. A linha preta representa a potência aplicada pelo microcalorímetro iTC₂₀₀ para manter as células de reação e controle à mesma temperatura e a linha vermelha representa a linha de base determinada pelo *add-on* do software Origin v.7.0 (OriginLab) para o cálculo das áreas dos picos. (Painel Inferior) Isoterma de ligação ajustada com polinômio de ligação com 1 sítio. Os pontos das isotermas representam as áreas dos picos do termograma da titulação, calculados automaticamente no *add-on* do software Origin v.7.0 (OriginLab), e a linha preta representa o ajuste do modelo de ligação.

Tabela 1. Parâmetros termodinâmicos da interação entre ácido chicórico e BthTX-I determinados por ITC realizada à 20°C utilizando-se como tampão solução aquosa com 5% etanol e 5% piridina.

n (número de sítios)	$0,72 \pm 0,01$
K_d (μM)	$8,47 \pm 1,26$
ΔH (kcal/mol)	$-3,97 \pm 0,14$
$-T \cdot \Delta S$ (kcal/mol)	$-2,83$

Nos estudos aqui apresentados, utilizamos a massa medida (pesada) no cálculo das concentrações dos ligantes, enquanto as concentrações das proteínas são determinadas espectrofotometricamente. Durante as análises de dados, caso seja necessário ajustar as concentrações das espécies titulada ou titulante, elas são ajustadas da seguinte forma: i) se a estequiometria obtida tivesse um valor maior que o esperado, por exemplo num sistema com interação 1:1, a concentração do ligante é ajustada, pois isso é indicativo que há menos ligante que o valor assumido (Grüner et al., 2014); ii) se a estequiometria tiver um valor menor que o esperado, por exemplo um valor abaixo de 1 para um sistema com interação 1:1, a concentração da proteína (espécie titulada) é ajustada.

O cálculo da concentração da BthTX-I foi feita considerando-se um dímero e a do ácido chicórico foi feito pela sua massa molecular e, com base na estequiometria calculada de $0,72 \pm 0,01$ sítios, pode-se considerar que está ocorrendo a ligação de 1 molécula de ácido chicórico por dímero de BthTX-I. A diferença do valor obtido para o número inteiro mais próximo, nesse caso 1, se deve possivelmente à erros na determinação da concentração da proteína, ou ela esteja parcialmente em seu estado inativo ou parcialmente com *folding* correto (Tellinghuisen, 2005).

O valor da estequiometria obtido nos estudos calorimétricos é condizente com a estrutura cristalográfica obtida (Cardoso et al., em elaboração), que mostrou um dímero em sua conformação convencional (Ward et al., 1998) complexado à uma molécula de ácido chicórico (Fig. 13).

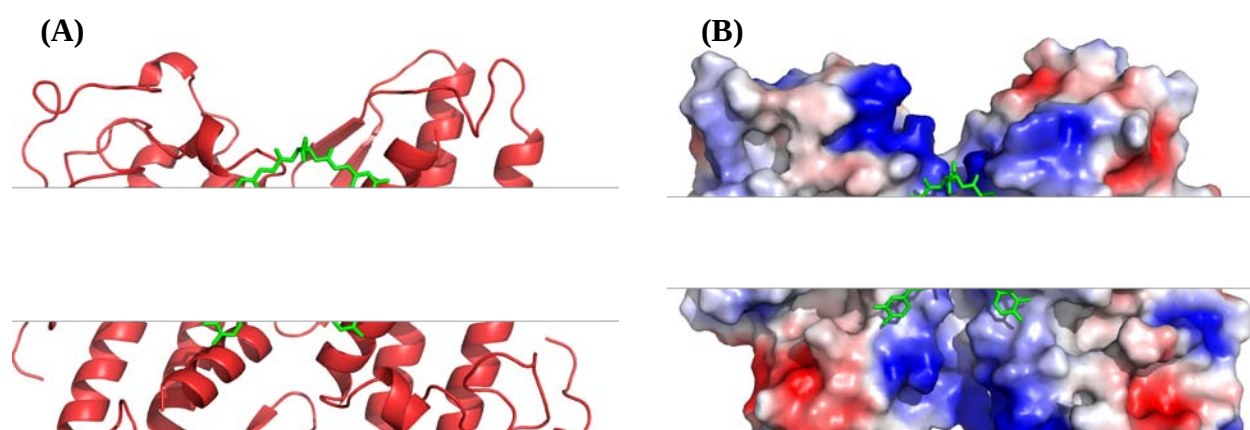


Figura 13. Estrutura cristalográfica do complexo BThTX-I/Ácido chicórico. (A) Representação da BthTX-I na forma de dímero convencional, em forma de *cartoon* (vermelho), e ácido chicórico (*sticks*, verde). (B) Nuvem de potencial eletrostático gerado para a BThTX-I com as cargas positivas em azul e as negativas em vermelho e o ácido chicórico em forma de *sticks* (verde).

A isoterma de ligação apresentou um processo exotérmico monotônico, ou seja, sem variações entálpicas exotérmicas e endotérmicas explícitas, como os que serão mostrados nas seções futuras deste trabalho. Esse comportamento é característico de apenas um evento de ligação ou de mais de um evento com afinidades e variações entálpicas muito próximas (Perozzo et al., 2004; Velazquez-Campoy et al., 2004; Bernardes et al., 2015). Por isso, foi considerado que houve apenas um evento de ligação com comportamento entálpicamente favorável, com $\Delta H = -3.97 \pm 0.14$ kcal/mol. Como o calor medido representa a troca de calor global devido à interação entre as biomoléculas (Perozzo et al., 2004), o termograma indica que as ligações realizadas foram mais energéticas que a adsorção de moléculas de água que estavam na região de ancoragem do ligante (Freire, 2004). Entretanto, quando foram verificadas quais ligações

estavam ocorrendo entre as biomoléculas, de acordo com a estrutura cristalográfica, foi verificado que eram apenas interações hidrofóbicas (Fig. 14).

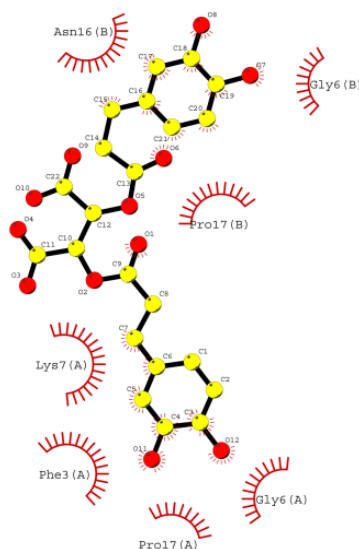


Figura 14. Diagrama das ligações estabelecidas entre a molécula de ácido chicórico e a BthTX-I em sua conformação dimérica convencional. Traços pretos significam as ligações entre os átomos de carbono (pontos amarelos) e oxigênio (pontos vermelhos) da molécula de ácido chicório. Figura confeccionada no software LigPlot (Wallace et al., 1995) com base na estrutura cristalográfica resolvida do complexo BthTX-I/Ácido chicórico.

A estrutura cristalográfica refinada distoa de diversas outras apresentadas, que mostram que miotoxinas botrópicas se apresentam na conformação dimérica “alternativa” para desestabilizar membranas biológicas (dos Santos et al., 2009b; Gallaci & Cavalcante, 2010; Fernandes et al., 2014), além de, na conformação alternativa, apresentar valores de energia livre mais favoráveis para as interfaces hidrofóbicas e maior área de interface (dos Santos et al., 2009b; Fernandes et al., 2010; 2013). Entretanto, quando os dados cristalográficos foram refinados com base no dímero alternativo, foi observado que a molécula de ácido chicórico fazia menos interações com o dímero de BthTX-I, quando comparada às interações com o dímero “convencional”, e o ácido chicórico ainda ficava com regiões livres expostas ao solvente (Fig. 15). Por isso, essa conformação é considerada menos favorável que quando o complexo é refinado com a BthTX-I em sua conformação “convencional” (Cardoso et al., em elaboração)

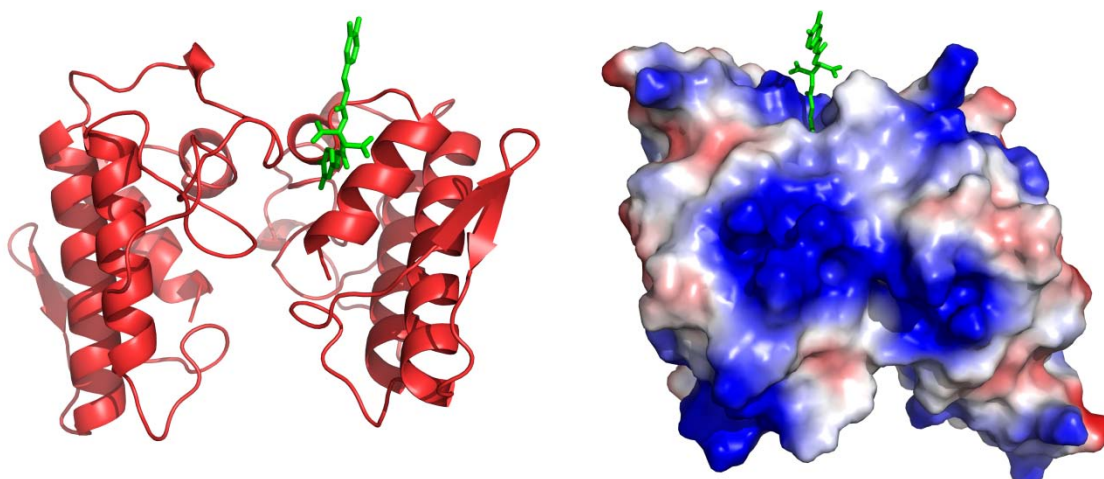


Figura 15. Estrutura cristalográfica do complexo BThTX-I/Ácido chicórico. (A) Representação da BthTX-I na conformação de dímero alternativo, em forma de cartoon (vermelho), e ácido chicórico (sticks, verde). (B) Nuvem de potencial eletrostático gerado para a BThTX-I com as cargas positivas em azul e as negativas em vermelho e o ácido chicórico em forma de *sticks* (verde).

Ao se analisar a unidade assimétrica da estrutura cristalográfica obtida, Cardoso e colaboradores (em elaboração) observaram 2 dímeros de BthTX-I na conformação alternativa, sendo que nesta estrutura conformacional tetramérica, o ácido chicórico faz contatos hidrofóbicos com todos os monômeros da toxina (Fig. 16).

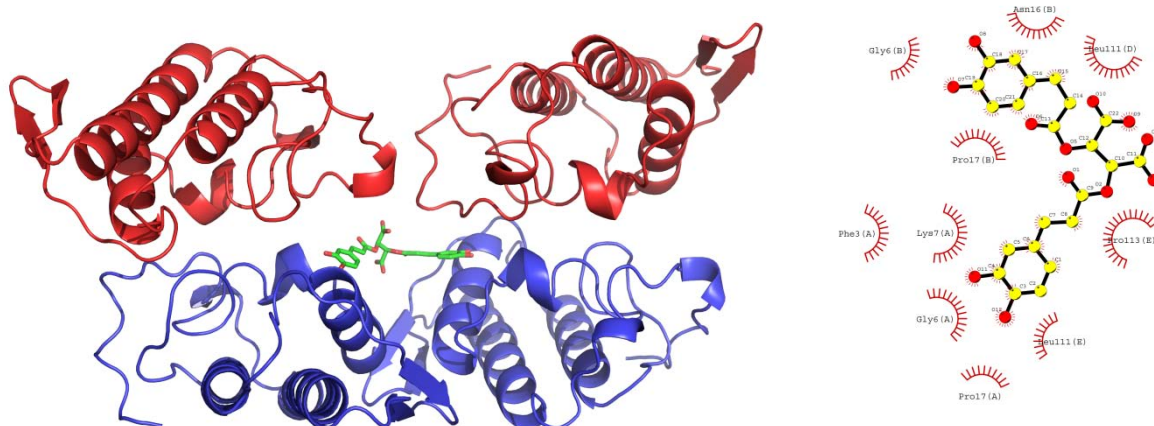


Figura 16. Representação tetramérica do complexo BthTX-I/Ácido chicórico. (Esquerda) Conformação tetramérica gerada pela simetria da unidade assimétrica com dois dímeros da proteína em sua conformação convencional (monômeros da mesma cor) ou dois dímeros em conformação alternativa (monômeros com cores diferentes). (Direita) Diagrama de interações da molécula de ácido chicórico com a estrutura tetramérica de BthTX-I. Os pontos amarelos e vermelhos denotam os átomos de carbono e oxigênio, respectivamente, e os traços pretos as ligações entre os átomos.

Entretanto, analisar os dados obtidos por calorimetria de titulação isotérmica com um modelo de ligação que caracterize a ligação de uma molécula de ácido chicórico em um dímero de BthTX-I com posterior complexação de outro dímero de BthTX-I (formação do tetrâmero)

não foi possível, pois o comportamento termodinâmico obtido não corrobora esse modelo de ligação, tampouco as formas geométricas da isoterma de ligação obtida. Entretanto, cabe ressaltar que as condições de realização do experimento calorimétrico não são iguais as condições realizadas nos experimentos de cristalização, e por isso não se pode afirmar que a formação do complexo tetramérico esteja errada. Podemos apenas concluir que, com base no experimento calorimétrico, o modelo mais adequado é a ligação do ácido chicórico a um dímero de BthTX-I.

Os experimentos funcionais de miotoxicidade foram realizados no departamento de Farmacologia pelos Drs. Fabio F. Cardoso e Walter L. G. Cavalcante utilizando-se preparações do nervo frênico-músculo diafragma de camundongos. Neste experimento foram realizadas medidas temporais das contrações diretas e das evocadas indiretamente no músculo/nervo frênico com a presença e ausência da BthTX-I incubada ou não com ácido chicórico. Os resultados mostraram que quando a BthTX-I foi incubada com ácido chicórico, houve proteção total da preparação muscular, uma vez que não houve paralisia significativa das contrações musculares (Cardoso et al., em elaboração). Por isso, com base no efeito protetor à preparação muscular promovida pelo ácido chicórico, e comparando a afinidade determinada por ITC com os dados da literatura (Freire, 2008), podemos considerar que o composto apresenta afinidade da ordem das apresentadas por compostos nas primeiras rodadas de *screenings* de alta escala ou de *screenings* de fragmentos. Além disso, as variações da entalpia ($\Delta H = -3.97 \pm 0.14$ kcal/mol) e entropia ($\Delta S = -2.83$ kcal/mol) observadas tem iguais proporções à energia livre de ligação, fato também observado para outras proteínas e medicamentos de programas de química medicinal, conforme demonstraram as análises do banco de dados Scorpio (Olsson et al., 2008). Entretanto, se formos comparar a afinidade do ácido chicórico pela BthTX-I com as afinidades de compostos anti-HIV comerciais, que já passaram por diversas fases de otimização, que são da ordem de nano a picolar (Freire, 2008), ainda seriam necessárias otimizações da molécula que levem à variações da energia livre em torno de -8 a -10 kcal/mol (Kawasaki & Freire, 2011).

Essa variação na energia livre de ligação apesar de ser considerável, pode ser alcançada com rodadas de otimização molecular, uma vez que ligações de hidrogênio com geometrias favoráveis contribuem com variações entálpicas da ordem de -4 a -5 kcal/mol (Kawasaki & Freire, 2011). E como se trata de um composto pequeno, que com base na estrutura cristalográfica ainda não faz ligações de hidrogênio, tem poucas restrições conformacionais, indicativo de poucas perdas entrópicas, com a substituição ou incorporação de grupos moleculares, pode-se chegar a um composto com excelente afinidade.

Mas, para ser considerado um inibidor efetivo, deve-se buscar a otimização entálpica do composto, com formação de ligações de hidrogênio, que apesar de ser um trabalho mais árduo (Freire, 2008, 2009; Williams et al., InPress), se faz necessário. A otimização entálpica, com consequente aumento da seletividade e especificidade é fundamental, pois diversas outras PLA₂ estão presentes em diversas vias metabólicas de humanos, evitando assim que esse composto atue e altere outras vias/rotas fisiológicas.

Considerando-se que o ácido chicórico tem potencial como futuro inibidor, com base nas estruturas cristalográficas, quando considerada a estrutura da BthTX-I proposta como dímero alternativo, pode-se sugerir seu potencial de inibição da atividade miotóxica pela ação de bloqueio do canal hidrofóbico, uma vez que não foram observadas moléculas de PEG no canal hidrofóbico, as quais estavam nas condições de cristalização. Esse mecanismo inibiria a ação miotóxica, pois não possibilita a ativação alostérica da BthTX-I (Fernandes et al., 2014), diminuindo seu potencial de ação miotóxica. Outro fator que contribui ainda mais para a inibição do efeito miotóxico é a formação de oligômeros de alta ordem, nesse caso tetrâmeros, o que favorece para diminuir ainda mais sua atividade (Salvador et al., 2015). Se for considerado o complexo BthTX-I/ácido chicórico em sua conformação dimérica, na qual a BthTX-I apresenta-se como dímero convencional que é estabilizado pela molécula de ácido chicórico, os arranjos estruturais da região C-terminal não ficam alinhadas, sugerindo uma diminuição considerável do potencial miotóxico da proteína (Fernandes et al., 2014) (Cardoso et al., em elaboração).

2.6.2. Análise termodinâmica da interação entre BthTX-I e cloreto de zinco

A grande maioria dos trabalhos que buscam inibidores tem seu foco em compostos de plantas utilizadas na medicina popular de países em desenvolvimento (Sánchez & Rodríguez-Acosta, 2008; Soares et al., 2005), e poucos estudos tem se voltado à avaliação de íons na inibição do veneno de serpentes, mais particularmente à toxinas PLA₂ homólogas (Rodrigues-Simioni et al., 1995; Soares et al., 2002; Heluany et al., 1992).

O zinco apresenta efeito antioxidante e antiinflamatório e pode ter papel benéfico nas patologias cardiológicas e na arterosclerose (Little et al., 2010). Também já foi relatado seu uso na prevenção de tipos específicos de câncer (Prasad et al., 2009; Dhawan & Chadha, 2010; Grattan & Freake, 2012) e cegueira em pacientes com degeneração macular relativa à idade, como adjuvante no tratamento de diarreia, para ajudar o sistema imune, no tratamento de resfriado, doença de Wilson e anemia falciforme (Prasad, 2012). Entretanto também já foi verificado que a presença deste íon em determinadas concentrações o torna tóxico para uma ampla variedade de tipos celulares *in vitro* (Bozym et al., 2010).

Com o intuito de verificar se há interação BthTX-I/ Zn^{2+} e se íons de zinco apresentam efeito inibitório à ação miotóxica da BthTX-I, foram realizados diversos experimentos tais como testes funcionais, estruturais e calorimétricos para verificar, respectivamente, se ocorre inibição do efeito miotóxico, onde ocorre ligação dos íons à BthTX-I e com qual afinidade os íons se ligam (Borges et al., 2017).

Foi verificado experimentalmente que os íons zinco inibiram a atividade miotóxica da BthTX-I em preparações musculares de camundongos em aproximadamente 80% (Borges et al., 2017).

O experimento calorimétrico foi realizado pela titulação da solução de cloreto de zinco (2000 μM , pipeta) à BthTX-I (53 μM , célula de reação), que resultou em um termograma que apresentou comportamento exotérmico e uma isoterma de ligação que denota um sistema de interação com baixa afinidade (Biswas & Tsodikov, 2010) entre a proteína e os íons de zinco (Fig. 17).

Como o sistema, com base no termograma obtido, apresentou baixa afinidade, os pontos de inflexão da curva, que sugerem as estequiometrias de ligação (Perozzo et al., 2004), não foram determinados. Por isso, com o intuito de determinar a estequiometria da interação e a afinidade de ligação para cada sítio, foram ajustados modelos matemáticos com 1, 2 ou 3 sítios de ligação, sendo que em cada modelo os sítios eram considerados independentes entre si. Os modelos matemáticos foram ajustados aos pontos da isoterma de ligação, que foram determinados pelo ajuste automático da linha de base e do cálculo da área dos picos através do software Nitpic (Keller et al., 2012; Scheuermann & Brautigam, 2015). Foi escolhido o software Nitpic, pois o termograma apresentado apresenta-se com baixa relação sinal/ruído (bastante ruído de alta e pouco de baixa frequência) e baixas energias por injeção.

Nesta análise, como a afinidade de interação era baixa, o que não impossibilita o estudo da interação (Turnbull & Daranas, 2003), mas requer alguns cuidado específicos, as estequiometrias foram mantidas fixas de acordo com o modelo utilizado para ajustar os dados das isotermas. Esse procedimento foi adotado, pois em experimentos com baixos valores da constante de Wiseman (1989), fixar a estequiometria possibilita o cálculo dos valores da variação de entalpia (ΔH) e constantes de dissociação (k_d) com menores erros associados comparados aos valores estimados com a estequiometria variável. Além disso, quando a estequiometria é mantida fixa, os erros associados às variações entálpicas são minimizados e a sensibilidade da variação de entalpia depende do grau de saturação da espécie titulada aos quais os experimentos são realizados (Kantonen et al., 2017).

Para definir o melhor modelo ajustado, e assim definir a estequiometria e afinidade de cada sítio, foram analisados tanto o χ^2/DoF (*DoF*, *Degrees of Freedom*: graus de liberdade do ajuste) (Crépin et al., 2010) quanto os resíduos (diferença do valor experimental e do modelo ajustado) de cada modelo ajustado, realizado através do teste *F* ou Akaike (Sant’Anna et al., 2016) caso os resíduos apresentem distribuição Gaussiana (paramétrica) ou não Gaussiana (não paramétrica), respectivamente. Devem ser feitas as análises tanto do χ^2/DoF quanto dos resíduos dos ajustes, pois apenas o valor de χ^2/DoF pode levar à conclusões errôneas do melhor modelo ajustado, como possivelmente tenha ocorrido no trabalho de Sankhala e colaboradores (2016), pois em modelos com maior número de sítios, há também maior números de variáveis na análise, aumentando assim os graus de liberdade.

Para os diferentes modelos ajustados ($n= 1, 2$ e 3), foram obtidas as constantes de dissociação (k_d) e χ^2 /graus de liberdade descritas na tabela 2, bem como as curvas ajustadas às isotermas de ligação (Fig. 17).

Tabela 2. Parâmetros termodinâmicos da interação entre BthTX-I e íons zinco obtidos por calorimetria de titulação isotérmica. Constantes de dissociação (K_d) da interação BthTX-I:Zn²⁺ obtidas através do ajuste de modelos de ligação considerando 1, 2 ou 3 sítios independentes. A titulação foi realizada por 40 injeções (2 μ L, 4s) de íons zinco (2000 μ M)(pipeta) à BthTX-I (53 μ M)(célula de reação) diluídos em 100 mM Tris HCl, 100 mM NaCl, pH 7.0 à 25°C.

Modelo	K_{d1} (μ M)	K_{d2} (μ M)	K_{d3} (μ M)	χ^2/DoF
1 sítio	188,7 $\pm$ 31,0			7683
2 sítios	9,3 $\pm$ 5,2	2808,9 $\pm$ 1735,9		3792
3 sítios	83,3 $\pm$ 25,4	62,1 $\pm$ 25,1	300,0 $\pm$ 104,3	2691

DoF: degrees of freedom (graus de liberdade)

Uma vez que os resíduos apresentaram distribuição Gaussiana (Shapiro-Wilk, p -value>0.05, Minitab) foi realizado o teste *F* (*F* test, p -value<0.05, Origin) e foi verificado que o melhor modelo ajustado corresponde ao ajuste de 3 sítios. Outro fator que pode indicar ajuste dos dados com modelos com muitas variáveis, ou seja, uma superparametrização (*overparameterization*) são erros associados às variáveis determinadas (k_d , ΔH) com valores na mesma ordem de grandeza dos valores determinados ou diferenças menores que 50%, o que não foi observado nos ajustes realizados. Além disso, como o sistema é de baixa afinidade, é completamente compreensível e esperado que os erros associados estejam da ordem de 20-30% dos valores determinados.

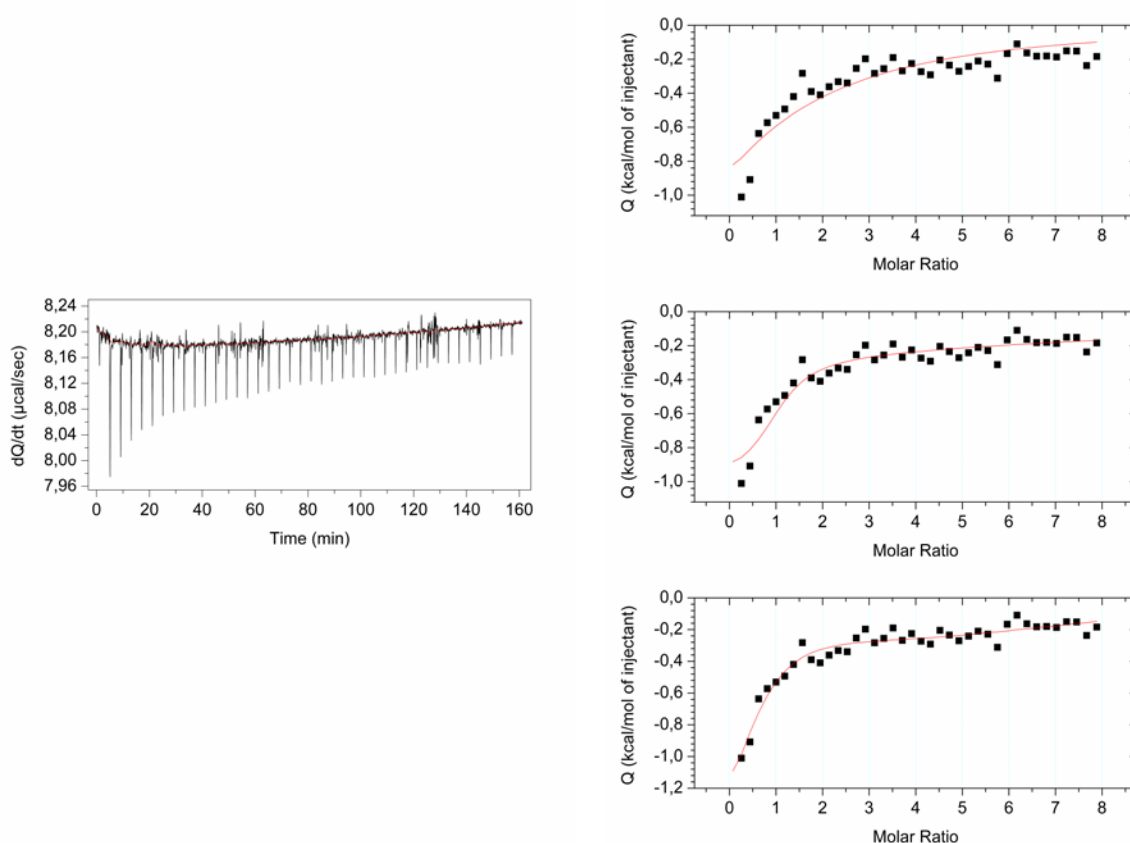


Figura 17. Calorimetria de titulação isotérmica (ITC) da interação entre ZnCl_2 e BthTX-I. (Esquerda) Termograma obtido pela titulação de ZnCl_2 (2000 μM , pipeta) na BthTX-I (53 μM , célula de reação), diluídos em tampão Tris HCl (100 mM), 100 mM NaCl, pH 7.0 à 25°C. A linha preta representa a potência aplicada pelo microcalorímetro iTC₂₀₀ para manter as células de reação e controle à mesma temperatura e a linha vermelha representa a linha de base determinada pelo *add-on* do software Origin v.7.0 (OriginLab) para o cálculo das áreas dos picos. (Direita) Isotermas de ligação ajustadas com modelos de ligação de 1 sítio (Painel superior), 2 sítios (Painel central) e 3 sítios (Painel inferior). Os pontos das isotermas representam as áreas dos picos do termograma da titulação, calculados automaticamente no *add-on* do software Origin v.7.0 (OriginLab), e a linha vermelha representa o ajuste do modelo de ligação.

Os dados termodinâmicos corroboram os dados cristalográficos obtidos por espalhamento anômalo de raios-X, que também mostraram a interação de 3 íons Zn^{2+} por dímérico de BthTX-I (Borges et al., 2017). Foi verificado cristalograficamente que os íons se ligam: (i) à His48 no canal hidrofóbico do monômero A; (ii) à His120, do monômero A e; (iii) à His120 do monômero B (Fig. 18).

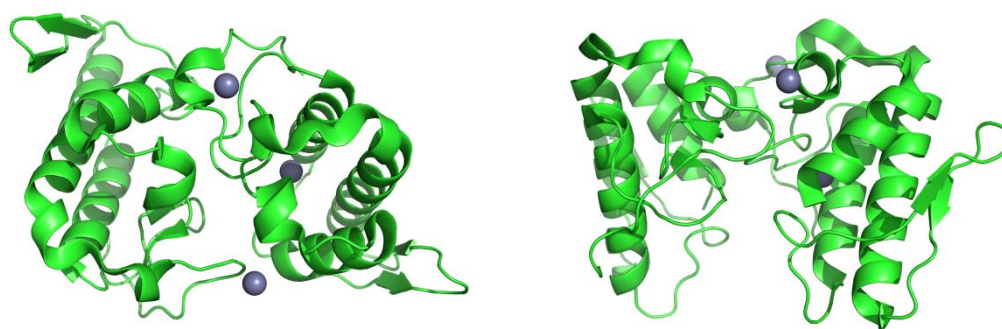


Figura 18. Estrutura cristalográfica do complexo BthTX-I/ Zn^{2+} , em forma de *cartoon* (verde), complexada aos íons zinco (esferas cinza) (PDB 4WTB). Desenhos representam a mesma estrutura rotacionadas em 90°. Figura confeccionada utilizando o software PyMOL (www.pymol.org).

A estrutura cristalográfica foi refinada com base na conformação alternativa do dímero de BthTX-I. Entretanto, foi verificado na estrutura da BthTX-I/ Zn^{2+} que os monômeros são diferentes, principalmente por variações nos resíduos Y199 ao F125 na região C-terminal. Como proposto por Fernandes e colaboradores (2013), os resíduos L121 e F125 são os responsáveis por formar o MDiS, que é estabilizado por uma ligação de hidrogênio entre o oxigênio da cadeia principal da L121 e o nitrogênio da cadeia principal da F125, dois resíduos hidrofóbicos e expostos e pela P123 rígida, que junto com a K122 forma uma α -hélice curta. No complexo BthTX-I/ Zn^{2+} o monômero B apresenta os resíduos 121 ao 125 mais distantes entre si formando uma estrutura secundária de loop (Borges et al., 2017). Por isso, a proposição da inibição do efeito miotóxico da BthTX-I está relacionada à ligação de Zn^{2+} à His120, que não permite a interação entre os resíduos do MDiS, particularmente da Lys121 e a membrana. Além disso, a interação do Zn^{2+} com a His120 no monômero B pode interferir no bloqueio da ativação alostérica, ou seja, não permite a mudança conformacional à conformação ativa da proteína (Borges et al., 2017). Outro fator que pode estar relacionado ao impedimento da mudança alostérica é a ligação do Zn^{2+} à His48, impedindo assim a ancoragem de ácidos graxos no canal hidrofóbico, um dos fatores preponderantes para a mudança alostérica (dos Santos et al., 2009).

Com base nessa estrutura e em estudos de segmentação do canal hidrofóbico da proteína Borges e colaboradores (2017) propuseram um maior detalhamento do mecanismo de ação miotóxico previamente proposto (Fernandes et al., 2014): i) ativação alostérica pela entrada uma molécula hidrofóbica/ácido graxo em uma porção específica do canal hidrofóbico do monômero A; ii) aproximação dos resíduos L121 e F125 do monômero B; iii) reorientação dimérica, com alteração conformacional do monômero B, invertendo os Y119 e H120 e aproximando a L121 e F125; iv) a parte inacessível do canal hidrofóbico é aberta pela reorientação dimérica e a molécula hidrofóbica se liga, estabilizando o dímero em sua conformação ativa; v) proteína se

liga à membrana pelo MDoS; vi) e a desestabiliza pela interação com o MDiS; vii) que leva a um fluxo de íons descontrolado que causa a morte celular.

Apesar de ser observada inibição do efeito miotóxico no experimento funcional, verificando-se a proporção molécula/molécula entre a BthTX-I e os íons Zn^{2+} , foi constatado que a proporção de Zn^{2+} é muito maior nos experimentos funcionais e de cristalização do que o relatado com outras Lys49-PLA₂ (Salvador et al., 2015). Entretanto, nos relatos apresentados, ao menos nos estudos miográficos, essa foi a única condição testada, então é inviável afirmar que o efeito miotóxico seria inibido em menores concentrações de Zn^{2+} , mas com base nos experimentos calorimétricos, sugere-se que não, uma vez que nas condições testadas, o complexo apresenta baixa afinidade de interação. Outro fator importante a se analisar é que nos experimentos de cristalização, não foi verificado o pH final da solução na gota de cristalização, pois a diluição de cloreto de zinco diminuiu o pH da solução tampão utilizada nos experimentos de ITC, e o mesmo muito provavelmente pode ter acontecido na gota de cristalização. Isso foi observado, pois os primeiros experimentos calorimétricos foram realizados sem a conferência do pH entre as soluções das espécies titulada e titulante, sendo que na da espécie titulante o pH era muito menor que na solução da espécie titulada (4,0-4,5 vs. 7,0, respectivamente). Sendo que nestes experimentos o calorímetro gerava um calor tão intenso que não era capaz de retornar à linha de base, e apenas após o ajuste do pH da solução da espécie titulante, foram obtidos resultados confiáveis e reproduzíveis, sendo visto que o calor de diluição era mínimo ao final das titulações controle.

Entretanto, caso as alterações conformacionais observadas não tenham ocorrido em função de uma possível alteração do pH, o que é possível, uma vez que a proteína estava em sua conformação dimérica “alternativa” e tenderia a ficar em forma de monômero caso o pH fosse ácido, e desprezando o potencial inibitório do Zn^{2+} como inibidor em função da baixa afinidade observada por calorimetria, é inegável sua contribuição na elucidação e complementação dos mecanismos de ação miotóxicas das Lys49-PLA₂s, bem como os estudos das regiões específicas do canal hidrofóbico destas proteínas, proposto por Borges e colaboradores (2017).

Com base na afinidade calculada sugere-se que o íon Zn^{2+} não é um inibidor viável para uso clínico, pois seria necessária uma grande quantidade a fim de inibir o efeito em caso de acidente ofídico, além de que já há vários competidores pelo Zn^{2+} no sangue, como os fosfatos. Além disso, expor diversos tipos de tecidos a níveis maiores que 100 nM de íons livres por mais que alguns segundos pode ser extremamente tóxico e levar à perda de funções fisiológicas (Bozym et al., 2010).

2.6.3. Análise termodinâmica da interação entre MjTX-I e suramina

A suramina é um composto polisulfonado com alta carga superficial, amplamente utilizado para tratamentos de tripanossomíase (Fairlamb et al., 2003) e oncocercose (Hawking, 1978). Já foi testada como agente neutralizante de miotoxicidade e preveniu necrose muscular promovida por outras Lys49-PLA₂s (Arruda et al., 2002; de Oliveira et al., 2003; Murakami et al., 2005, 2007) bem como também inibiu bloqueio neuromuscular induzido por neurotoxinas pré-sinápticas como crotoxina e β -bungarotoxina (Fathi et al., 2011; Lin-Shiau & Lin, 1999).

A suramina, como demonstrado anteriormente, já comprovou capacidade de inibir a ação miotóxica de várias Lys49-PLA₂ e de PLA₂. A MjTX-I apresenta algumas características estruturais peculiares, que a distinguem de outras Lys49-PLA₂s, como por exemplo não apresentar o sítio miotóxico proposto em sua sequência de aminoácidos (resíduos dos sítios MDoS e MDiS) e de apresentar a conformação do dímero convencional em sua estrutura cristalográfica, além de se apresentar na forma tetramérica quando cristalizada sem ligantes (Salvador et al., 2013), enquanto a maioria das Lys49-PLA₂s se apresentam como dímeros em sua conformação alternativa (Salvador et al., 2015; dos Santos et al., 2009; Fernandes et al., 2013).

Além disso, a MjTX-I é bastante instável, sendo que pode assumir diferentes formas oligoméricas que parecem ser dependentes da força iônica e da concentração do tampão utilizado para sua diluição (Salvador et al., 2013).

Possivelmente devido à essas características estruturais incomuns às demais Lys49-PLA₂s, essa proteína apresente menor atividade miotóxica que as demais Lys49-PLA₂s descritas (Cavalcante et al., 2007). Por isso, foram realizados vários procedimentos experimentais buscando determinar se a suramina apresenta ação inibitória ao efeito miotóxico e qual seu mecanismo de ação.

Interessantemente, que a proteína nativa, sem ser complexada a nenhum ligante, foi cristalizada somente após um longo período de tempo (cerca de um ano), entretanto quando complexada à suramina obteve-se cristais que permitiram a coleta de dados de difração de raios-X em aproximadamente 1 mês. Além disso, na forma nativa, na unidade assimétrica havia um tetrâmero formado por dímeros convencionais (Fig. 7), enquanto quando complexada à suramina, esta era a responsável por estabilizar os monômeros na forma dimérica, em sua conformação alternativa (Fig. 19) (Salvador et al., em elaboração). A estabilização do dímero também foi verificada por simulações de dinâmicas moleculares, que mostraram menores variações (r.m.s.d.) enquanto a estrutura estava complexada à suramina do que quando o ligante era tirado do complexo (Salvador et al., em elaboração).

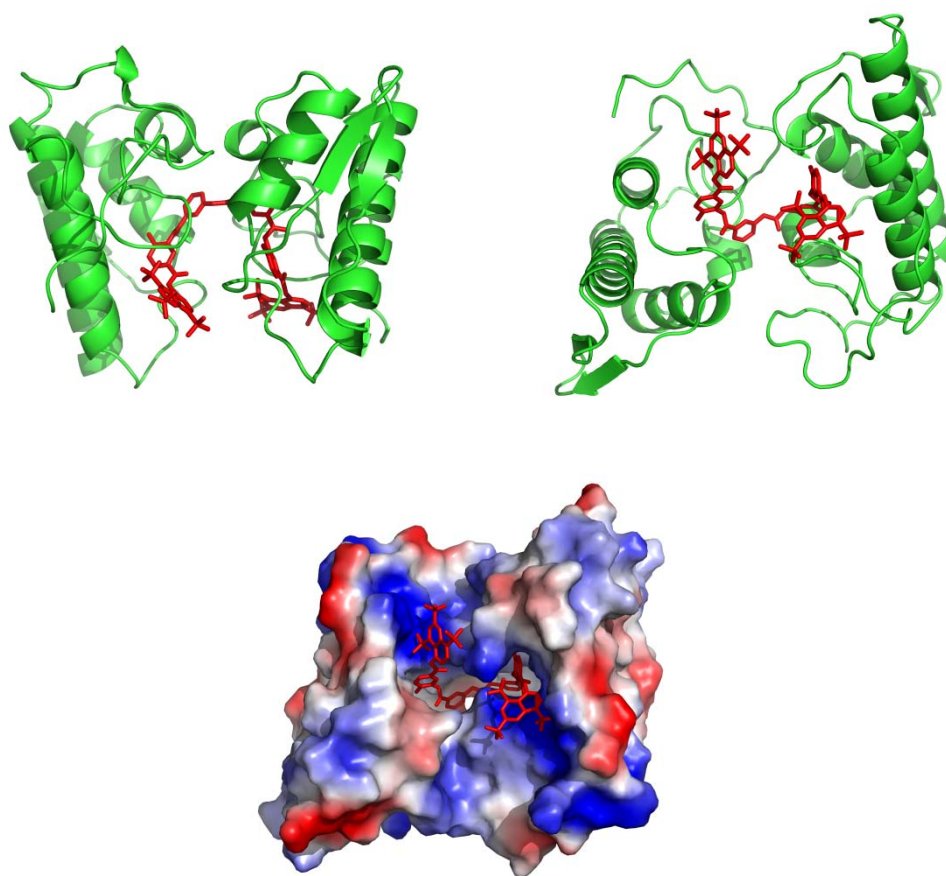


Figura 19. Estrutura cristalográfica do dímero de MjTX-I (cartoon, verde) com suramina (sticks, vermelho). Figuras superiores estão rotacionadas em 90°. Figura inferior representa a nuvem de carga da proteína com cargas negativas em vermelho e cargas positivas em azul.

Foram realizados estudos funcionais e foi visto que a MjTX-I promovia bloqueio das contrações diretas e indiretas de preparações musculares de camundongos de forma tempo-dependente, mas as concentrações de MjTX-I necessárias para induzir o mesmo efeito apresentado por outras Lys49-PLA₂ era aproximadamente 4 vezes maior. Foi verificado também que a incubação da toxina com a suramina promoveu o bloqueio de sua ação miotóxica (Salvador et al., em elaboração).

Já há relatos estruturais da ação da suramina em outras Lys49 (Murakami et al., 2005) e Ser49-PLA₂s (Zhou et al., 2008), entretanto elas interagem estruturalmente de forma diferente com a suramina. Zhou e colaboradores verificaram que na unidade assimétrica haviam 8 monômeros de Ecarfolina S com conformações quase idênticas e 12 moléculas de suramina, de forma que a estrutura pode ser dividida em 4 dímeros cada qual com 3 moléculas de suramina em seus canais hidrofóbicos, sendo que as moléculas de suramina interagem com seus C- e N-terminais. Murakami et al., (2005) mostrou que a interação era na proporção de 1 dímero de

Basp-II para 1 molécula de suramina, entretanto, nessa estrutura, a suramina se liga ao *loop* de coordenação de Ca^{2+} e ao C-terminal da proteína. Entretanto, foi verificado que a complexação da suramina não altera as interações responsáveis por manter a conformação da porção hidrofóbica, mas resulta no deslocamento da porção de interação do *loop* de coordenação de cálcio e do C-terminal. Além disso, foi sugerido que como a suramina induz alteração da carga superficial, a proteína não teria mais capacidade de se ligar em membranas, que são carregadas negativamente (Murakami et al., 2005).

Zhou e colaboradores também relataram experimentos calorimétricos da interação entre a Ecarfolina S e a suramina, entretanto, o termograma e a isoterma de ligação obtidos são completamente diferentes das obtidas em nosso estudo. Eles observaram um termograma apenas com padrão geral exotérmico, mas não monotônico, devido ao comportamento observado nas primeiras injeções, que apresentaram aumento da componente exotérmica e sua posterior diminuição. Também fizeram uma simplificação que possibilitou a análise de dados, uma vez que consideraram a ligação das 3 moléculas de suramina à Ecarfolina S como apenas um evento, e não 3 eventos distintos (Zhou et al., 2008).

Em nossos experimentos, realizados com a MjTX-I diluída em um tampão de baixa força iônica e baixa entalpia de ionização (Bicarbonato de amônio, 50 mM, pH 8,0), na qual a proteína estava predominantemente na forma monomérica foi visto um termograma bifásico com comportamento endotérmico nas primeiras injeções acompanhado de uma componente exotérmica concomitante, que ficou mais evidente e passou a ser predominante nas injeções subsequentes, sendo esse o componente único a partir da 5ª injeção (Fig. 20).

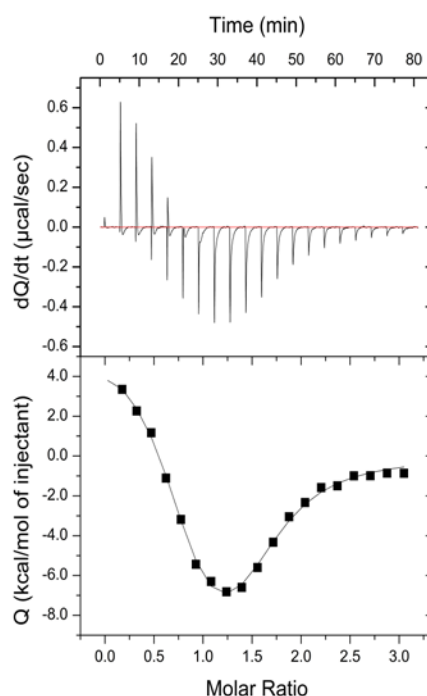


Figura 20. Titulação calorimétrica isotérmica de suramina em MjTX-I. (Painel superior) Termograma (potência aplicada pelo equipamento para manter ambas as células à mesma temperatura em função do tempo) da titulação de suramina (750 μ M, pipeta) em MjTX-I (50 μ M, célula de reação) à 25°C utilizando-se tampão bicarbonato de amônio (50 mM), pH 8.0. (Painel inferior) Isotherma de ligação (calor normalizado pela concentração de titulante em função da razão molar de suramina pela de MjTX-I) da titulação.

Esse comportamento, similar ao apresentado pela MjTX-II (veja seção 2.6.4) não é um artefato uma vez que foi reproduzível em todas as repetições e o calor de diluição da suramina era endotérmico, com menor magnitude (ordem de 0,2 kcal/mol) que as primeiras injções da titulação MjTX-I/suramina e era constante ao longo da titulação controle.

O comportamento de ligação da BthTX-I com ácido chicórico e íons Zn^{2+} são característicos de eventos independentes de ligação e podem ser consideradas ligações em sítios específicos, entretanto, o comportamento da interação MjTX-I/suramina não é correspondente à esse tipo de ligação, assim como o comportamento analisado por Zhou et al. (2008) e Salvador et al., (2015). Essas interações, em função de seus termogramas e isotermas, apresentam dependências entre si, podendo apresentar cooperatividade positiva ou negativa, ou mesmo não serem cooperativas (Freiburger et al., 2015). Não se pode afirmar se há ou não cooperatividade apenas em função das isotermas, pois em alguns casos elas podem ter formas semelhantes

Quando se trata de interações proteína-proteína ou de interações entre macromoléculas, deve-se fazer uma análise diferente da realizada para interações sítio-específicas, por exemplo, como a interação de pequenas moléculas em sítios específicos de macromoléculas. Alguns *softwares* e autores diferenciam estes modelos pelos nomes: i) abordagem sítio específica e ii)

abordagem estequiométrica, cada qual com suas características específicas. A primeira é baseada no equilíbrio da ocupação do sítio pelo ligante, não considera complexos intermediários, o número de sítios é um parâmetro a se determinar e é válido para sistemas com sítios independentes de estequiometria conhecida ou desconhecida e para sistemas com interações competitivas entre dois ligantes, mas não deve ser aplicado para sistemas com interações cooperativas. O segundo modelo baseado no equilíbrio estequiométrico das espécies, gera as constantes de ligação estequiométricas (gerais) a partir das quais podem ser determinadas as constantes de ligação específicas para cada complexo, a estequiometria de cada espécie é conhecida e é aplicada para sistemas que apresentam cooperatividade e não deve ser utilizada em sistemas com estequiometrias desconhecidas (Verna Frasca, Malvern Instruments, comunicação pessoal).

A complexidade na análise de sistemas cooperativos ou de interações entre macromoléculas pode ser muito maior, pois vários tipos de interação podem estar acontecendo. Por exemplo, em sistemas com macromoléculas com dois sítios de ligação ou mesmo sistemas com dois eventos de ligação, pelo menos 6 possíveis mecanismos de ligação podem ocorrer: i) dois eventos idênticos e independentes; ii) dois eventos idênticos e com cooperatividade negativa; iii) dois eventos idênticos e com cooperatividade positiva; iv) dois eventos não idênticos e independentes; v) dois eventos negativos e com cooperatividade negativa e; vi) dois eventos diferentes e com cooperatividade positiva. O fator que dificulta ainda mais a análise desses sistemas é que nem todos são distinguíveis experimentalmente, uma vez que alguns apresentam isotermas de ligação e por isso, informações de metodologias ortogonais são necessárias. Por exemplo, uma sistema que apresente dois eventos idênticos e independentes se assemelha à um sistema com dois eventos diferentes com cooperatividade positiva, pois ambos tem efeitos de compensação (Freire et al., 2009). Em nosso caso, as análises sempre são acompanhadas de informações de DLS, cristalografia, SAXS ou fluorescência.

Por isso, buscando a forma mais simples de analisar o sistema, passou-se a utilizar um sistema cooperativo de dois estados em que se consideram apenas as moléculas monoméricas de MjTX-I nativas, seu estado intermediário (monômero de MjTX-I/suramina) e sua forma dimérica já complexada com suramina (monômero de MjTX-I/suramina/monômero de MjTX-I). Assim passa-se a analisar apenas os eventos de i) ligação da suramina ao monômero de MjTX-I e ii) complexação de outro monômero (nativo) ao complexo monômero de MjTX-I/Suramina, ou seja, a formação do dímero (Freiburger et al., 2015; Freire et al., 2009; Vegas et al., 2015).

A determinação dos parâmetros gerais de ligação (Tabela 3) mostraram o parâmetro de cooperatividade menor que 1 ($\alpha=0,03\pm0,01$), o que indica que os 2 eventos são considerados independentes ou são eventos idênticos com cooperatividade negativa (Freire et al., 2009).

Baseando-se na análise das interações entre a suramina e ambos monômeros da MjTX-I, obtida cristalograficamente, foi verificado que não ocorrem os mesmos contatos da suramina com os diferentes monômeros, além dos contatos hidrofóbicos realizados por ambos monômeros quando da formação do dímero (Fig. 21). Por isso, os eventos de interação foram considerados independentes, resultando no cálculo das constantes de dissociação e entalpias específicas dos eventos de ligação (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros termodinâmicos determinados por calorimetria de titulação isotérmica para a interação entre suramina e MjTX-I. Experimento realizado pela titulação de suramina (750 μ M) em MjTX-I (50 μ M) à 25°C diluídos em tampão bicarbonato de amônio (50 mM), pH 8.0.

Parâmetros gerais de ligação determinados por regressão não linear	
β_1 (M^{-1})	$(2,12\pm0,08) \times 10^7$
ΔH_1 (kcal/mol)	$6,1\pm0,8$
β_2 (M^{-2})	$(3,8\pm0,6)\times10^{12}$
ΔH_2 (kcal/mol)	$-9,0\pm2,5$
α	$0,03\pm0,01$
Constantes de dissociação e entalpias específicas da ligação	
K_{d1} (μ M)	$0,48\pm0,23$
Δh_1 (kcal/mol)	$5,97\pm0,85$
K_{d2} (μ M)	$5,95\pm0,99$
Δh_2 (kcal/mol)	$-14,8\pm2,96$

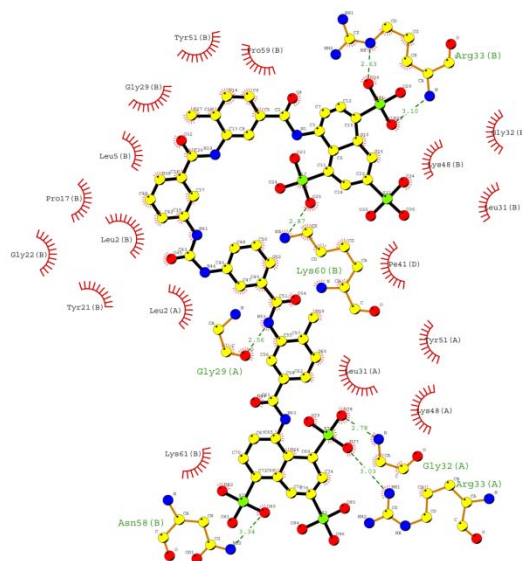


Figura 21. Diagrama de ligações da suramina com o dímero de MjTX-I. A suramina está representada pelas esferas amarelas, vermelhas, azuis, verde conectadas por traços pretos, que denotam os átomos de carbono, oxigênio, nitrogênio e enxofre, respectivamente. As ligações polares são representadas por linhas verdes tracejadas enquanto os contatos hidrofóbicos são representados por semicírculos vermelhos. Figura confeccionada no *software* LigPlot (Wallace et al., 1995) com base na estrutura cristalográfica do complexo MjTX-I/suramina.

Como visto na estrutura cristalográfica, a suramina realiza diferentes contatos com cada monômero da MjTX-I, entretanto pelo modelo de análise realizado eles não foram diferenciados. Fez-se essa simplificação, pois a diferenciação de cada evento de ligação geraria um modelo muito complicado uma vez que iria conter ainda, pelo menos, mais 2 constantes de associação (β) e variações de entalpia gerais de ligação (ΔH), inviabilizando a análise.

Entretanto, como os experimentos calorimétricos foram realizados sem a presença de PEG4000, e considerando-se que a suramina faz os mesmos contatos que foram apresentados na estrutura cristalográfica, que continha PEG4000 na condição de cristalização, sugerimos que o primeiro evento de ligação presente na titulação é a ligação da suramina no monômero B. De acordo com a estrutura cristalográfica, ela é feita basicamente por complementaridade de forma, uma vez que apresenta basicamente contatos hidrofóbicos e poucas ligações polares mas nenhuma ligação de hidrogênio, pois a menor distância entre contatos polares foi de 2.63 Å. Isso é corroborado pela termodinâmica apresentada, de uma reação desfavorável entalpicamente ($\Delta H > 0$), mas favorável entropicamente ($-T\Delta S < 0$). De um modo simplista, podemos também relacionar essas características termodinâmicas com a desolvatação de grupos polares, no caso a entalpia desfavorável ($\Delta H > 0$), enquanto a entropia favorável estaria relacionada com a entropia de desolvatação ($-T\Delta S < 0$). O segundo evento, relacionado por nós como a formação do

dímero pela ligação de um monômero no complexo MjTX-I/suramina, é entalpicamente favorável ($\Delta H < 0$) possivelmente devido à menor entalpia de desolvatação de grupos polares e formação de ligações polares, enquanto a entropia é desfavorável principalmente devido à maior estruturação do complexo (Kawasaki & Freire, 2011).

Não foi cogitada a formação do dímero como um primeiro evento e posterior ligação da suramina principalmente por questões estruturais, pois mesmo a suramina apresentando alta mobilidade estrutural seria muito pouco provável que ela se ligasse dessa forma após o dímero estar formado. Além disso, foi verificado pela modelagem molecular (Salvador et al., em elaboração) que a suramina é a responsável por estabilizar o dímero, o que é corroborado pelas estruturas cristalográficas obtidas, que mesmo em tampão com alta força iônica (Tris HCl), a MjTX-I se apresentou como dímero, enquanto na forma nativa, nas mesmas condições de cristalização, se apresentava como tetrâmero. Ademais, foi verificado pelo *software* Pisa (Krissinel & Henrick, 2007), que a formação dimérica, complexada com suramina, é estável em solução.

Apesar da suramina se apresentar como um inibidor eficiente da MjTX-I em laboratório, ela se apresenta como um grande desafio dependendo da via de administração humana, pois pode interagir em várias vias metabólicas e apresenta uma diversidade de ações no organismo humano (Hosang, 1985; Voogd et al., 1993; Stein, 1993; Liu et al., 2011; Albulescu et al., 2015). Ademais, sua possível otimização visando níveis mais favoráveis da energia livre, pode ser extremamente complexa, pois é uma molécula com grande mobilidade, alta carga, e pelo que outros estudos estruturais indicam, pode se ligar em diversas proteínas de venenos ofídicos de maneiras distintas. Com isso, a possível otimização em uma proteína pode fazer com que sua afinidade às outras seja diminuída. De qualquer maneira, apesar dos problemas apontados é uma opção viável como droga anti-veneno a ser melhor estudada já que é utilizada comercialmente como medicamento.

2.6.4. Análise termodinâmica da interação entre MjTX-II e suramina

Uma vez que foi verificado que a suramina apresenta inibição da ação da MjTX-I e outras Lys e Ser49-PLA₂s de venenos ofídicos, foi verificado se ela também apresenta ação sobre a MjTX-II do veneno da serpente *B. moojeni*. Para isso, foram realizados diversos experimentos como testes funcionais (miográfico e eletrofisiológico), cristalográficos, DLS e de dinâmica molecular (Salvador et al., 2013; Salvador et al., 2015).

Estudos funcionais revelaram que a suramina bloqueou aproximadamente 85% da paralisia muscular induzida pela MjTX-II, quando comparado à MjTX-II sem qualquer inibidor.

A MjTX-II se apresenta como dímero, assim como a maioria das Lys49-PLA2s, mas quando em meio ácido (pH 5.6), ainda como dímero pois não houve variação do raio hidrodinâmico, apresentou menor polidispersidade nos experimentos de espalhamento dinâmico de luz (DLS) que em meio básico (pH 8.0) (Pd=9.5% e 13.9%, respectivamente). Entretanto, quando a proteína foi incubada com suramina, apresentou-se predominantemente na forma tetramérica apesar da maior polidispersidade (Pd=14.5%).

A elucidação da estrutura cristalográfica do complexo MjTX-II/suramina mostrou que há dois monômeros da MjTX-II na unidade assimétrica, formando um dímero e 2 moléculas de suramina ligadas a ambos monômeros em uma forma simétrica. Os contatos do ligante com a proteína ocorrem nas regiões do seu C- e N-terminais (Lys7, Leu10, Asn114, Lys116, Tyr119, Tyr121 e Phe126) (Fig. 22).

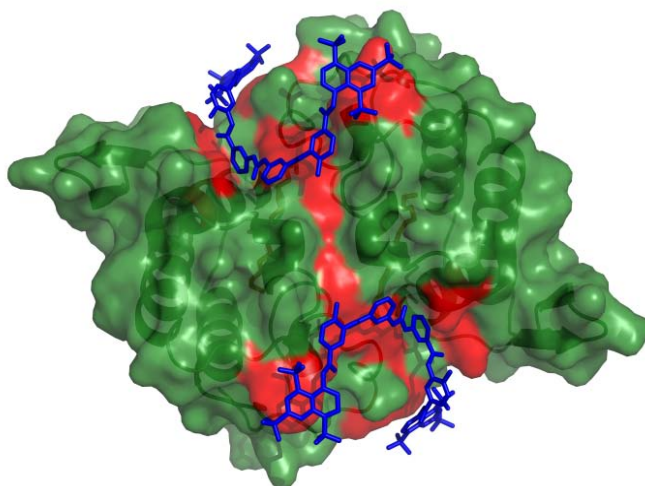


Figura 22. Estrutura cristalográfica da MjTX-II complexada com suramina. Superfície do dímero alternativo (verde) mostrando os aminoácidos Lys7, Leu10, Asn114, Lys116, Tyr119, Tyr121 e Phe126 (superfície em vermelho), que interagem com as moléculas de suramina (moléculas em azul).

Foi observado no *software* PISA (Krissinel & Henrick, 2007) que o dímero alternativo apresentou maior probabilidade de ocorrência e por isso essa conformação estrutural foi usada no refinamento cristalográfico. Baseando-se na conformação estrutural dimérica complexada à suramina, foi possível inferir pela inspeção da cela unitária cristalina que é possível a formação de oligômeros de maior ordem, sendo a com maior probabilidade de ocorrência a que apresenta a conformação de dímero alternativo entre dois dímeros convencionais (Salvador et al., 2013; Salvador et al., 2015), formando um tetrâmero similar ao apresentado na estrutura do complexo BthTX-I/Ácido chicórico (seção 2.6.1).

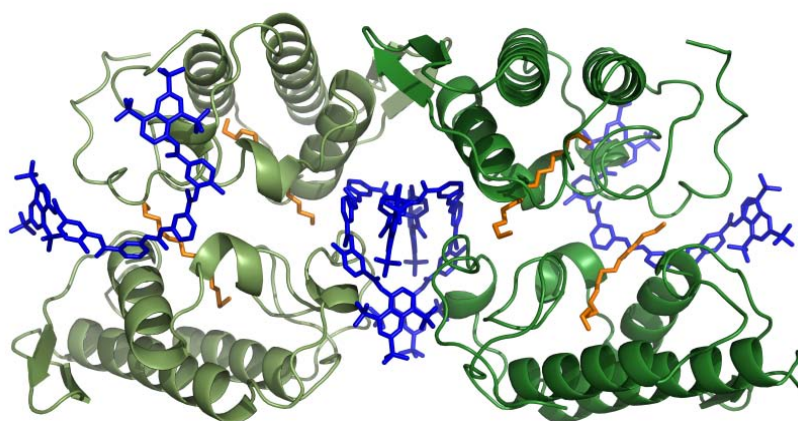


Figura 23. Formação tetramérica do complexo MjTX-II com suramina formada por dois dímeros na unidade assimétrica. Conformação oligomérica sugerida pelo software PISA, sendo observados dímeros alternativos de MjTX-II (dímeros com a mesma tonalidade de verde), dímeros convencionais (dímero formado por um monômero verde escuro e outro verde claro na parte superior do tetrâmero), suramina (azul) e moléculas de PEG4K (laranja).

Entretanto, os experimentos estruturais apresentam condições de realização diferentes das apresentadas em solução e como os experimentos de DLS apresentaram alta polidispersidade, eram necessários novos ensaios. Assim, visando obter informações estruturais adicionais, bem como obter dados de afinidade do complexo, foram realizados experimentos de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) com suramina e MjTX-II.

O ensaio calorimétrico resultou em um termograma com comportamento bifásico, com reações endotérmica, evidenciado nas primeiras e nas últimas injeções, e exotérmico, presente na metade da titulação (Fig. 24).

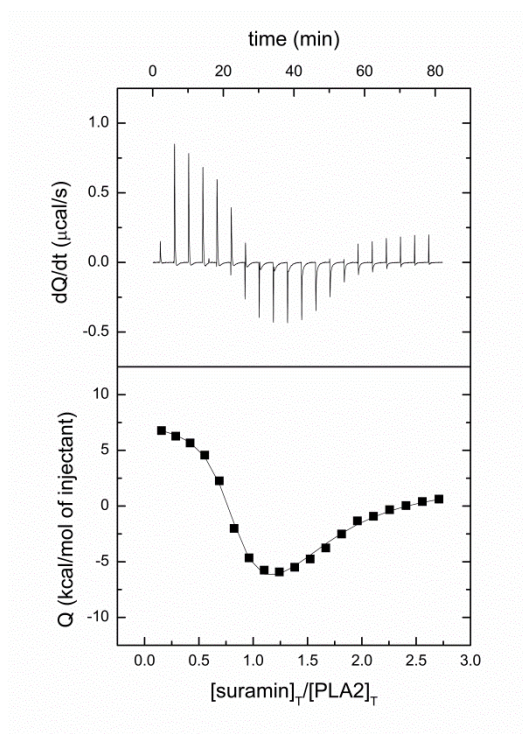


Figura 24. Titulação calorimétrica isotérmica de suramina em MjTX-II. (Painel superior) Termograma (potência aplicada pelo equipamento para manter ambas as células à mesma temperatura em função do tempo) da titulação de MjTX-II (45 μ M) com suramina (600 μ M) à 25 °C utilizando-se tampão bicarbonato de amônio (50 mM), pH 8,0. (Painel inferior) Isotherma de ligação (calor normalizado pela concentração de titulante em função da razão molar de suramina pela de MjTX-II) da titulação.

Esse comportamento é característico de interações com pelo menos dois eventos distintos de ligação com diferentes entalpias e constantes de dissociação (Freyer & Lewis, 2008) e apresenta um grande desafio no ajuste de dados, uma vez que não foi possível utilizando-se os modelos padrões de ligação disponíveis no *software* fornecido pelo fabricante (*add-on* do *software* Origin). Mesmo em outros *softwares* disponíveis (Nitpic (Keller et al., 2012; Scheuermann & Brautigam, 2015) e Sedphat (Houtman et al., 2007)) o ajuste também não foi satisfatório. Por isso, os dados foram modelados utilizando-se polinômios de ligação (Freire et al., 2009), utilizando-se um modelo geral de ligação com 2 eventos de ligação o qual gerou as constantes de associação geral (β_1 e β_2) e entalpias de ligação (ΔH_1 e ΔH_2) e por regressão não linear foram estimados os parâmetros específicos de ligação (k_{d1} , k_{d2} , Δh_1 e Δh_2) (Tabela 4).

Tabela 4. Valores termodinâmicos para a ligação da suramina à MjTX-II. Resultados obtidos por calorimetria de titulação isotérmica (ITC) pela realização da titulação de suramina (600 μ M) em MjTX-II (45 μ M) à 25 °C diluídos em tampão bicarbonato de amônio (50 mM), pH 8,0.

Constantes de dissociação e entalpias específicas da ligação	
k_{d1} (μ M)	0,6 $\pm$ 0,1
Δh_1 (kcal/mol)	5,2 $\pm$ 0,2
k_{d2} (μ M)	6,2 $\pm$ 1,2
Δh_2 (kcal/mol)	-18,2 $\pm$ 0,6
Parâmetros gerais de ligação determinados por regressão não linear	
β_1 (M^{-1})	(3,1 $\pm$ 0,5) $\times 10^6$
ΔH_1 (kcal/mol)	5,2 $\pm$ 0,3
β_2 (M^{-2})	(2,5 $\pm$ 0,4) $\times 10^{11}$
ΔH_2 (kcal/mol)	-13,0 $\pm$ 0,3
α	0,10 $\pm$ 0,03
Δh (kcal/mol)	-23,4 $\pm$ 0,4
n_H	0,5 $\pm$ 0,2

K_{d1} , K_{d2} , Δh_1 , e Δh_2 são as constantes de dissociação e variação de entalpia intrínsecas para a ligação do primeiro e segundo eventos. β_1 e β_2 são as constantes gerais de associação para o primeiro e segundo eventos. ΔH_1 e ΔH_2 são as entalpias gerais para o primeiro e segundo evento de ligação. α , Δh e n_H são a constante de cooperatividade de interação, entalpia de cooperatividade e coeficiente de Hill, respectivamente.

Como as afinidades dos diferentes eventos de ligação eram diferentes, foi verificado se havia cooperatividade (Brown, 2009) entre eles através da constante de cooperatividade (α), calculada através da equação

$$\alpha = 4\beta_2/(\beta_1)^2 \quad (28)$$

enquanto o coeficiente de Hill foi calculado pela equação

$$n_H = 2/(1 + \alpha^{-\frac{1}{2}}) \quad (29)$$

Com base no fator de cooperatividade (α) e no coeficiente de Hill (n_H), foi verificado que ou o dímero apresentava dois sítios de ligação não idênticos ou sítios de ligação iguais com cooperatividade negativa (Freire et al., 2009). Pela simetria apresentada pela proteína na estrutura cristalográfica, os sítios não podem ser diferentes, e, por isso, foi inferido que a ligação MjTX-II/suramina apresenta dois sítios de ligação idênticos com cooperatividade negativa. Com base nisso, pode-se atribuir o primeiro evento de ligação, com afinidade submicromolar (k_{d1} =0,6 $\pm$ 0,1 μ M) e comportamento entropicamente guiado ($\Delta H > 0$, $-T \cdot \Delta S < 0$) à ligação de ambas as moléculas de suramina no dímero de MjTX-II. Esse tipo de ligação, guiada

entropicamente, é proveniente do tipo de interação resultante da ligação, predominantemente hidrofóbica entre a MjTX-II e a suramina (Fig. 25), e a penalidade entálpica é ligada à entalpia de solvatação da proteína (Kawasaki & Freire, 2011). Por isso, a afinidade moderada-alta das moléculas de suramina pelo dímero de MjTX-II se deve à complementaridade de forma entre os compostos, uma vez que as ligações hidrofóbicas são predominantes frente às ligações de hidrogênio e *van der Waals*.

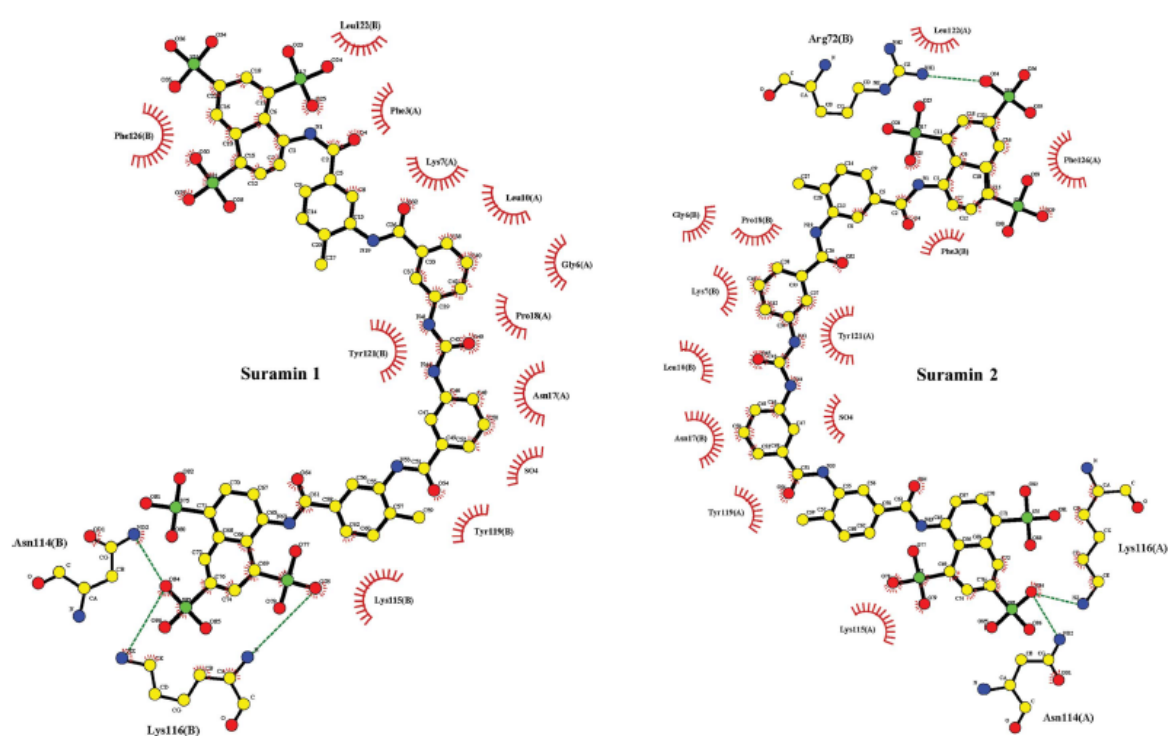


Figura 25. Interação das moléculas de suramina com a estrutura cristalográfica da MjTX-II. As moléculas da esquerda e direita representam as moléculas ligadas nos diferentes monômeros, sendo os contatos polares representados pelas linhas tracejadas e os contatos hidrofóbicos pelas arcos irradiando raios (em vermelho). Figura desenhada utilizando-se o Ligplot (Wallace et al., 1995).

O segundo evento de ligação, atribuído à oligomerização do complexo MjTX-II/suramina apresentou constante de dissociação aproximadamente 10 vezes maior ($k_{d2}=6.2\pm1.2 \mu\text{M}$), por isso, menor afinidade que no primeiro evento de ligação, entretanto apresentou variação de entalpia favorável ($\Delta H < 0$). Esse comportamento se deve às ligações polares provenientes da interação entre os dímeros complexados à suramina, e principalmente à menor entalpia de solvatação relativa à oligomerização quando comparada à ligação MjTX-II-suramina.

Com base no exposto, foi verificado que a suramina apresenta afinidade média-alta para o dímero de MjTX-II, principalmente devido à complementaridade de forma, o que ficou evidente pelo tipo de ligação apresentado ($\Delta H > 0$). Entretanto, a afinidade calculada a coloca na ordem

de grandeza de afinidade de drogas obtidas nos estágios iniciais de *screening* de larga escala (*high-throughput screening*) (Freire, 2004).

A otimização da afinidade de formação do complexo através de alterações de grupos químicos da molécula de suramina e a verificação dos parâmetros termodinâmicos associados à essas alterações seria muito mais complicado, principalmente devido ao tamanho da molécula de suramina, os diferentes graus de liberdade que ela apresenta e dificilmente ela chegaria aos níveis de energia livre necessários para ser considerado um excelente inibidor, com uma alta especificidade e seletividade.

Entretanto, o sistema MjTX-II/suramina apresentou interessantes pontos, como por exemplo, o tipo de termograma resultante da titulação, que demandou uma análise mais aprofundada que a realizada na maioria dos casos nos quais se utilizam modelos já implementados no software Origin, fornecido pelo fabricante do equipamento.

Outro fato, verificado pela estrutura cristalográfica, foi que a suramina se liga à MjTX-II simultaneamente ao MDoS (classe III de inibidores (dos Santos et al., 2009; Fernandes et al., 2014)) e também ao MDiS, sendo a suramina o primeiro composto reportado que apresenta essa forma de inibição (Salvador et al., 2015).

Através dos estudos calorimétricos ainda foi inferido que ocorre tetramerização em solução, que auxiliaria ainda mais na inibição uma vez que esconde os sítios de ancoragem (MDoS) e disrupção (MDiS) da membrana na interface do tetrâmero (Salvador et al., 2015).

Como a ligação suramina à MjTX-II apresentou-se um inibidor eficaz e demonstrou uma grande convergência com os dados apresentados na literatura e com os modelos de interação propostos anteriormente por nosso grupo de pesquisa, ele será utilizado posteriormente nos estudos calorimétricos da MjTX-II com membranas modelo.

2.6.5. Análise termodinâmica da interação entre crotoxina A e B

O maior desafio de se trabalhar com crotoxina é em relação à elucidação da estrutura do complexo heterodimérico. Apesar de ter sido a primeira toxina cristalizada (Slotta & Fraenkel-Conrat, 1938), diversas tentativas de elucidar sua estrutura não tiveram sucesso. Isso ocorre devido à mistura de isoformas presentes no veneno, que tem seus pontos isoelétricos variando entre 4,9 e 5,2, (Faure & Bon, 1987). As diferentes isoformas apresentam distintas propriedades fármaco-biológicas e as propriedades relacionadas à toxicidade parecem estar relacionadas com a estabilidade dos complexos CA-CB (Faure et al., 1993; Faure et al., 2011).

Com o intuito de desvendar a estrutura cristalográfica da crotoxina B, Marchi-Salvador et al., (2008) resolveram uma estrutura após obter cristais a partir de uma amostra contendo um

pool de isoformas de CB presentes na alíquota de veneno, sem isolamento de uma isoforma específica. A toxina cristalizou apresentando 4 monômeros em sua unidade assimétrica, formando dois dímeros de CB cada um deles formado pelas isoformas CBc e CBa₂. Posteriormente, Faure e colaboradores (2011), após purificar e isolar diversas isoformas da CA e CB, testaram diversas combinações destas moléculas e obtiveram cristais apenas de uma destas combinações. Assim, obtiveram um heterodímero formado pelas isoformas CA₂ e CBb. Neste estudo, Faure e colaboradores (2001) apresentaram a primeira estrutura da CA em alta resolução e foram determinados os resíduos fundamentais para a interação e estabilidade do complexo CA/CB.

É sabido que a CA apresenta algumas funções específicas como: (i) participar, junto com a CB, na ligação da crotoxina ao seu possível receptor na junção neuromuscular, formando um complexo com posterior liberação da CA (Delot & Bom, 1993; Faure et al., 2003; Krizaj et al., 1996; Krizaj et al., 1997); (ii) prevenir a formação do dímero reativo de CB (Radvanyi & Bon, 1982) e (iii) diminuir a adsorção de CB à membranas fosfolipídicas (Hawgood & Bon, 1991) (Faure et al., 2011). Por isso, informações sobre o processo de associação de CA/CB para formação do heterodímero da crotoxina são muito importantes para poder determinar um mecanismo de ação da toxina.

Fernandes e colaboradores mostraram que em diferentes lotes de veneno bruto não havia CB livre, mas apenas CB complexada à CA, sendo que o mesmo comportamento havia sido verificado em alíquotas purificadas de crotoxina (Fernandes et al., submetido). Entretanto, haviam verificado que quando o heterodímero da CTX era dissociado por cromatografia de fase reversa, as frações de CA se comportavam como monômeros e as de CB como tetrâmeros, como verificado anteriormente por Marchi-Salvador e colaboradores (2008). E que, quando a crotoxina era reconstituída pelas frações de CA e CB, a atividade enzimática da CTX era a mesma da apresentada pela obtida do veneno bruto (Fernandes et al., submetido) e provar para uma técnica alternativa as características obtidas por DLS.

Além das evidências mostradas por DLS que a CA é capaz de dissociar os tetrâmeros de CB presentes em solução, foram realizados experimentos calorimétricos buscando determinar a afinidade entre as diversas isoformas de CA e CB presentes na amostra de veneno purificado (Fernandes et al., submetido).

Na titulação calorimétrica isotérmica realizada foi obtido um termograma que apresentava apenas um comportamento geral exotérmico (Fig. 26, painel superior). O cálculo da área de cada pico foi realizado através do software Nitpic (Keller et al., 2012), em função do ruído de alta frequência apresentado principalmente nas injeções 5-8. Com base nos resultados

apresentados, que geraram a isoterma de ligação (Fig. 26, painel inferior), assim como proposto anteriormente por Darby e colaboradores (2016), foi verificado que haviam 2 processos diferentes ocorrendo. Eles podem ser verificados na isoterma de ligação em função da razão molar, antes da razão molar de 0,5 e após a razão molar de 0,5, uma vez que é evidente pelo aumento do calor liberado durante as primeiras injeções (2-5) e sua subsequente diminuição (injeções 5-11) até valores constantes (injeções 12-20). Esse tipo de processo é característico de alosterismo, cooperatividade ou alterações conformacionais (Zhou et al., 2008; Freiburger et al., 2015).

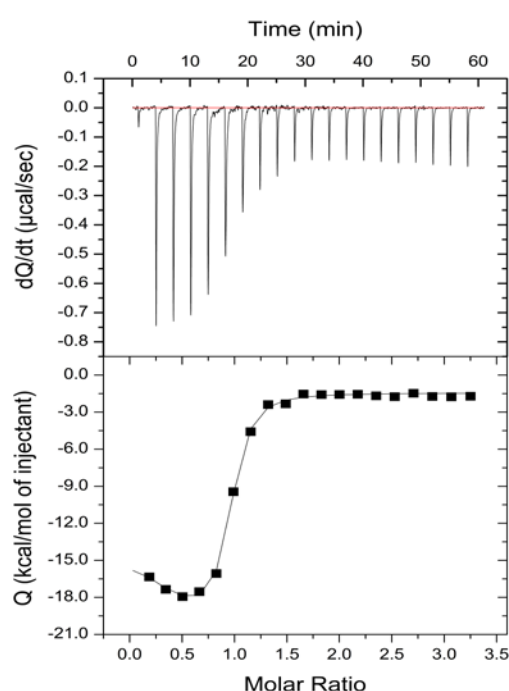


Figura 26. Titulação calorimétrica isotérmica de crotoxina A (CA) em crotoxina B (CB). (Painel superior) Termograma (potência aplicada pelo equipamento para manter ambas as células à mesma temperatura em função do tempo) da titulação de CB (15 µM, célula de reação) com CA (240 µM, pipeta) à 25 °C utilizando-se tampão formato de amônio (50 mM), pH 6,55. (Painel inferior) Isotherma de ligação (calor normalizado pela concentração de titulante em função da razão molar de CA pela de CB) da titulação.

Baseando-se nos dados de DLS que mostraram que isoformas de CA são capazes de dissociar tetrâmeros de CB, foi realizada nos dados obtidos por ITC uma análise de sítios cooperativos. Essa análise considera que a dissociação dos tetrâmeros de CB influi na termodinâmica de formação dos heterodímeros de CA-CB.

Para aplicar um modelo de ligação à isoterma obtida no experimento de ITC, esses processos foram diferenciados como sendo a dissociação dos tetrâmeros de CB induzida pelos monômeros de CA, e pela consequente formação do heterodímero de crotoxina, ou seja, ligação

CA-CB. Apesar de diferentes isoformas de CA e CB que podem estar presentes na solução, essas, em momento algum da análise dos dados de ITC foram levadas em consideração. Todas as etapas do processo de análise foram realizadas assumindo-se que haviam apenas tetrâmeros de CB, monômeros de CA e heterodímeros CA-CB. Caso fossem levadas em consideração as possíveis isoformas de CA e CB presentes na amostra, e considerando que elas podem se estabilizar fazendo ligações químicas distintas, ficaria inviável a aplicação de um modelo de ligação que contemplasse esses eventos em virtude da complexidade matemática.

Levando-se em consideração essa simplificação, uma forte evidência que corrobora o modelo de ajuste aplicado à isoterma de ligação, são os valores $\text{dof}^2/\text{graus de liberdade}$, que foram aproximadamente 10 vezes menores para o modelo que contempla cooperatividade em relação ao que se baseia numa interação de evento único com estequiometria 1:1.

Aplicando o modelo de ajuste escolhido, foram obtidas as constantes termodinâmicas de ambos os eventos de ligação (Tabela 5) e a isoterma apresentada (Fig. 26, painel inferior).

Tabela 5. Parâmetros termodinâmicos obtidos na titulação de crotoxina A (CA, 240 μM , pipeta) em crotoxina B (CB, 15 μM , célula de reação) diluídos em tampão formato de amônio (50 mM) pH 6.55 à 25 °C.

	1º Evento	2º Evento
$k_d(\mu\text{M})$	0,11 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,01
ΔH (kcal/mol)	10,52 $\pm$ 0,59	-26,03 $\pm$ 0,23
$-T\Delta S$ (kcal/mol)	-19,98	16,70

Apesar dos dados calorimétricos não conterem nenhuma informação estrutural e, em alguns casos ser difícil especificar um modelo a ser usado quando há alosterismo ou alterações estruturais (Bjelic & Jelesarov, 2008; Freiburger et al., 2009; Freiburger et al., 2015), a metodologia pode ser aplicada em sistemas que apresentem estes tipos de interação (Ghai et al., 2012; Falconer et al., 2016; Freiburger et al., 2015).

O modelo de ajuste aplicado resultou em um primeiro evento entálpicamente desfavorável ($\Delta H = 10,52 \pm 0,59$ kcal/mol), mas entropicamente guiado ($-T\Delta S = -19,98$ kcal/mol) e possui afinidade da ordem de submicromolar ($k_{d1} = 0,11 \pm 0,01$ μM). O segundo evento apresentou afinidade semelhante ($k_{d2} = 0,16 \pm 0,01$ μM), mas comportamentos entálpicos e entrópicos contrários em relação ao primeiro evento ($\Delta H = -26,03 \pm 0,23$ kcal/mol e $-T\Delta S = 16,70$ kcal/mol). Apesar dos parâmetros entálpicos e entrópicos serem dependentes de um grande número de contribuições (Olsson et al., 2008), nossa hipótese é que a principal componente entrópica do primeiro evento de ligação seja de entropia conformacional, que é

favorável devido ao aumento de conformações acessíveis (Velazquez-Campoy & Freire, 2005; Kawasaki & Freire, 2011) devido à dissociação do tetrâmero de CB e também da CA, que apresenta alta mobilidade estrutural (Faure et al., 2011). Em relação ao segundo evento, os parâmetros podem ser explicados pela formação de interações polares no heterodímero CA-CB e a variação de entropia pelo grau de estruturação do sistema (diminuição dos graus de liberdade das moléculas).

Com isso, podemos destacar o papel fundamental da CA em dissociar um possível oligômero de CB além de evidenciar a capacidade de formação do heterodímero CA-CB com afinidade moderada-alta entre ambos monômeros.

3. Conclusões

Os resultados demonstrados neste trabalho evidenciam a importância da metodologia de calorimetria de titulação isotérmica na obtenção de informações termodinâmicas e cinéticas da interação entre macromoléculas biológicas e seus candidatos a inibidores. Além disso, mostram que a combinação dessa metodologia com outras técnicas capazes de trazer informações estruturais, como a cristalografia, é crucial para o entendimento das interações entre macromoléculas e são fundamentais para o desenvolvimento de novos fármacos.

Foi mostrado que o ácido chicórico, composto extraído e isolado de uma ampla gama de espécies vegetais, inibiu a ação miotóxica da BthTX-I *in vitro*, se ligou com afinidade da ordem de micromolar à proteína, com comportamentos entálpico e entrópico favoráveis. Entretanto, para chegar à afinidades comparáveis à fármacos já utilizados, ainda são necessárias alterações estruturais na estrutura molecular do composto, visando diminuir a energia livre de ligação com a proteína. Essa otimização deve ser realizada buscando-se ligações polares como ligações de hidrogênio, que deixem o composto com maior afinidade e especificidade à BthTX-I.

Também foi verificada a interação da BthTX-I com íons zinco, os quais apresentaram baixa afinidade, e por isso não podem ser considerados inibidores viáveis clinicamente, mas apresentaram relevante importância para a proposição de novos detalhes do mecanismo de ação das Lys49-PLA₂s.

A suramina, composto altamente carregado, é utilizada como medicamento para diversas doenças apresentou grande potencial de inibição, com afinidades da ordem de submicromolar. Também foram verificados diferentes modos de inibição, através da ligação da molécula tanto no canal hidrofóbico da MjTX-I como simultaneamente nas regiões MDoS e MDiS da MjTX-II, além de induzir oligomerização dos complexos formados. Este mecanismo de indução de oligomerização pode levar à taxas de inibição ainda maiores.

Titulando-se um *pool* de isoformas de CA, monomérica, em tetrâmeros de CB, foi obtido um termograma com dois eventos de ligação. Os eventos foram atribuídos à dissociação do tetrâmero de CB pela CA e posterior formação do complexo heterodimérico CA-CB. Ambos eventos ocorrem com afinidades da ordem de submicromolar mas apresentam comportamentos termodinâmicos diferentes. Enquanto a possível dissociação do tetrâmero de CB é um processo endotérmico e entropicamente guiado, a formação do complexo CA-CB possui comportamento inverso. Estes dados corroborarão com outros experimentos biofísicos realizados previamente.

Referências

- Achari, A.; Radvanyi, F.R.; Scott, D.; Bon, C.; Sigler, P.B. Crystals of crotoxin suitable for high resolution X-ray diffraction analysis. **J. Biol. Chem.**, v. 260, p. 9385-9387, 1985.
- Agoro, J.W. Crystalline caffeic acid derivatives and compositions and method for treating snakebite. **US Patent**. 4,124,724, 1978.
- Albulescu, I.C.; Hoolwerff, M.V.; Wolter, L.A.; Bottaro, E.; Nastruzzi, C.; Yang, S.C.; Tsay, S.-C.; Hwu, J.R.; Snijder, E.J.; Hemert, M.J.V. Suramin inhibits chikungunya virus replication through multiple mechanisms. **Antivir. Res.**, v. 121, p. 39-46, 2015.
- Alirol, E.; Lechevalier, P.; Zamatto, F.; Chappuis, F.; Alcoba, G.; Potet, J. Antivenoms for Snakebite Envenoming: What Is in the Research Pipeline? **PLoS Negl. Trop. Dis.**, 9(9):e0003896, 2015.
- Ambrosio, A.L.; Nonato, M.C.; de Araujo, H.S.; Arni, R.; Ward, R.J.; et al. A molecular mechanism for Lys49-phospholipase A₂ activity based on ligand-induced conformational change. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 7326-7335, 2005.
- Amora, D.N.; Souza, T.M.; Martins, A.M.; Barbosa, P.S.; Magalhães, M.R.; Toyama, M.H.; Fonteles, M.C.; de Menezes, D.B.; Monteiro, H.S. Effects of *Crotalus durissus collilineatus* venom in the isolated rat kidney. **Toxicon**, v. 47, p. 26-264, 2006.
- Andriao-Escarso, S.H.; Soares, A.M.; Rodrigues, V.M.; Angulo, Y.; Diaz, C.; Lomonte, B.; Gutierrez, J.M.; Giglio, J.R. . Myotoxic phospholipase A₂ in Bothrops snake venoms: Effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from Bothrops jararacussu. **Biochimie**, v. 82, p. 755-763, 2000.
- Angulo, Y.; Gutiérrez, J.M.; Soares, A.M.; Cho, W.; Lomonte, B. Myotoxic and cytolytic activities of dimeric Lys49 phospholipase A₂ homologues are reduced, but not abolished, by a pH-induced dissociation. **Toxicon**, v. 46, p. 291-296, 2005.
- Arena, G.; Pappalardo, A.; Pappalardo, S.; Gattuso, G.; Notti, A.; Parisi, M.F. et al., Complexation of biologically active amines by a water-soluble calix[5]arene. A nanocalorimetric investigation. **J. Therm. Anal. Calorim.**, v. 121, p. 1073-1079, 2015.
- Arena, G.; Gans, P.; Sgarlata, C. HypCal, a general-purpose computer program for the determination of standard reaction enthalpy and binding constant values by means of calorimetry. **Anal. Bioanal. Chem.**, p. 1-10, 2016.
- Arni, R.K.; Ward, R.J. Phospholipase A₂- a structural review. **Toxicon**, v. 34, p. 827-841, 1996.
- Arni, R.K.; Ward, R.J.; Gutiérrez, J.M.; Tulinsky, A. Structure of a calcium-independent phospholipase-like myotoxic protein from Bothrops asper venom. **Acta Crystallogr. D**, v. 51, p. 311-317, 1995.
- Arruda, E.Z.; Silva, N.M.V.; Moraes, R.A.M.; Melo, P.A. Effect of suramin on myotoxicity of some crotalid snake venoms. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, p. 723-726, 2002.
- Aung, H.T.; nikai, T.; Niwa, M.; Takaya, Y. Benzenepolycarboxylic acids with potential anti-hemorrhagic properties and structure-activity relationships. **Bioorgan. Med. Chem.**, v. 19, p. 7000-7002, 2011a.
- Aung, H.T.; Furukawa, T.; Nikai, T. et al. Contribution of cinnamic acid analogues in rosmarinic acid to inhibition of snake venom induced hemorrhage. **Bioorgan. Med. Chem.**, v. 19, p. 2392-2396, 2011b.
- Azevedo-Marques, M.M.; Hering, S.E.; Cupo, P. Acidente Crotálico. In: Cardoso, J.L.C.; França, F.O.S.; Wen, F.H.; Málaque, C.M.S.; Haddad Jr., V. (Eds), Animais Peçonhentos no Brasil Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. 2ª. Ed., Sarvier. São Paulo, p. 108-115, 2009.
- Banumathi, S.; Rajashankar, K.R.; Notzel, C.; Aleksiev, B.; Singh, T.P.; Genov, N.; Betzel, C. Structure of the neurotoxic complex vipoxin at 1.4Å resolution. **Acta Crystallogr. D**, v. 57, p. 1552-1559, 2001.
- Baranauskienė, L., Petrikaite, V., Matuliene, J., Matulis, D. Titration Calorimetry Standards and the Precision of Isothermal Titration Calorimetry Data. **Int. J. Mol. Sci.**, v.10, p. 2752-2762, 2009.

- Bernardes, N.E.; Takeda, A.A.S.; Dreyer, T.R.; Freitas, F.Z.; Bertolini, M.C.; Fontes, M.R.M. Structure of Importin- α from a Filamentous Fungus in Complex with a Classical Nuclear Localization Signal. **PLoS ONE**, 10(6): e-128687, 2015.
- Biswas, T.; Tsodikov, O. V. An easy-to-use tool for planning and modeling a calorimetric titration. **Anal. Biochem.**, v. 406, p. 91-93, 2010.
- Bjelic, S.; Jelesarov, I. A survey of the year 2007 literature on applications of isothermal titration calorimetry. **J. Mol. Recognit.**, v. 21, p. 289-311, 2008.
- Bon, C.; Bouchier, C.; Choumet, V.; Faure, G.; Jiang, M.S.; Lambezat, M.P.; Radvanyi, F.; Saliou, B. Crotoxin, half-century of investigations on a phospholipase A₂ neurotoxin. **Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.**, v. 39, p. 439-448, 1989.
- Bon, C.; Changeus, J.P.; Jeng, T.-W.; Fraenkel-Conrat, H. Postsynaptic effects of crotoxin and of its isolated subunits. **Eur. J. Biochem.**, v. 99, p. 471-481, 1979.
- Bon, C. Multicomponent neurotoxic phospholipase A₂. In: Kini, R.M. (Ed) *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism*. Wiley, Chichester, UK, p. 269-286, 1997.
- Borges, R.C.; Araujo, A.F.B. Seleção de habitat em duas espécies de jararaca (*Bothrops moojeni* Hoge e *B. neuwiedi* Wagler) (Serpentes, Viperidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 58, p. 591-601, 1998.
- Borges, R.J.; Cardoso, F.F.; Fernandes, C.A.H.; Dreyer, T.R.; de Moraes, D.S.; Floriano, R.S.; Rodrigues-Simioni, L.; Fontes, M.R.M. Functional and structural studies of a Phospholipase A₂-like complexed to zinc ions: Insights on its myotoxicity and inhibition mechanism. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1861, p. 3199-3209, 2017.
- Bouchier, C.; Boulon, J.-C.; Bon, C.; Ménez, A. Analysis of cDNAs encoding the two subunits of crotoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin from rattlesnake venom: the acidic non enzymatic subunit derives from a phospholipase A₂-like precursor. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1088, p. 401-408, 1991.
- Bozym, R.A.; Chimienti, F.; Giblin, L.J.; Gross, G.W.; Korichneva, I.; Li, Y.; Libert, S.; Maret, W.; Parviz, M.; Frederickson, C.J.; Thompson, R.B. Free zinc ions outside a narrow concentration range are toxic to a variety of cells in vitro. **Exp. Biol. Med.**, v. 235, p. 741-750, 2010.
- Brautigam, C.A.; Zhao, H.; Vargas, C.; Keller, S.; Schuck. Integration and global analysis of isothermal titration calorimetry data for studying macromolecular interactions. **Nat. Protoc.**, v. 11, p. 882-894, 2016.
- Broecker, J.; Vargas, C.; Keller, S. Revisiting the optimal c value for isothermal titration calorimetry. **Anal. Biochem.**, v. 418, p. 307-309, 2011.
- Brown, A. Analysis of Cooperativity by Isothermal Titration Calorimetry. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 10, p. 3457-3477, 2009.
- Brown, N.I. Consequences of neglect: analysis of the sub-Saharan African snake antivenom Market and the global context. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, 6: e1670, 2012.
- Burke, J.E. & Dennis, E.A. Phospholipase A₂ structure/function, mechanism and signaling. **J. Lipid Res.**, v. 50, p. S237-S242, 2009a.
- Burke, J.E. & Dennis, E.A. Phospholipase A₂ Biochemistry. **Cardiovasc. Drugs Ther.**, v. 23, p. 49-59, 2009b.
- Calvete, J.J.; Juárez, P.; Sanz, L. Snake venomomics. Strategy and applications. **J. Mass. Spectrom.**, v. 42, p. 1405-1414, 2007.
- Calvete, J.J.; Sanz, L.; Ângulo, Y.; Lomonte, B.; Gutiérrez, J.M. Venoms, venomomics, antivenomics. **FEBS Lett.**, v. 583, p. 1736-1743, 2009.
- Cardoso, J.L.C. Animais peçonhentos no Brasil: biologia clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier, 2003.
- Cardoso, J.L.C.; França, F.O.S.; Wen, F.H.; Málaque, C.M.S.; Haddas Jr., V. (Ed). Animais Peçonhentos no Brasil. Sarvier. São Paulo, 2003.

- Castro, F.R.; Farias, A.S.; Proença, P.L.; De La Hoz, C.; Langone, F.; Oliveira, E.C.; Toyama, M.H.; Marangoni, S.; Santos, L.M. The effect of treatment with crotafotin on the evolution of experimental auto-immune neuritis induced in Lewis rats. **Toxicon**, v. 49, p. 299-305, 2007.
- Cavalcante, W.L.; Campos, T.O.; Dal Pai-Silva, M.; Pereira, P.S.; Oliveira, C.Z.; Soares, A.M.; Galacci, M. Neutralization of snake venom phospholipase A₂ toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **J. Ethnopharmacol.**, v. 112, p. 490-497, 2007.
- Chaires, J.B.; Possible origin of differences between van't Hoff and calorimetric enthalpy estimates. **Biophys. Chem.**, v. 64, p. 121-126, 1997.
- Chaires, J.B. Calorimetry and Thermodynamics in Drug Design. **Annu. Rev. Biophys.**, v. 37, p. 135-151, 2008.
- Cheng, A.C. & Winkel, K. Call for global snake-bite control and procurement funding. **Lancet**, v. 357, p. 1132-1133, 2001.
- Chioato, L.; de Oliveira, A.H.C.; Ruller, R.; Sá, J.M.; Ward, R.J. Distinct sites for myotoxic and membrane-damaging activities in the C-terminal region of a Lys49-phospholipase A₂, **Biochem. J.**, v. 366, p. 971-976, 2002.
- Chuman, Y.; Nobuhisa, I.; Ogawa, T.; Deshimaru, M.; Chijiwa, T.; Tan, N.H.; Fukumaki, Y.; Shimohigashi, Y.; Ducancel, F.; Boulain, J.C.; Ménez, A.; Ohno, M. Regional and accelerated molecular evolution in group I snake venom gland phospholipase A₂ isozymes. **Toxicon**, v. 38, p. 449-462, 2000.
- Cintra, A.C.O.; Marangoni, S.; Oliveira, B.; Giglio, J.R. Bothropstoxin-I: Amino Acid Sequence and Function. **J. Protein Chem.**, v. 12, n. 1, p. 57-64, 1993.
- Cintra-Francischinelli, M.; Pizzo, P.; Rodrigues-Simioni, L.; Ponce-soto, L.A.; Rossetto, O.; Lomonte, B.; Gutiérrez, J.M.; Pozzan, T.; Montecucco, C. Calcium imaging of muscle cells treated with snake myotoxins reveals toxin synergism and presence of acceptors. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 66, p. 1718-1728, 2009.
- Cintra-Francischinelli, M.; Caccin, P.; Chiavegato, A.; Pizzo, P.; Carmignoto, Y.; Ângulo, Y. et al., Bothrops snake myotoxins induce a large efflux of ATP and potassium with spreading of cell damage and pain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 107, p. 14140-14145, 2010.
- Conte, T.C.; Franco, D.V.; Baptista, I.L.; Bueno Jr., C.R.; Selistre-de-Araújo, H.S.; Brum, P.C.; Moriscot, A.S.; Miyabara, E.H. Radicol improves regeneration of skeletal muscle previously damaged by crotoxin in mice. **Toxicon**, v. 52, p. 146-155, 2008.
- Crépin, T.; Dias, A.; Palencia, A.; Swale, C.; Cusack, S.; Ruigrok, R.W.H. Mutational and metal binding analysis of the endonuclease domain of the influenza virus polymerase PA subunit. **J. Virol.**, v. 84, p. 9096-9104, 2010.
- Darby, S.J.; Platts, L.; Daniel, M.S.; Cowieson, A.J.; Falconer, R.J. An isothermal titration calorimetry study of phytate binding to lysozyme. **J. Thermal Anal. Calorim.**, p. 1-8, 2016.
- Davies, A.M.; Teague, S.J.; Kleywegt, G.J. Application and limitations of X-ray crystallographic data in structure-based ligand and drug design. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, 42, p. 2718-2736, 2003.
- DeLano, W.L. The PyMOL molecular graphics system. 2002. Disponível em <http://www.pymol.org>.
- Delatorre, P.; Rocha, B.A.M.; Santi-Gadelha, T.; Gadelha, C.A.A.; Toyama, M.H.; Cavada, B.S. Crystal structure of Bn IV in complex with myristic acid: a Lys49 myotoxic phospholipase A₂ from *Bothrops neuwiedi* venom. **Biochimie**, v. 93, p. 513-518, 2011.
- de Barros, A.C.; Takeda, A.A.S.; Dreyer, T.R.; Velazquez-Campoy, A.; Kobe, B.; Fontes, M.R.M. Structural and Calorimetric Studies Demonstrate that Xeroderma Pigmentosum Type G (XPG) Can Be Imported to the Nucleus by a Classical Nuclear Import Pathway via a Monopartite NLS sequence. **J. Mol. Biol.**, v. 428, p. 2120-2131, 2016.
- Delot, E.; Bon, C. Differential effects of presynaptic phospholipase A₂ neurotoxins on Torpedo synaptosomes. **J. Neurochem.**, v. 58, p. 311-319, 1992.

- de Oliveira, A.H.C.; Giglio, J.R.; Andrião-Escarso, S.H.; Ito, A.S.; Ward, R.J. A pH-Induced Dissociation of the Dimeric Form of a Lysine 49-Phospholipase A₂ Abolishes Ca²⁺-Independent Membrane Damaging Activity. **Biochemistry**, v. 40, p. 6912-6920, 2001.
- de Oliveira, M.; Cavalcante, W.L.G.; Arruda, E.Z.; Melo, P.A.; Silva, M.D.-P.; Gallaci, M. Antagonism of myotoxic and paralyzing activities of bothrotoxin-I by suramin. **Toxicon**, v. 42, p. 373-379, 2003.
- de Oliveira, R.C.W. Animais Peçonhentos do Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Evenenamentos. São Paulo, Sarvier, p. 550, 2009.
- Deshimaru, M.; Ogawa, T.; Nakashima, K.; Nobuhisa, I.; Chijiwa, T.; Shimohigashi, Y.; Fukumaki, Y.; Niwa, M.; Yamashina, I.; Hattori, S.; Ohno, M. Accelerated evolution of Crotaline snake venom gland serine proteases. **FEBS Lett.**, v. 397, 83-88, 1996.
- Dhawan, D.K.; Chadha, V.D. Zinc: a promising agent in dietary chemoprevention of cancer. **Indian J. Med. Res.**, v. 132, p. 676-682, 2010.
- dos Santos, J.I.; Fernandes, C.A.; Magro, A.J.; Fontes, M.R.M. The intriguing phospholipases A₂ homologues: relevant structural features on myotoxicity and catalytic inactivity. **Protein Pept. Lett.**, v. 16, p. 887-893, 2009.
- dos Santos, J.I.; Soares, A.M.; Fontes, M.R.M. Comparative structural studies on Lys49-phospholipases A₂ from *Bothrops* genus reveal their myotoxic site. **J. Struct. Biol.**, v. 167, p. 106-116, 2009b.
- dos Santos, J.I.; Cardoso, F.F.; Soares, A.M.; Silva, M.d.P.; Gallacci, M.; Fontes, M.R.M. Structural and Functional Studies of a Bothropic Myotoxin Complexed to Rosmarinic Acid: New Insights into Lys49-PLA₂ Inhibition. **PLoS ONE**, 6(12): e28521, 2011.
- Doley, R.; Zhou, X.; Kini, R.M. Snake Venom Phospholipase A₂ Enzymes. In: Mackessy, S.P. (Ed.) Venoms and Toxins of Reptiles, CRC Press, 2010.
- Doyle, M. L. Characterization of binding interactions by isothermal titration calorimetry. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 8, p. 31-35, 1997.
- Edwards, S.H.; Thompson, D.; Baker, S.F.; Wood, S.P.; Wilton, D.C. The crystal structure of the H48Q active site mutant group IIA secreted phospholipase A₂ at 1.5Å resolution provides an insight into the catalytic mechanism. **Biochemistry**, v. 41, p. 15468-15476, 2002.
- Englebiene, P.; Hoonacker, A.V.; Verhas, M. Surface Plasmon resonance: principles, methods and applications in biomedical sciences. **J. Spectrosc.**, v. 17, p. 255-273, 2003.
- Falconer, R.J. Applications of isothermal titration calorimetry – the research and technical developments from 2011 to 2015. **J. Mol. Recognit.**, v. 29, p. 504-515, 2016.
- Fairlamb, A.H. Chemotherapy of human African trypanosomiasis: current and future prospects. **Trends Parasitol.**, v. 19, p. 488-494, 2003.
- Fathi, B.; Harvey, A.L.; Edward, G.R. Suramin inhibits the early effects of PLA₂ neurotoxins at mouse neuromuscular junctions: A twitch tension study. **J. Venom Res.**, v. 2, p. 6-10, 2011.
- Faure, G.; Bon, C. Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v. 25, p. 229-234, 1987.
- Faure, G.; Bon, C. Crotoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*: purification of several isoforms and comparison of their molecular structure and of their biological activities. **Biochemistry**, v. 27, p. 730-738, 1988.
- Faure, G.; Choumet, V.; Bouchier, C.; Camoin, L.; Guillaume, J.L.; Montegier, B.; Viulhorgne, M.; Bon, C. The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Eur. J. Biochem.**, v. 223, p. 161-164, 1994.
- Faure, G.; Copic, A.; Le Porrier, S.; Gubensek, F.; Bon, C.; Krizaj, I. Crotoxin acceptor protein isolated from *Torpedo electric organ*: binding properties to crotoxin by surface plasmon resonance. **Toxicon**, v. 41, p. 509-517, 2003.

- Faure, G.; Guillaume, J.L.; Camoin, L.; Saliou, B.; Bon, C. Mutliplicity of acidic subunit isoforms of crotoxin, the phospholipase A₂ neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom, results from posttranslational modifications. **Biochemistry**, v. 30, p. 8074-8083, 1991.
- Faure, G.; Harvey, A.L.; Thomson, E.; Saliou, B.; radvanyi, F.; Bon, C. Comparison of crotoxin isoforms reveals that stability of the complex plays a major role in its pharmacological action. **Eur. J. Biochem.**, v. 214, p. 491-496, 1993.
- Faure, G.; Saul, F. Crystallographic characterization of functional sites of crotoxin and ammodytoxin, potent β -neurotoxins from Viperidae venom. **Toxicon**, v. 60, p. 531-538, 2012.
- Faure, G.; Xu, H.; Saul, F.A. Crystal Structure of Crotoxin Reveals Key Residues Involved in the Stability and Toxicity of This Potent Heterodimeric β -Neurotoxin. **J. Mol. Biol.**, v. 412, p. 176-191, 2011.
- Fernandes, C.A.H.; Borges, R.J.; Lomonte, B.; Fontes, M.R.M. A structure-based proposal for a comprehensive myotoxic mechanism of phospholipase A₂-like proteins from viperid snake venoms. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1844, p. 2265-2276, 2014.
- Fernandes, C.A.H.; Comparetti, E.J.; Borges, R.J.; Huancahuire-Vega, S.; Ponce-Soto, L.A.; Marangoni, S.; Soares, A.M.; Fontes, M.R.M. Structural bases for a complete myotoxic mechanism: Crystal structures of two non-catalytic phospholipases A₂-like from *Bothrops brazili* venom. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1834, p. 2772-2781, 2013.
- Fernandes, C.A.H.; Cardoso, F.F.; Cavalcante, W.G.L.; Soares, A.M.; DalPai, M.; Gallacci, M.; Fontes, M.R.M. Structural Basis for the Inhibition of a Phospholipase A₂-Like Toxin by Caffeic and Aristolochic Acids. **PLoS ONE**, 10(7): e0133370, 2015.
- Fernandes, C.A.; Marchi-Salvador, D.P. Salvador, G.M.; Silva, M.C.; Costa, T.R.; Soares, A.M.; Fontes, M.R.M. Comparison between apo and complexed structures of bothropstoxin-I reveals the role of Lys122 and Ca²⁺-binding loop region for the catalytically inactive Lys49-PLA₂s. **J. Struct. Biol.**, v. 171, p. 31-43, 2010.
- Fernández, J.; Caccin, P.; Koster, G.; Lomonte, B.; Gutiérrez, J.M.; Montecucco, C.; Muscle phospholipid hydrolysis by *Bothrops asper* Asp49 and Lys49 phospholipase A₂ myotoxins - distinct mechanisms of action. **FEBS J.**, v. 280, p. 3878-3886, 2013.
- Fisher, H.F. & Singh, N. Calorimetric methods for interpreting protein-ligand interactions. **Methods Enzymol.**, v. 259, p. 194-221, 1995.
- Freiburger, L.; Auclair, K.; Mittermaier, A.K. Elucidating protein binding mechanisms by variable-c ITC. **Chem. Bio. Chem.**, v. 10, p. 2871-2873, 2009.
- Freiburger, L.; Auclair, K.; Mittermaier, A. Global ITC fitting methods in studies of protein allostery. **Methods**, v. 76, p. 149-161, 2015.
- Freire, E. Isothermal titration calorimetry: controlling binding forces in lead optimization. **Drug Discov. Today Technol.**, v. 1, p. 295-299, 2004.
- Freire, E. A Thermodynamic Guide to Affinity Optimization of Drug Candidates. In: Proteomics and Protein-Protein Interactions: Biology, Chemistry, Bioinformatics, and Drug Design. Waksman Ed. 2005.
- Freire, E. Do enthalpy and entropy distinguish first in class from best in class? **Drug Discov. Today**, v. 13, p. 869-874, 2008.
- Freire, E. A Thermodynamic Approach to the Affinity Optimization of Drug Candidates. **Chem. Biol. Drug. Des.**, v. 74, p. 468-472, 2009.
- Freire, E.; Mayorga, O.L.; Straume, M. Isothermal Titration Calorimetry. **Anal. Chem.**, v. 62, n. 18, p. 950-958, 1990.
- Freire, E.; Schön, A.; Velazquez-Campoy, A. Isothermal Titration Calorimetry: General Formalism Using Binding Polynomials. **Methods Enzymol.**, v. 455, p. 127-155, 2009.

- Freitas, T.V.; Fortes-Dias, C.L.; Diniz, C.R. Protection against the lethal effects of *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom in animals immunized with crotoxin. **Toxicon**, v. 28, p. 207-213, 1990.
- Freyer, M.W.; Lewis, E.A. Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions. **Methods Cell Biol.**, v. 84, p. 79-113, 2008.
- Fry, B.G. & Wüster, W. Assembling an arsenal: origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analyses of toxin sequences. **Mol. Biol. Evol.**, v. 21, p. 870-883, 2004.
- Funk, C.D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science**, v. 294, p. 1871-1875, 2001.
- Gallacci, M.; Cavalcante, W.L. Understanding the in vitro neuromuscular activity of snake venom Lys49 phospholipase A₂ homologues. **Toxicon**, v. 55, p. 1-11, 2010.
- Ghai, R.; Falconer, R.J.; Collins, B.M. Applications of isothermal titration calorimetry in pure and applied research – survey of the literature from 2010. **J. Mol. Recog.**, v. 25, p. 32-52, 2012.
- Grattan, B.J.; Freake, H.C. Zinc and cancer: implications for LIV-1 in breast cancer. **Nutrients**, v. 4, p. 648-675, 2012.
- Grecu, D.; Irudayaraj, V.P.R.; Martinez-Sanz, J.; Mallet, J.M.; Assairi, L. A chirality change in XPC- and Sfi1-derived peptides affects their affinity for centrin. **Peptides**, v. 78, p. 77-86, 2016.
- Grüner, S.; Neeb, M.; Barandun, L.J.; Sielaff, F.; Hohn, C.; Kojima, S.; Steinmetzer, T.; Diederich, F.; Klebe, G. Impact of protein and ligand impurities on ITC-derived protein-ligand thermodynamics. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1840, p. 2843-2850, 2014.
- Gutiérrez, J.M.; Lomonte, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, p. 1405-1424, 1995.
- Gutiérrez, J.M.; Lomonte, B. Phospholipases A₂: Unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. **Toxicon**, v. 62, p. 27-39, 2013.
- Gutiérrez, J.M.; Ownby, C.I. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**, v. 42, p. 915-931, 2003.
- Gutiérrez, J.M.; Theakston, R.D.G.; Warrell, D.A. Confronting the Neglected Problem of Snake Bite Envenoming: The Need for a Global Partnership. **PLoS Med.**, 3(6):e150, 2006.
- Gutiérrez et al., The need for full integration of snakebite envenoming with a global strategy to combat the Neglected Tropical Diseases: the way forward. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, 7(6): e2162, 2013.
- Gutiérrez et al., Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon**, v. 36, p. 1529-1539, 1998.
- Gutiérrez, J.M.; Ponce-Soto, L.A.; Marangoni, S.; Lomonte, B. Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipase A₂: comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA₂ homologue. **Toxicon**, v. 51, p. 80-92, 2008.
- Gutierrez, V.P.; Konno, K.; Chacur, M.; Sampaio, S.C.; Picolo, G.; Brigatte, P.; Zambelli, V.O.; Cury, Y. Crotalphine induces potent antinociception in neuropathic pain by acting at peripheral opioid receptors. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 594, p. 84-92, 2008.
- Habib, A.G.; Kuznik, A.; Hamza, M.; Abdullahi, M.I.; Chedi, B.A.; Chippaux, J.-P.; Warrell, D.A. Snakebite is Under Appreciated: Appraisal of Burden from West Africa. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, 9(9):0004088, 2015.
- Hawgood, B.; Bon, C. Snake venom presynaptic toxins. In Handbook of Natural Toxins, Reptile and Amphibian Venoms. Tu, A.T. (Ed), p 3-52, Marcel Dekker, New York, NY, 1991.
- Hawking, F. Suramin: With Special Reference to Onchocerciasis. **Adv. Pharmacol. Chemother.**, v. 15, p. 289-322, 1978.

- Heluany, N.F.; Homsí-Brandeburgo, M.I.; Giglio, J.R.; Prado-Franceschi, J.; Rodrigues-Simioni, L. Effects induced by bothropstoxin, a component from *Bothrops jararacussu* snake venom, on mouse and chick muscle preparations. **Toxicon**, v. 30, p. 1203-1210, 1992.
- Henry, C.M. Structure-based drug design. **Chem. Eng. News**, v. 79, p. 69-74, 2001.
- Hernández, M.; Scannone, H.; Finol, H.J.; Pineda, M.E.; Fernández, I.; Vargas, A.M.; Girón, M.E.; Aguilar, I.; Rodríguez-Acosta, A. Alterations in the ultrastructure of cardiac autonomic nervous system triggered by crotoxin from rattlesnake (*Crotalus durissus cumanensis*) venom. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v. 59, p. 129-137, 2007.
- Hernandez-Oliveira, S.; Toyama, M.H.; Toyama, D.O.; Marangoni, S.; Hyslop, S.; Rodrigues-Simioni, L. Biochemical, pharmacological and structural characterization of a new PLA₂ from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom. **Protein J.**, v. 24, p. 233-242, 2005.
- Homsí-Brandeburgo, M.I.; Queiroz, L.S.; Santo-Neto, H.; Rodrigues-Simioni, L.; Giglio, J.R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: Partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, v. 26, n. 7, p. 615-627, 1988.
- Horn, J.R.; Brandts, J.F.; Murphy, K.P. Van't Hoff and calorimetric enthalpies: II. Effects of linked equilibria. **Biochemistry**, v. 41, p. 7501-7507, 2002.
- Hosang, M. Suramin binds to platelet-derived growth factor and inhibits its biological activity. **J. Cell. Biochem.**, v. 29, p. 265-273, 1985.
- Houtman, J.C.D.; Brown, P.H.; Bowden, B.; Yamaguchi, H.; Appella, E.; Samelson, L.E.; Schuck, P. Studying multisite binary and ternary protein interactions by global analysis of isothermal titration calorimetry data in SEDPHAT: Application to adaptor protein complexes in cell signaling. **Protein Sci.**, v. 16, p. 30-42, 2007.
- Indyk, L. & Fisher, H.F. Theoretical aspects of isothermal titration calorimetry. **Methods Enzymol.**, v. 295, p. 350-364, 1998.
- Juárez, P.; Comas, I.; González-Candelas, F.; Calvete, J.J. Evolution of snake venom desintegrins by positive Darwinian selection. **Mol. Biol. Evol.**, v. 25, p. 2391-2407, 2008.
- Kantonen, S.A.; Henriksen, N.M.; Gilson, M.K. Evaluation and Minization of Uncertainty in ITC Binding Measurements: Heat Error, Concentration Error, Saturation, and Stoichiometry. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1861, p. 485-498, 2017.
- Kasturiratne, A.; Wickremasinghe, A.R.; Silva, N.; Gunawardena, N.K.; Pathmeswaran, A.; Premaratna, R.; Savioli, L.; Lalloo, D.G.; Silva, H.J. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLoS Med.**, 5: e218, 2008.
- Kawasaki, Y.; Freire, E. Finding a better path to drug selectivity. **Drug Discov. Today**, v. 16, p. 985-990, 2011.
- Keller, S.; Vargas, C.; Zhao, H.; Piszczek, G.; Brautigam, C. A.; Schuck, P. High-Precision Isothermal Titration Calorimetry with Automated Peak-Shape Analysis. **Anal. Chem.**, v. 84, p. 5066-5073, 2012.
- Kini, R.M. Molecular molds with multiple missions: Functional sites in three-finger toxins. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 29, p. 815-822, 2002.
- Kini, R.M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**, v. 42, p. 827-840, 2003.
- Kini, R.M. & Chan, Y.M. Accelerated evolution and molecular surface of venom phospholipase A₂ enzymes. **J. Mol. Evol.**, v. 48, p. 125-132, 1999.
- Kini, R.M. & Evans, H.J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. **Toxicon**, v. 27, p. 613-635, 1989.
- Klebe, G. Applying thermodynamic profiling in lead finding and optimization. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 14, p. 95-110, 2015.
- Krissinel, E.; Henrick, K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. **J. Mol. Biol.**, v. 372, p. 774-797, 2007.

- Krizaj, I.; Faure, G.; Gubensek, F.; Bon, C. Neurotoxic phospholipases A₂ ammodytoxin and crotoxin bind to distinct high-affinity protein acceptors in *Torpedo marmorata* electric organ. **Biochemistry**, v. 36, p. 2779-2787, 1997.
- Krizaj, I.; Faure, G.; Gubensek, F.; Bon, C. Re-examination of crotoxin-membrane interactions. **Toxicon**, v. 34, p. 1003-1009, 1996.
- Kyte, J.; Doolittle, R.F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. **J. Mol. Biol.**, v. 157, p. 105-132, 1982.
- Ladbury, J. E.; Klebe, G.; Freire, E. Adding calorimetric data to decision making in lead discovery: a hot tip. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 9, p. 23-27, 2010.
- Ladbury, J.E.; Chowdhry, B.Z. Sensing the heat: the application of isothermal titration calorimetry to thermodynamic studies of biomolecular interactions. **Chem. Biol.**, v. 3, p. 791-801, 1996.
- Lee, J.; Scagel, C.F. Chicoric acid: chemistry, distribution, and production. **Front. Chem.**, v. 1, p. 40, 2013.
- Li, L.; Dantzer, J.J.; Nowacki, J.; O'Callaghan, B.J.; Meroueh, S.O. PDBcal: a comprehensive dataset for receptor-ligand interactions with three-dimensional structures and binding thermodynamics from isothermal titration calorimetry. **Chem. Biol. Drug Des.**, v. 71, n. 6, p. 429-532, 2008.
- Liang, Y. Applications of isothermal titration calorimetry in protein science. **Acta Biochim. Biophys. Sin.**, v. 40, p. 565-576, 2008.
- Lin-Shiau, S.-Y.; Lin, M.J. Suramin inhibits the toxic effects of presynaptic neurotoxins at the mouse motor nerve terminals. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 382, p. 75-80, 1999.
- Little, P.J.; Bhattacharya, R.; Moreyra, A.E.; Korichneva, I.L. Zinc and cardiovascular disease. **Nutrition**, v. 26, p. 1050-1057, 2010.
- Liu, n.; Tolbert, E.; Pang, M.; Ponnusamy, M.; Yan, H.; Zhuang, S. Suramin Inhibits Renal Fibrosis in Chronic Kidney Disease. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 22, p. 1064-1075, 2011.
- Liu, Y. & Sturtevant, J.M. Significant discrepancies between van't Hoff and calorimetric enthalpies. II. **Protein Sci.**, v. 4, p. 2559-2561, 1995.
- Lomonte, B.; Angulo, Y.; Calderón, L. An overview of Lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v. 42, p. 885-901, 2003.
- Lomonte, B.; Angulo, Y.; Sasa, M.; Gutiérrez, J.M. The phospholipase A₂ homologues of snake venoms: biological activities and their possible adaptive roles. **Protein Pept. Lett.**, v. 16, p. 860-876, 2009.
- Lomonte, B.; Gutiérrez, J.M.; Furtado, M.F.; Otero, R.; Rosso, J.P.; Vargas, O.; Carmona, E.; Rovira, M.E. Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. **Toxicon**, v. 28, p. 1137-1146, 1990.
- Lomonte, B.; Moreno, E.; Tarkowski, A.; Hanson, L.A.; Maccarana, M. Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a lysine 49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 29867-29873, 1994.
- Lomonte, B.; Rangel, J. Snake venom Lys49 myotoxins from phospholipases A₂ to non-enzymatic membrane disruptors. **Toxicon**, v. 60, p. 520-530, 2012.
- Marchi-Salvador, D.P.; Corrêa, L.C.; Magro, A.J.; Oliveira, C.Z.; Soares, A.M.; Fontes, M.R.M. Insights into the role of oligomeric state on the biological activities of crotoxin: crystal structure of a tetrameric phospholipase A₂ formed by two isoforms of crotoxin B from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Proteins**, v. 72, p. 883-891, 2008.
- Marchi-Salvador, D.P.; Fernandes, C.A.; Silveira, L.B.; Soares, A.M.; Fontes, M.R.M. Crystal structure of a phospholipase A₂ homolog complexed with p-bromophenacyl bromide reveals important structural changes associated with the inhibition of myotoxic activity. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1794, p. 1583-1590, 2009.

- Marcussi, S.; Sant'Ana, C.D.; Oliveira, C.Z.; Rueda, A.Q.; Menaldo, D.L.; Belebony, R.O.; Stabeli, R.G.; Giglio, J.R.; Fontes, M.R.M.; Soares, A.M. Snake Venom Phospholipase A₂ Inhibitors: Medicinal Chemistry and Therapeutic Potential. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 7, p. 743-756, 2007.
- Matsui, T.; Fujimura, Y.; Titani, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1477, p. 146-156, 2000.
- Melgarejo, A.R. Serpentes Peçonhentos no Brasil, Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. Sarvier, São Paulo, p. 33-61, 2003.
- Martinez, J.C.; Murciano-Calles, J.; Cobos, E.S.; Iglesias-Bexiga, M.; Luque, I.; Ruiz-Sanz, J. Isothermal Titration Calorimetry: Thermodynamic Analysis of the Binding Thermograms of Molecular Recognition Events by Using Equilibrium Models. In: Elkordy, A.A. (Ed.) Applications of Calorimetry in a Wide Context – Differential Scanning Calorimetry, Isothermal Titration Calorimetry and Microcalorimetry, InTech, 2013.
- Magro, A.J.; Soares, A.M.; Giglio, J.R.; Fontes, M.R.M. Crystal structures of BsNP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A₂: quaternary structure and inhibition mechanism insights. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 311, p. 713-720, 2003.
- McKinnon, I. R.; Fall, L.; Parody-Morreale, A.; Gill, S. J. A twin titration microcalorimeter for the study of biochemical reactions. **Anal. Biochem.**, v. 139, p. 134-139, 1984.
- Mohapatra, B. et al., Snakebite mortality in India: a nationally representative mortality survey. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, 5: e1018, 2011.
- Montecucco, C.; Gutiérrez, J.M.; Lomonte, B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A₂ myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. **Cell. Mol. Life Sci**, v. 65, p. 2897-2912, 2008.
- Murakami, M.T.; Arruda, E.Z.; Melo, P.A.; Martinez, A.B.; Calil-Eliás, S.; Tomaz, M.A.; Lomonte, B.; Gutiérrez, J.M.; Arni, R.K. Inhibition of Myotoxic Activity of *Bothrops asper* Myotoxin II by the Anti-trypanosomal Drug Suramin. **J. Mol. Biol.**, v. 350, p. 416-426, 2005.
- Murakami, M.T.; Gabdoulkhakov, A.; Genov, N.; Cintra, A.C.; Betzel, C.; Arni, R.K. Insights into metal ion binding in phospholipases A₂: Ultra high-resolution crystal structures of an acidic phospholipase A₂ in the Ca²⁺ free and bound states. **Biochimie**, v. 88, p. 543-549, 2006.
- Murakami, M.T.; Vicoti, M.M.; Abrego, J.R.B.; Lourenzoni, M.R.; Cintra, A.C.O.; Arruda, E.Z.; Tomaz, M.A.; Melo, P.A.; Arni, R.K. Interfacial surface charge and free accessibility to the PLA₂-active site-like region are essential requirements for the activity of Lys49 PLA₂ homologues. **Toxicon**, v. 49, p. 378-387, 2007.
- Nakashima, K.-I.; Nobuhisa, I.; Deshimaru, M.; Nakai, M.; Ogawa, T.; Shimohigashi, Y.; Fukumaki, Y.; Hattori, M.; Sakaki, Y.; Hattori, S.; Ohno, M. Accelerated evolution in the protein-coding regions is universal in crotaline snake venom gland phospholipase A₂ isozyme genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92(12), p. 5605-5609, 1995.
- Naghibi, H.; Tamura, A.; Sturtevant, J.M. Significant discrepancies between van't Hoff and calorimetric enthalpies. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 5597-5599, 1995.
- Naoi, M.; Naoi, M.; Shimizu, T.; Malviya, A.N.; Yagi, K. Permeability of amino acids into liposomes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 471, p. 305-310, 1977.
- Oliveira, D.G.; Toyama, M.H.; Novello, J.C.; Beriam, L.O.; Marangoni, S. Structural and functional characterization of basic PLA₂ isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. **J. Protein Chem.**, v. 21, p. 161-168, 2002.
- Olsson, T.S.; Williams, M.A.; Pitt, W.R.; Ladbury, J.E. The thermodynamics of protein-ligand interaction and solvation: Insights for ligand design. **J. Mol. Biol.**, v. 384, p. 1002-1017, 2008.
- Pawlak, J.; Mackessy, S.P.; Fry, B.G.; Bhatia, M.; Mourier, G.; Fruchart-Gaillard, C.; Servent, D.; Ménez, R.; Stura, E.; Ménez, A.; Kini, R.M. Denmotoxin: A three-finger toxin from colubrid snake

- Boiga dendrophila* (mangrove catsnake) with bird-specific activity. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 29030-29041, 2006.
- Pawlak, J.; Mackessy, S.P.; Sixberry, N.M.; Stura, E.A.; Le Du, M.H.; Ménez, R.; Foo, C.S.; Ménez, A.; Nirthanan, S.; Kini, R.M. Irditoxin, a novel covalently-linked heterodimeric three-finger toxin with high taxon-specific neurotoxicity. **FASEB J.**, v. 23, p. 534-545, 2009.
- Perozzo, R.; Folkers, G.; Scapozza, L. Thermodynamics of Protein-Ligand Interactions: History, Presence, and Future Aspects. **J. Recept. Signal Transduct. Res.**, v. 24, p. 1-52, 2004.
- Petan, T.; Krizaj, I.; Pungercar, J. Restoration of enzymatic activity in a Ser-49 phospholipase A₂ homologue decreases its Ca²⁺-independent membrane-damaging activity and increases its toxicity. **Biochemistry**, v. 46, p. 12795-12809, 2007.
- Peters, W.B.; Frasca, V.; Brown, R.K. Recent developments in isothermal titration calorimetry label free screening. **Comb. Chem. High Throughput Screen.**, v. 12, p. 772-790, 2009.
- Pethica, B.A. Misuse of thermodynamics in the interpretation of isothermal titration calorimetry data for ligand binding to proteins. **Anal. Biochem.**, v. 472, p. 21-29, 2015.
- Pierce, M.M., Raman, C.S., Nall, B.T. Isothermal titration Calorimetry of Protein-Protein Interactions. **Methods**, v. 19, p. 213-221, 1999.
- Prasad, A.S. Discovery of human zinc deficiency: 50 years later. **J. Trace Elem. Med. Biol.**, v. 26, p. 66-69, 2012.
- Prasad, A.S.; Beck, F.W.J.; Snell, D.C.; Kucuk, O. Zinc in cancer prevention. **Nutr. Cancer**, v. 61, p. 879-887, 2009.
- Prescott, S.M.; Zimmerman, G.A.; Stafforini, D.M.; McIntyre, T.M. Platelet-activating factor and related lipid mediators. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 69, p. 419-445, 2000.
- Radvanyi, F.; Bon, C. Catalytic activity and reactivity with *p*-bromophenacyl bromide of the phospholipase subunit of crotoxin; influence of dimerization and association with the noncatalytic subunit. **J. Biol. Chem.**, v. 257, p. 12616-12632, 1982.
- Rangel-Santos, A.; Lima, C.; Lopes-Ferreira, M. Cardoso, D.F. Immunosuppressive role of principal toxin (Crotoxin) of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, v. 44, p. 609-616, 2004.
- Rodrigues-Simioni, L.; Prado-Franceschi, J.; Cintra, A.C.; Giglio, J.R.; Jiang, M.S.; Fletcher, J.E. No role for enzymatic activity or dantrolene-sensitive Ca²⁺ stores in the muscular effects of bothropstoxin, a Lys49 phospholipase A₂ myotoxin. **Toxicon**, v. 33, p. 1479-1489, 1995.
- Rogers, J.; Yu, B.Z.; Serves, S.V.; Tsivgoulis, G.M.; Sotiropoulos, D.; Ioannou, P.V.; Jain, M.K. Kinetic basis for the substrate specificity during hydrolysis of phospholipids by secreted phospholipase A₂. **Biochemistry**, v. 35, p. 9375-9384, 1996.
- Rühmann, E.; Betz, M.; Fricke, M.; Heine, A.; Schäfer, M.; Klebe, G. Thermodynamic signatures of fragment binding: Validation of direct versus displacement ITC titrations. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1850, p. 647-656, 2015.
- Salvador, G.H.M.; Fernandes, C.A.H.; Magro, A.J.; Marchi-Salvador, D.P.; Cavalcante, W.L.G.; Fernandez, R.M.; Gallacci, M.; Soares, A.M.; Oliveria, C.L.P.; Fontes, M.R.M. Structural and Phylogenetic Studies with MjTX-I Reveal a Multi-Oligomeric Toxin - a Novel Feature in Lys49-PLA₂s Protein Class. **PLoS ONE**, 8:e60610, 2013a.
- Salvador, G.H.M.; Cavalcante, W.L.G.; dos Santos, J.I.; Gallacci, M.; Soares, A.M.; Fontes, M.R.M. Structural and functional studies with myotoxin II from *Bothrops moojeni* reveal remarkable similarities and differences compared to other catalytically inactive phospholipase A₂-like. **Toxicon**, v. 72, p. 52-63, 2013b.
- Salvador, G.H.M.; Dreyer, T.R.; Cavalcante, W.L.G.; Matioli, F.F.; dos Santos, J.I.; Velazquez-Campoy, A.; Gallacci, M.; Fontes, M.R.M. Structural and functional evidence for membrane docking and disruption sites on phospholipase A₂-like proteins revealed by complexation with the inhibitor suramin. **Acta Crystallogr. D**, D71, p. 2066-2078, 2015.

- Sampaio, S.C.; Hyslop, S.; Fontes, M.R.M.; Prado-Franceschi, J.; Zambelli, V.O.; Magro, A.J.; Brigitte, P.; Gutierrez, V.P.; Cury, Y. Crotoxin: Novel activities for a classic β -neurotoxin. **Toxicon**, v. 55, p. 1045-1060, 2010.
- Sampaio, S.C.; Rangel-Santos, A.C.; Peres, C.M.; Curi, R.; Cury, Y. Inhibitory effect of phospholipase A₂ isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom on macrophage function. **Toxicon**, v. 45, p. 671-676, 2005.
- Sánchez, E.E.; Rodríguez-Acosta, A. Inhibitor of snake venoms and development of new therapeutics. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.**, v. 30, p. 647-678, 2008.
- Sankhala, R.S.; Lokareddy, R.K.; Cingolani, G. Divergent Evolution of Nuclear Localization Signal Sequence in Herpesvirus Terminase Subunits. **J. Biol. Chem.**, v. 291, p. 11420-11433, 2016.
- Sant'Anna, R.; Gallego, P.; Robinson, L.Z.; Pereira-Henriques, A.; Ferreira, N.; Pinheiro, F.; Esperante, S.; Pallares, I.; Huertas, O.; Almeida, M.R.; Reixach, N.; Insa, R.; Velazquez-Campoy, A.; Reverter, D.; Reig, N.; Ventura, S. Repositioning tolcapone as a potent inhibitor of transthyretin amyloidogenesis and associated cellular toxicity. **Nat. Commun.**, v. 7, n. 10787, 2016.
- Santos, K.F.; Murakami, M.T.; Cintra, A.c.; Toyama, M.H.; Marangoni, S.; Forrer, V.P.; Brandão Neto, J.R.; Polikarpov, I.; Arni, R.K. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the heterodimeric crotoxin complex and the isolated subunits crotapotin and phospholipase A₂. **Acta Crystallogr. F**, v. 63, p. 287-290, 2007.
- Saul, F.A.; Prijatelj-Znidarsic, P.; Vuillez-le Normand, B.; Villette, B.; Raynal, B.; Pungarcar, J.; Krizaj, I.; Faure, G. Comparative structural studies of two natural isoforms of ammodytoxin, phospholipase A₂ from *Vipera ammodytes* which differ in neurotoxicity and anticoagulant activity. **J. Struct. Biol.**, v. 169, p. 360-369, 2010.
- Scarpati, M.L.; Oriente, G. Chicoric acid (dicaffeoyltartaric acid): its isolation from chicory (*Chicorium intybus*) and synthesis. **Tetrahedron**, v. 4, p. 43-48, 1958.
- Schaloske, R.H.; Dennis, E.A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1761, p. 1246-1259, 2006.
- Scheuermann, T. H. & Brautigam, C.A. High-precision, automated integration of multiple isothermal titration calorimetric thermograms: New features of NITPIC. **Methods**, v. 76, p. 87-98, 2015.
- Scott, D.L. Phospholipase A₂ structure and catalytic properties. In: Kini, R.M. (Ed) Venom phospholipase A₂ enzymes: Structure, function and mechanism. Chichester, England: John Wiley & Sons, 1997.
- Scott, D.L.; Mandel, A.M.; Sigler, P.B.; Honig, B. The electrostatic basis for the interfacial binding of secretory phospholipases A₂. **Biophys. J.**, v. 67, p. 493-504, 1994.
- Scott, D.L.; White, S.P.; Otwinowski, Z.; Yuan, W.; Gelb, M.H.; Sigler, P.B. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A₂. **Science**, v. 250, p. 1541-1546, 1990.
- Serrano, S.M.T.; Maroun, R.C. Snake venom serine proteinases: Sequence homogy vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v. 45, p. 1115-1132, 2005.
- Slotta, K.H. & Fraenkel-Conrat, H. Schlangengifte III: Mitteilung: Reinigung und Krystallisation des Klapperschlangen-Giftes. **Ber. Dtsh. Chem. Ges.**, v. 71, p. 1076-1081, 1938.
- Soares, A.M.; Oshima-Franco, Y.; Vieira, C.A.; Leite, G.B.; Fletcher, J.E.; Jiang, M.-S.; Cintra, A.C.O.; Giglio, J.R.; Rodrigues-Simioni, L. Mn²⁺ ions reduce the enzymatic and pharmacological activities of bothropstoxin-I, a myotoxic Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Int. J. Biochem. Cell. B.**, v. 34, p. 668-677, 2002.
- Soares, A.M.; Rodrigues, V.M.; Homs-Brandeburgo, M.I.; Toyama, M.H.; Lombardi, F.R.; Arni, R.K.; Giglio, J.R. A rapid procedure for the isolation of the Lys49 myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: Biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. **Toxicon**, v. 36, p. 503-514, 1998.

- Soares, A.M.; Ticli, F.K.; Marcussi, S.; Lourenço, M.V.; Januário, A.H.; Sampaio, S.V.; Giglio, J.R.; Lomonte, B.; Pereira, P.S. Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. **Curr. Med. Chem.**, v. 12, p. 2625-2641, 2005.
- Stabeli, R.G.; Amui, S.F.; Sant'Ana, C.D.; Pires, M.G.; Nomizo, A.; Monteiro, M.C.; Romao, P.R.; Gerra-Sa, R.; Vieira, C.A.; Giglio, J.R.; Fontes, M.R.M.; Soares, A.M. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A₂ homologue: an example of function versatility of snake venom proteins. **Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.**, v. 142, p. 371-381, 2006.
- Stein, C.A. Suramin: A Novel Antineoplastic Agent with Multiple Potential Mechanisms of Action. **Cancer Res.**, v. 53, p. 2239-2248, 1993.
- Stefansson, S.; Kini, R.M.; Evans, H.J.; The basic phospholipase A₂ from *Naja nigricollis* venom inhibits the prothrombinase complex by a novel nonenzymatic mechanism. **Biochemistry**, v. 29, p. 1742-1746, 1990.
- Tellinghuisen, J. A study of statistical error in isothermal titration calorimetry. **Anal. Biochem.**, v. 321, p. 79-88, 2003.
- Tellinghuisen, J. Volume errors in isothermal titration calorimetry. **Anal. Biochem.**, v. 333, p. 405-406, 2004.
- Tellinghuisen, J. Optimizing experimental parameters in isothermal titration calorimetry. **J. Phys. Chem. B.**, v. 109, p. 20027-20035, 2005.
- Tellinghuisen, J.; Chodera, J.D. Systematic errors in isothermal titration calorimetry: concentrations and baselines. **Anal. Biochem.**, v. 414, p. 5066-5073, 2011.
- Thomson, J.A.; Ladbury, J.E. Isothermal titration calorimetry: a tutorial, in J.E. Ladbury, M.L. Doyle (Eds), *Bicalorimetry 2: Applications of Calorimetry in the Biological Sciences*, John Wiley, Chichester, UK, p. 45-46, 2004.
- Ticli, F.K.; Hage, L.I.S.; Cambraia, R.S.; Pereira, P.S.; Magro, A.J.; Fontes, M.R.M.; Stábeli, R.G.; Giglio, J.R.; França, S.C.; Soares, A.M.; Sampaio, S.V. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A₂ inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. **Toxicon**, v. 46, p. 318-327, 2005.
- Turnbull, W.B.; Daranas, A.H. On the Value of C: Can Low Affinity Systems Be Studied by Isothermal Titration Calorimetry? **J. Am. Chem. Soc.**, v. 125, p. 14859-14866, 2003.
- Turnbull, W.B. Divided we fall? Studying low affinity fragments of ligands by ITC. **MicroCal Application Note**, p. 2-3, 2005.
- Vega, S.; Abian, O.; Velazquez-Campoy, A. A unified framework based on the binding polynomial for characterizing biological systems by isothermal titration calorimetry. **Methods**, v. 76, p. 99-115, 2015.
- Velazquez-Campoy, A. & Freire, E. ITC in the post-genomic era...? Priceless. **Biophys. Chem.**, v. 115, p. 115-124, 2005.
- Velazquez-Campoy, A. Geometric features of the Wiseman isotherm in isothermal titration calorimetry. **J. Thermal Anal. Calorim.**, v. 122, p. 1477-1483, 2015.
- Velazquez-Campoy, A.; Ohtaka, H.; Nezami, A.; Muzammil, S.; Freire, E. Isothermal Titration Calorimetry. **Curr. Prot. Cell Biol.**, v. 23, 17.8.1-17.8.24, 2004.
- Velazquez-Campoy, A.; Goñi, G.; Peregrina, J.R.; Medina, M. Exact Analysis of Heterotropic Interactions in Proteins: Characterization of Cooperative Ligand Binding by Isothermal Titration Calorimetry. **Biophys. J.**, v. 91, p. 1887-1904, 2006.
- Velazquez-Campoy, A.; Leavitt, S.A.; Freire, E. Characterization of protein-protein interactions by isothermal titration calorimetry. **Methods Mol. Biol.**, v. 261, p. 35-54, 2004.
- Verheij, H.M.; Slotboom, A.J.; de Haas, G.H. Structure and function of phospholipase A₂. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, v. 91, p. 91-203, 1981.

- Verheij, H.M.; Volwerk, J.J.; Jansen, E.H.; Puyk, W.C.; Dijkstra, B.W.; Drenth, J.; de Haas, G.H. Methylation of histidine-48 in pancreatic phospholipase A₂. Role of histidine and calcium ion in the catalytic mechanism. **Biochemistry**, v. 19, p. 743-750, 1980.
- Vital Brazil, O.; Fontana, M.D.; Heluany, N.F. Nature of the post-synaptic action of crotoxin at guinea-pig diaphragm end-plates. **J. Nat. Toxins**, v. 9, p. 33-42, 2000.
- Vital Brazil, O.; Prado-Franceschi, J.; Waisbich, E. Pharmacology of crystalline crotoxin – toxicity. **Mem. Inst. Butantan**, v. 33, p. 973-980, 1966a.
- Vital Brazil, O. Pharmacology of crystalline crotoxin – II. Neuromuscular blocking action. **Mem. Inst. Butantan**, v. 33, p. 981-992, 1966b.
- Voogd, T.E.; Vansterkenburg, E.L.; Wilting, J.; Janssen, L.H. Recent research on the biological activity of suramin. **Pharmacol. Rev.**, v. 45, p. 177-203, 1993.
- Ward, R.J.; de Azevedo Jr., W.F.; Arni, R.K. At the interface: crystal structures of phospholipases A₂. **Toxicon**, v. 36, p. 1623-1633, 1998.
- Ward, R.J.; Chioato, L.; de Oliveira, A.H.C.; Ruller, R.; Sá, J.M. Active-site mutagenesis of a Lys49-phospholipase A₂: biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis. **Biochem. J.**, v. 362, p. 89-96, 2002.
- Warrell, D.A. Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features and clinical management. In: Campbell, J.A.; Lamar, W.W. (Eds) *Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*, vol. 2. Comstock Publishing Associates/Cornell University Press, Ithaca, NY, p. 709-761, 2004.
- Watanabe, L.; Soares, A.M.; Ward, R.J.; Fontes, M.R.M.; Arni, R.K. Structural insights for fatty acid binding in a Lys49-phospholipase A₂: crystal structure of myotoxin II from *Bothrops moojeni* complexed with stearic acid. **Biochimie**, v. 87, p. 161-167, 2005.
- Weber, P.C.; Salemme, F.R. Applications of calorimetric methods to drug discovery and the study of protein interactions. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 13, p. 115-121, 2003.
- WHO (World Health Organization). The 17 Neglected Tropical Diseases. http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/
- Wiseman, T.; Wlliston, S.; Brandts, J.F.; Lin, L.-N. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. **Anal. Biochem.**, v. 179, p. 131-137, 1989.
- Williams, D.; Gutierrez, J.M.; Harrison, R.; Warrell, D. A.; White, J.; Winkel, K.D.; Gopalakrishnakone, P. The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. **Lancet**, v. 375, p. 89-91, 2010.
- Williams, G.; Ferenczy, G.G.; Ulander, J.; Keseru, G.M. Binding thermodynamics discriminates fragments from druglike compounds: a thermodynamic description of fragment-based drug discovery. **Drug. Discov. Today**, InPress.
- Wimley, W.C.; White, S.H. Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. **Nat. Struct. Biol.**, v. 3, p. 842-848, 1996.
- Wyman, J. Heme proteins. **Adv. Protein. Chem.**, v. 4, p. 407-531, 1948.
- Wyman, J. Linked functions and reciprocal effects in hemoglobin: a second look. **Adv. Protein Chem.**, v. 19, p. 223-286, 1964.
- Wyman, J.; Gill, S.J. *Binding and Linkage: Functional Chemistry of Biological Macromolecules*. University Science Books, Mill Valley, 1990.
- Yamazaki, Y.; Morita, T. Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins. **Toxicon**, v. 44, p. 227-231, 2004.
- Yan, C.H.; Liang, Z.Q.; Gu, Z.L.; Yang, Y.P.; Reid, P.; Qin, Z.H. Contributions of autophagic and apoptotic mechanisms to CrTX-induced death of K562 cells. **Toxicon**, v. 47, p. 521-530, 2006.
- Zettner, A. Principles of Competitive Binding assays (Saturation Analyses). I. Equilibrium Techniques, **Clin. Chem.**, v. 19, p. 699-705, 1973.
- Zhao, H.; Piszczek, G.; Schuck, P. SEDPHAT – A platform for global ITC analysis and global multi-method analysis of molecular interactions. **Methods**, v. 76, p. 137-148, 2015.

- Zhao, H. & Schuck, P. Combining biophysical methods for the analysis of protein complex stoichiometry and affinity in SEDPHAT. **Acta Crystallogr. D**, D71, p. 3-14, 2015.
- Zhou, X.; Tan, T.-C.; Valiyaveetil, S.; Go, M.L.; Kini, R.M.; Velazquez-Campoy, A.; Sivaraman, J. Structural Characterization of Myotoxic Ecarpholin S From *Echis carinatus* Venom. **Biophys. J.**, v. 95, p. 3366-3380, 2008.
- Zhu, Q.; Wu, D.C.; Zhou, X.P.; Gong, S.; Cheng, B.C.; Qin, Z.H. Inhibitory effect of crotoxin on the pain-evoked discharge of neurons in thalamic parafascicular nucleus in rats. **Toxicon**, v. 51, p. 102-111, 2008.

RESEARCH ARTICLE

Structure of Importin- α from a Filamentous Fungus in Complex with a Classical Nuclear Localization Signal

Natalia E. Bernardes¹✉, Agnes A. S. Takeda¹✉, Thiago R. Dreyer¹, Fernanda Z. Freitas², Maria Célia Bertolini², Marcos R. M. Fontes^{1*}

1 Departamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, SP, Brazil, **2** Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, SP, Brazil

✉ These authors contributed equally to this work.

* fontes@ibb.unesp.br



OPEN ACCESS

Citation: Bernardes NE, Takeda AAS, Dreyer TR, Freitas FZ, Bertolini MC, Fontes MRM (2015) Structure of Importin- α from a Filamentous Fungus in Complex with a Classical Nuclear Localization Signal. PLoS ONE 10(6): e0128687. doi:10.1371/journal.pone.0128687

Academic Editor: Beata G Vertessy, Institute of Enzymology of the Hungarian Academy of Science, HUNGARY

Received: February 19, 2015

Accepted: April 29, 2015

Published: June 19, 2015

Copyright: © 2015 Bernardes et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: The coordinates and structure factors from the structure (importin- α from *N. crassa*-SV40NLS) have been deposited in the protein data bank data base (www.pdb.org) under accession code 4RXH.

Funding: This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (www.fapesp.br: MRMF, MCB, NEB), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (www.cnpq.br: MRMF and MCB), and Coordenação de

Abstract

Neurospora crassa is a filamentous fungus that has been extensively studied as a model organism for eukaryotic biology, providing fundamental insights into cellular processes such as cell signaling, growth and differentiation. To advance in the study of this multicellular organism, an understanding of the specific mechanisms for protein transport into the cell nucleus is essential. Importin- α (Imp- α) is the receptor for cargo proteins that contain specific nuclear localization signals (NLSs) that play a key role in the classical nuclear import pathway. Structures of Imp- α from different organisms (yeast, rice, mouse, and human) have been determined, revealing that this receptor possesses a conserved structural scaffold. However, recent studies have demonstrated that the Imp α mechanism of action may vary significantly for different organisms or for different isoforms from the same organism. Therefore, structural, functional, and biophysical characterization of different Imp α proteins is necessary to understand the selectivity of nuclear transport. Here, we determined the first crystal structure of an Imp α from a filamentous fungus which is also the highest resolution Imp α structure already solved to date (1.75 Å). In addition, we performed calorimetric analysis to determine the affinity and thermodynamic parameters of the interaction between Imp- α and the classical SV40 NLS peptide. The comparison of these data with previous studies on Imp α proteins led us to demonstrate that *N. crassa* Imp- α possess specific features that are distinct from mammalian Imp- α but exhibit important similarities to rice Imp- α , particularly at the minor NLS binding site.

Introduction

The filamentous fungus *Neurospora crassa* has been studied by classical and molecular genetics, providing several insights into cellular processes, which include cell signaling, growth and differentiation, secondary metabolism, circadian rhythm and genome defense [1]. Together

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (www.capes.br: AAST).

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

with the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*, *N. crassa* has largely been used as a model organism to study fundamental aspects of eukaryotic biology. Nevertheless, compared to yeast, *N. crassa* has developed greater morphological and developmental complexity due its multicellular characteristics, and although *N. crassa* is not known to be a pathogen, similarities exist between the saprotrophic *Neurospora* and pathogenic fungi [1].

The genomic sequence of *N. crassa* exhibits an apparent lack of functional gene duplication [1], which has allowed several studies to better understand the metabolic pathways of this experimentally tractable organism. We have used *N. crassa* as a model organism to understand the regulation of basic cellular processes, such as glycogen metabolism. Many proteins and transcription factors have been identified that likely play a role in this process [2, 3]. Some of these proteins and all transcription factors possess putative nuclear localization signals (NLSs), either monopartite or bipartite, suggesting that they can be transported into the nucleus via the classical nuclear pathway [3], which is mediated by importins (importin- α /importin- β) [4, 5].

The classical NLSs (cNLSs) are the best characterized targeting signals and are typically divided into one (monopartite) or two (bipartite) clusters of basic residues [6], whose consensus sequences correspond to K[K/R]X[K/R] for monopartite cNLSs and [K/R][K/R]X_{10–12}[K/R]_{3/5} for bipartite cNLSs, where [K/R]_{3/5} corresponds to at least three of either lysine or arginine residues of five consecutive amino acids [6–8]. Structural studies have shown that both classes are recognized by the nuclear import receptor importin- α (Imp α) [7, 9, 10]. Imp α is composed of tandem armadillo (Arm) repeats that generate a curved and elongated shape. Imp α also contains conserved residues that form two NLS binding sites known as major (Arms 1–4) and minor (Arms 4–8) NLS binding sites [9, 10]. Monopartite NLSs primarily interact with the major binding site, whereas bipartite NLSs interact with both minor and major NLS binding sites [10–12].

The modulation of differential expression is a key feature for understanding the metabolism and growth of an organism [13, 14], and an understanding of the nuclear import mechanism of fungi may provide insights into these pathways. Although, Imp α structures have been elucidated, an understanding of the specificity of NLS recognition and regulation remains limited [15]. To better understand NLS recognition and gain insights into the *N. crassa* nuclear import process, we report the first crystal structure of Imp α from a filamentous fungus (NcImp α) in complex with a classical monopartite NLS (SV40 large T antigen NLS). This is also the highest resolution Imp α structure solved to date (1.75Å). Isothermal titration calorimetric (ITC) studies were used to determine the affinity and thermodynamic parameters of the interaction between Imp α and the classical SV40 NLS peptide. Both crystallographic and calorimetric analyses confirmed NcImp α recognition of cNLS via both major and minor binding sites. Moreover, we observed interactions in the minor binding site that are more similar to those in Imp α from rice (*Oryza sativa*) [16] than those in Imp α from yeast [9]. This study highlights the importance of the analysis of the interactions between NLSs and Imp α proteins from various organisms. Particularly, it may aid in the identification of specific NLSs from *N. crassa*, providing insights into the nuclear import pathway in fungi and enabling future biotechnological applications.

Materials and Methods

Protein expression and purification

The recombinant Imp α protein from *N. crassa* (NcImp α) was expressed as a truncated hexa-His fusion protein, consisting of residues 75–529, using the *Escherichia coli* host strain RosettaTM (DE3) pLysS (Novagen), as previously described [17]. The protein was purified using nickel affinity chromatography and eluted in a 0.15–3.0 M imidazole linear gradient, followed

by dialysis. NcImp α was stored under cryogenic temperatures in a buffer composed of 20 mM Tris-HCl, pH 8, and 100 mM NaCl.

Synthesis of NLS peptides

The peptide corresponding to SV40 NLS ($^{125}\text{PPKKKRKV}^{132}$) was synthesized by Proteimax (Brazil) with a purity of higher than 99%. The peptides contained additional residues at the N- and C-termini compared with the minimally identified NLS [18].

Isothermal titration calorimetry

ITC measurements were performed using a MicroCal iTC200 microcalorimeter (GE Healthcare) calibrated according to the manufacturer's instructions. NcImp α and the SV40 NLS peptide were prepared and dialyzed in buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, and 100 mM NaCl). The sample cell was loaded with 50 μM NcImp α that was titrated with the SV40 NLS peptide at a concentration of 1 mM (protein:peptide molar ratio of 1:20). Titrations were conducted at 10°C and consisted of 20 injections of 2.0 μL in an interval of 240 s with a 1000 rpm homogenization speed. The heat of dilution was determined by titration of the peptide sample into the protein sample buffer (20mM Tris-HCl, pH 8.0, and 100 mM NaCl) in separate control assays and was subtracted from the corresponding titrations. The assays temperature was chosen to avoid protein aggregation displayed for higher temperatures and to permit direct comparison to previously Imp α /SV40NLS ITC studies performed in the same condition [19]. The data were processed using MicroCal Origin Software to obtain values for stoichiometry (N), dissociation constants (K_d), enthalpy (ΔH), and binding-type input parameters were adjusted to obtain the best fitting model. The values of K_d and ΔH were used to calculate free energy (ΔG) and entropy (ΔS) values.

Crystallization, X-ray data collection and structure determination

NcImp α was concentrated to 12 mg/ml using an Amicon 30 kDa cutoff filter unit (Millipore) and stored at -20°C. Crystals of NcImp α in complex with SV40 NLS were obtained at a 1:8 protein:peptide molar ratio in 20 mM Bicine, pH 8.5, and 20% (w/v) polyethylene glycol 6000 at 4°C [20] using MRC2 Well Crystallization Plates and an Orix4 system (Douglas Instruments).

X-ray diffraction data were collected from a single crystal of NcImp α /SV40NLS at a wavelength of 1.0 Å using a synchrotron radiation source (X25 beamline, National Synchrotron Light Source, NSLS, Upton, NY, USA) and a PILATUS detector. A crystal was mounted in a nylon loop and flash-cooled in a stream of nitrogen at -173.15°C using 20% (v/v) glycerol as the cryoprotectant. The crystal-to-detector distance was 270 mm with an oscillation range of 0.5°, resulting in the collection of a total of 720 images. The data were processed using the HKL2000 suite [21]. The crystal belonged to the space group $P2_12_12_1$ (Table 1) and was isomorphous to previously obtained crystals [20].

NcImp α /SV40NLS crystal structure was determined by molecular replacement using the program Phaser [22] and the coordinates of Imp α from *Mus musculus* in complex with the nucleoplasmin NLS (PDB ID: 3UL1, chain B; [15]) as the search model. Rounds of manual modeling were performed using the program Coot [23] and the crystallographic refinement (positional and restrained isotropic individual B factors with an overall anisotropic temperature factor and bulk-solvent correction) was performed using the program phenix.refine [24], considering free R factors. Structure quality was evaluated using the program MolProbity [25], and interactions were analyzed using the program LIGPLOT [26]. Figures were generated using the program PyMOL [27]. Superposition of Imp α structures was performed using LSQ algorithm [28] present in the software package CCP4 [29].

Table 1. X-ray data-collection and refinement statistics for NcImp α /SV40NLS structure.

Values in parentheses are for the highest resolution shell.

Diffraction data statistics

Unit cell parameters (Å)	a = 45.1; b = 64.4; c = 185.6
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Unique reflections	54993 (5195) ^a
Completeness (%)	99.6 (95.8) ^a
Mosaicity	0.40
Multiplicity	12.4 (9.3) ^a
R _{merge} † (%)	6.8 (84.3) ^a
Average I/σ(I)	37.5 (2.0) ^a
Refinement statistics	
Resolution (Å)	36.98–1.75 (1.81–1.75) ^a
R _{cryst} ‡ (%)	18.3 (28.5) ^a
R _{free} § (%)	21.0 (30.2) ^a
Number of non-H atoms	
Protein	3164
Peptide	113
Solvent	349
Ramachandran plot ††	
Residues in most favored regions(%)	99
Residues in disallowed regions (%)	0.23
Mean B-factor(Å ²) ^e	36.7

† $R_{merge} = \frac{\sum_{hkl} (\sum_i (|I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle|))}{\sum_{hkl} \langle I_{hkl} \rangle}$, where $I_i(hkl)$ is the intensity of an individual measurement of the reflection with Miller indices hkl and $\langle I(hkl) \rangle$ is the mean intensity of this reflection. Calculated for $I > -3\sigma(I)$ [21].

‡ $R_{cryst} = \frac{\sum_{hkl} (|F_{obs,hkl}| - |F_{calc,hkl}|)}{|F_{obs,hkl}|}$, where $|F_{obs}|$ and $|F_{calc}|$ are the observed and calculated structure-factor amplitudes, respectively.

§ R_{free} is equivalent to R_{cryst} but was calculated with reflections (5%) omitted from the refinement process. Calculated based on the Luzzati plot with the program SFCHECK [31].

†† Calculated with the program PROCHECK [31].

^aValues in parentheses are for the highest-resolution shell.

doi:10.1371/journal.pone.0128687.t001

PDB accession code

Coordinates and structure factors from NcImp α /SV40NLS have been deposited in the PDB under accession code 4RXH.

Results

Structure of NcImp α in complex with SV40NLS

NcImp α was expressed as an N-terminal truncation lacking residues 1–74 (which corresponds to the IBB domain; [30]) that are responsible for autoinhibition. Furthermore, crystallization was performed in the presence of an NLS ligand to stabilize the truncated protein, as previously reported [17, 20], and to investigate the protein-NLS binding features.

X-ray diffraction data collection and refinement statistics of the NcImp α /SV40 NLS complex are summarized in Table 1. The crystals are not isomorphous to other Imp α /SV40

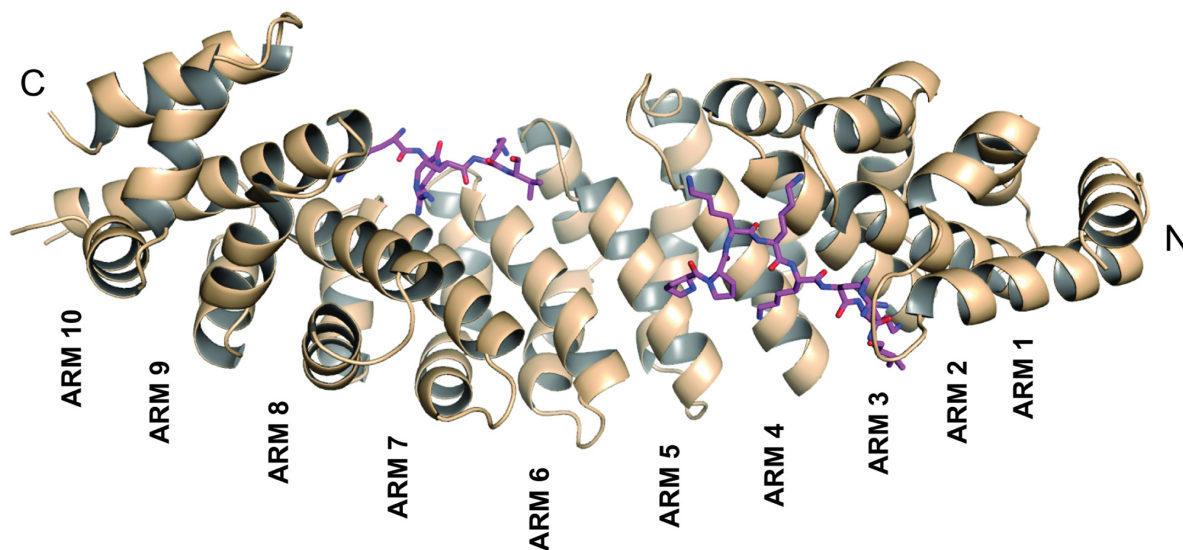


Fig 1. Overall structure of the NcImp α in complex with the SV40 NLS peptide. NcImp α structure represented in cartoon exhibits an elongated and curved shape composed of ten tandem Arm repeats. The SV40NLS peptides, represented in magenta sticks, are bound to the major (Arms 1–4) and minor (Arms 4–8) binding sites of NcImp α .

doi:10.1371/journal.pone.0128687.g001

complexes [10] and diffracted to high resolution (1.75 Å), which is the highest resolution obtained for an Imp α to date.

The final model of the NcImp α /SV40NLS complex consists of 428 residues of NcImp α (79–507), the peptide ligands bound to the major (seven residues) and minor (four residues) sites, and 349 water molecules (Table 1). The structure exhibits an elongated and curved shape composed of ten tandem Arm repeats, each containing three α -helices (H1, H2 and H3;), as observed in other Imp α structures [9, 10, 16, 30, 32] (Fig 1). The loop containing residues 461–465 could not be modeled due an absence of electron density. The concave surface of the protein maintains the conserved array of Trp and Asn residues and negatively charged residues that interact with positively charged residues from the NLS ligands.

Superposition of the C α atoms of NcImp α (residues 83–505) with other importin- α structures results in a root-mean-square deviation (r.m.s.d.) of 1.78 Å for Imp α from *M. musculus* (MmImp α ; 3UL1; [33]), 1.77 Å for human Imp α 5 (HsImp α 5; 4WV6; [34]), 1.22 Å for human Imp α 1 (HsImp α 1; 2JDQ; [35]), 1.21 Å for rice Imp α (OsImp α ; [36]) and 1.13 Å for yeast Imp α (ScImp α ; [9]).

Binding of the SV40 NLS peptide at the NcImp α major binding site

The SV40 NLS peptide binds the major binding site of NcImp α in an extended conformation with an orientation that is antiparallel to the Arm repeats. The electron density for the peptide in the major binding site is well defined, allowing for the unambiguous modeling of the eight peptide residues (¹²⁵PPKKRKRV¹³², Fig 2a). The SV40 NLS peptide exhibits a conserved binding mode at the major binding site, which is analogous to mouse (MmImp α ; [10]), yeast (ScImp α ; [9]) and rice (OsImp α ; [16]) Imp α proteins. The N-terminal residue (P125) also exhibits a conformation that is similar to that observed in the structures of OsImp α /SV40 NLS and MmImp α in complex with an extended SV40 NLS peptide (G110-G132, referred as

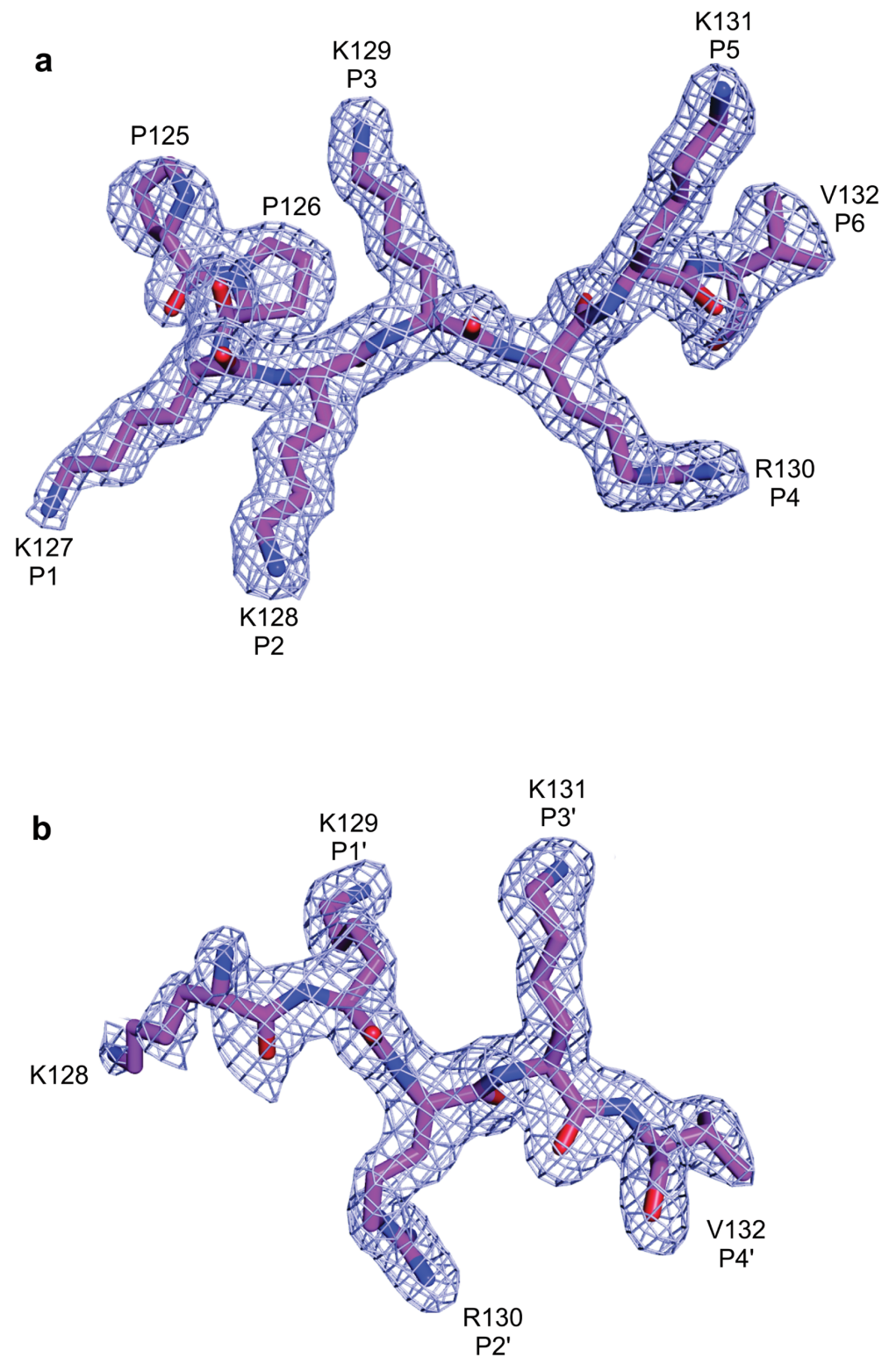


Fig 2. Electron-density map (coefficients $2|F_{obs}| - |F_{calc}|$) of the Nclmp α /SV40NLS structure in the area corresponding to SV40NLS peptides (contoured at 2.0 s.d.) at major (A) and minor (B) binding sites.

doi:10.1371/journal.pone.0128687.g002

CN-SV40NLS) [37]. ScImp α /SV40 NLS and MmImp α /SV40 NLS were crystallized using truncated version of the SV40 NLS peptide (P126-V132).

The average B-factor of the peptide at the major binding site ($33.2 \text{ \AA}^2$) is lower than the average B-factor for the protein ($37.7 \text{ \AA}^2$), indicating stability for the interaction of the peptide at this site. The conserved asparagines N150, N192 and N235 of NcImp α stabilize the backbone of the SV40 NLS peptide via hydrogen bonds, whereas the residues W146, W188 and W231 form pockets for the side chains of K129 and K131 at the P_3 and P_5 positions of the SV40NLS peptide, respectively. The K127 of SV40NLS participates in hydrophobic interactions with G195 of NcImp α at the P_1 binding site. K128 of SV40 NLS forms hydrogen bonds with G154, A152 and T159 and a salt bridge with D196 of NcImp α , as observed for lysine residues occupying the P_2 position in previous structures [9, 10]. In the P_4 site, the side chain of R130 interacts with L109 and K111 of NcImp α via hydrogen bonds and hydrophobic interactions with P115 and S153. Finally, K131 (position P_5) forms hydrogen bonds with Q185 and hydrophobic interactions with F142, and V132 (position P_6) forms a hydrogen bond with S110 of NcImp α (Fig 3a, S1 Fig).

Interestingly, the N-terminal residue P125 of the SV40NLS peptide, that is not in the P_1 – P_6 positions, forms hydrogen bonds and hydrophobic interactions with R238 and D270 of NcImp α . P125 aids in the stabilization of interactions between the protein and a peptide NLS at the major binding site, as observed previously for MmImp α /CN-SV40NLS and OsImp α /SV40NLS structures [16, 37].

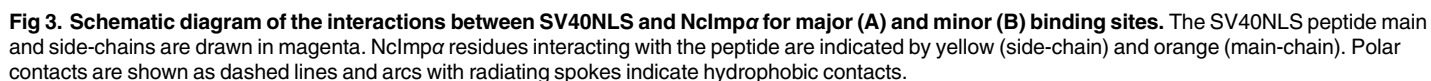
Binding of the SV40 NLS peptide at the NcImp α minor binding site

The electron density for the SV40 NLS peptide at the minor binding site is also well defined and allows the unambiguous modeling of four residues of the peptide ($^{128}\text{KRKV}^{132}$, Fig 2b). As observed for the major binding site, asparagines residues (N319 and N361 in this case) of NcImp α define and guide the backbone of the peptide. The average B-factor for the SV40 NLS peptide bound at the minor binding site of NcImp α is higher than the average B-factor for the protein (39.3 and $37.7 \text{ \AA}^2$, respectively), indicating a lower stability for the peptide at this site compared with the major site.

The interactions between the SV40NLS peptide and NcImp α in the minor site exhibit greater similarities with the interactions between this peptide and OsImp α [16] (Table 2) than those with MmImp α or ScImp α [9, 10]. In the NcImp α /SV40NLS structure, K129 at the P_1' position forms hydrogen bonds with G323, V321 and T328 of NcImp α . R130, which occupies the P_2' position, is accommodated between the hydrophobic side chains of W357 and W399 and interacts with E396 via salt bridges and with S360 via hydrogen bonds, which results in the lowest B-factor value ($36.2 \text{ \AA}^2$) compared to the other residues of the peptide. K131 at the P_3' position is stabilized by helix dipoles, negatively charged residues and hydrogen bonds with N283, G281, and T322. Finally, V132 at P_4' interacts with D280, R315 and N319 of NcImp α via hydrophobic interactions (Fig 3b, S2 Fig).

Affinity of the SV40 NLS peptide for NcImp α

The affinity and other thermodynamic parameters for the association of NcImp α and the SV40 NLS peptide were evaluated using ITC. A protein:peptide molar ratio of 1:20 was sufficient to yield a sigmoidal titration curve representing an exothermic process during complex formation (Fig 4). A two non-symmetrical binding site interaction model was selected based on the determined structure, which indicates the presence of two NLS binding sites in the Imp α protein with different binding modes. The equilibrium dissociation constants of $K_d = 1.23 \pm 0.22 \text{ \mu M}$ and $K_d = 1.69 \pm 0.46 \text{ \mu M}$ (Table 3) indicated that the SV40NLS peptide may bind to both sites



8 / 18

Table 2. Binding to specific pockets of Imp α /NLS structures from different organisms.

Minor Site										Linker										Major Site						
<i>P'</i> ₁ <i>P'</i> ₂ <i>P'</i> ₃ <i>P'</i> ₄										<i>P</i> ₁ <i>P</i> ₂ <i>P</i> ₃ <i>P</i> ₄ <i>P</i> ₅ <i>P</i> ₆																
Impα/NLS*					<u>K</u>	<u>R</u>	K	V							P	P	K	K	K	R	K	V				
NcImpα/SV40	P	P	K	K	<u>K</u>	<u>R</u>	K	V							S	P	P	K	K	K	R	K	V	G		
OsImpα/SV40	P	P	K	K	<u>K</u>	<u>R</u>	K	V	G	G																
MmImpα/SV40			P	K	<u>K</u>	<u>K</u>	R	K	V								P	K	K	K	R	K	V			
ScImpα/SV40		S	P	K	<u>K</u>	<u>K</u>	R	K							S	P	K	K	K	R	K	V				
MmImpα/CN–SV40				K	<u>K</u>	<u>R</u>	K	V			...	A	P	P	K	K	K	K	R	K	V					
MmImpα/hPLSCR4		G	S	I	I	<u>R</u>	K	W	N																	
MmImpα/TPX2				G	<u>K</u>	<u>R</u>	K	H	G	P	S	P	V	K	M	I	K	L								
MmImpα/Nucleoplasmin					<u>K</u>	<u>R</u>	P	A	A	T	K	K	A	G	Q	G	A	K	K	K	K					
MmImpα/N1N2	C	G	R	K	<u>K</u>	<u>R</u>	K	T	E	E	E	S	P	L	K	D	K	A	K	K	S	K	G	Y		
MmImpα/RB				C	G	<u>K</u>	<u>R</u>	S	A	E	G	S	N	P	P	K	P		L	K	K	L	R	G	Y	
MmImpα/FEN1			S	S	A	<u>K</u>	<u>R</u>	K	E	P	E	P	K	G	S		T		K	K	K	A	K	T		
MmImpα/Bimax1	R	R	R	R	P	<u>R</u>	<u>K</u>	<u>R</u>	P	L	E	W	D	E	D	E	E	P	P	R	K	R	K	R	L	W
MmImpα/Bimax2	R	R	R	R	R	<u>R</u>	<u>K</u>	<u>R</u>	K	R	E	W	D	D	D	D	D	P	P	K	K	R	R	R	L	D
OsImpα/A89	V	H	K	T	V	L	G	<u>K</u>	<u>K</u>	K	Y	M														
OsImpα/B54			S	V	L	G	<u>K</u>	<u>R</u>	K	R	H	P	K	V												
ScImpα/c–Myc			P	A	A	<u>K</u>	<u>R</u>	V	K	L	D					P	A	A	K	R	V	K	L	D		
HsImpα5/Nup50	P	L	G	S	M	A	<u>K</u>	<u>R</u>	N	A	E	K	E	L	T	D	...									

* Binding to specific binding pockets of Imp α based on structural data are shown in bold. The NLSs are aligned as observed to bind to the NLS-binding sites (P'_1 – P'_4 , minor binding site; P_1 – P_6 , major binding site, as defined in [11]). The suspension points corresponds to the extension of the NLS peptides that not bind into the linker region. NcImp α /SV40NLS; OsImp α /SV40NLS [16]; MmImp α /SV40NLS [10]; ScImp α /SV40NLS [9]; MmImp α /CN–SV40NLS [37]; MmImp α /hPLSCR4 [38]; MmImp α /TPX2 [39]; MmImp α /Nucleoplasmin [10]; MmImp α /N1N2 [7]; MmImp α /RB [7]; MmImp α /FEN1 [40]; MmImp α /Bimax1 [41]; MmImp α /Bimax2 [41]; OsImp α /A89 [16]; OsImp α /B54 [16]; ScImp α /c–Myc [11]; HsImp α 5/Nup50 [42].

doi:10.1371/journal.pone.0128687.t002

but with higher affinity for one site. These results are consistent with previous structural and functional results that indicate the presence of the major and minor binding sites in Imp α in complex with the SV40NLS peptide [9, 10] and are comparable with ITC experiments performed with MmImp α /SV40NLS complex [19]. Furthermore, the negative contribution for the enthalpy (ΔH) and positive value for the entropy (ΔS) suggest that both hydrogen bonds and hydrophobic interactions play a role in this interaction, whereas conformational changes are unfavorable. These data corroborate with the structural information obtained in the present study.

Discussion

Comparison of NcImp α with other Imp α structures

The crystal structure of NcImp α resembles other Imp α structures [9, 10, 16] but exhibits a conformation that is more concave compared with MmImp α (Fig 5a). Its superposition (residues 83–504) with other Imp α proteins reveals a higher r.m.s.d. for C α atoms for MmImp α (residues 78–496; PDB ID: 3UL1; r.m.s.d.: 1.78 Å) and HsImp α 1 (residues 78–493; PDB ID: 4WV6; r.m.s.d.: 1.77 Å) (Fig 5a) compared with ScImp α (residues 89–507; PDB ID: 1BK5; r.m.s.d.: 1.13 Å), OsImp α (residues 74–493; PDB ID: 4BQK; r.m.s.d.: 1.21 Å) and HsImp α 5 (residues 84–502; PDB ID: 2JDQ; r.m.s.d.: 1.22 Å) (Fig 5b). The primary sequence identities between

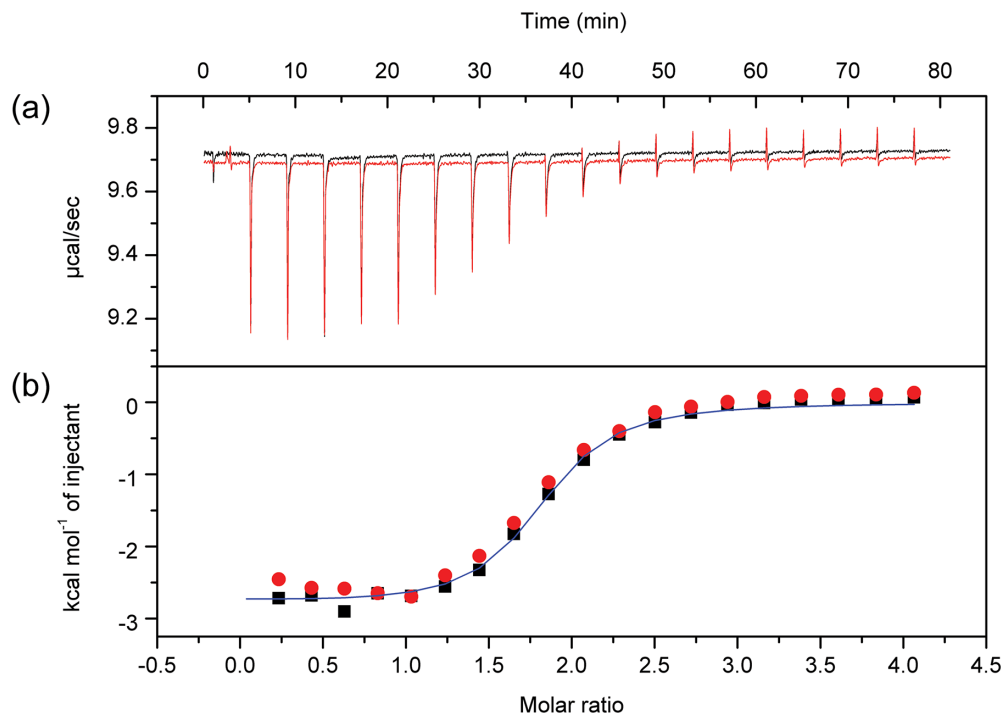


Fig 4. Isothermal calorimetric data for SV40NLS peptide binding to NcImp α . (a) Raw power output ($\mu\text{cal/s}$) per unit time (min) of replicate titrations (b) Integrated data ($\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ of injectant versus molar ratio of SV40NLS to NcImp α). These data were obtained from the raw power output as the area underneath each peak, which is then corrected for baseline heat injections and SV40NLS dilution heat and mixing. The solid line represents the best fit of the data.

doi:10.1371/journal.pone.0128687.g004

Table 3. Isothermal titration calorimetry data for SV40NLS binding to NcImp α .

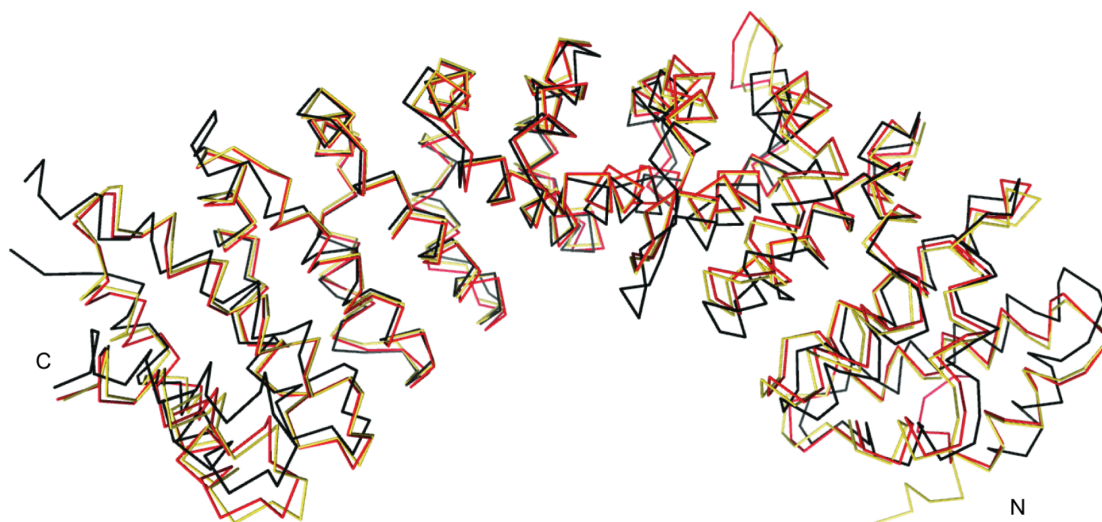
	Major site	Minor Site
N	0.89 ± 0.02	0.86 ± 0.02
K_d (μM)	1.23 ± 0.22	1.69 ± 0.46
ΔH (kcal/mol)	-2.47 ± 0.06	-3.21 ± 0.12
ΔS (cal/mol/deg)	18.3	15.1

doi:10.1371/journal.pone.0128687.t003

NcImp α and other Imp α proteins directly reflect the r.m.s.d. values for Ca atoms: ScImp α (64.69% identity; r.m.s.d.: 1.13 Å), OsImp α (63.16% identity; r.m.s.d.: 1.21 Å), HsImp α 5 (60.22% identity; r.m.s.d.: 1.22 Å), MmImp α (46.26% identity; r.m.s.d.: 1.78 Å), HsImp α 1 (45.01%; r.m.s.d.: 1.77 Å). Furthermore, ScImp α , OsImp α and HsImp α 5 belong to the same phylogenetic family as NcImp α (α 1 family; [43, 44]), whereas MmImp α and HsImp α 1 belongs to a different family (α 2 family). These sequence and structural comparisons raise an important question concerning Imp α from different organisms or isoforms from the same organism. How different is the binding mode of an NLS ligand to a particular Imp α ?

Several studies have shown that Imp α proteins from different families exhibit preferences for specific NLSs [45–48]. Thus, examining the binding mode of the SV40NLS peptide, which has been crystallized with various Imp α proteins, may provide insights into the binding specificities of these proteins. Crystal structures of Imp α /SV40NLS complexes have been

A



B

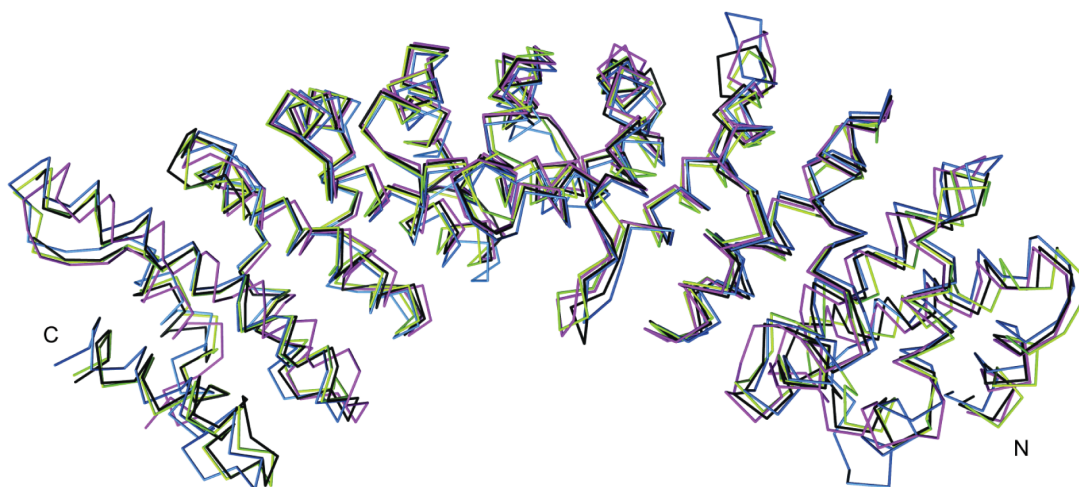


Fig 5. Comparison among Imp α crystal structures from different organisms. The Imp α proteins were superimposed using the C α atoms of each protein (residues 83–505) (a) NcImp α , MmImp α (PDB ID: 3UL1) and HsImp α 1 (PDB ID: 4WV6) are represented in black, red and orange, respectively. (b) NcImp α , Oslmp α (PDB ID: 4BQK), ScImp α (PDB ID: 1BK5) and HsImp α 5 (PDB ID: 2JDQ) are represented in black, blue, green and pink, respectively.

doi:10.1371/journal.pone.0128687.g005

determined for ScImp α [9], MmImp α (in complex with SV40NLS and with an extended SV40NLS peptide, referred to as CN-SV40— [10, 37]), Oslmp α [16] and NcImp α (the present study). In all of these structures, the SV40NLS peptide binds strongly to the major site via several interactions, resulting in well-defined electron density and B-factor values that are similar to or lower than the average B-factor value for the protein. These results are consistent with the determined affinities for the MmImp α /SV40NLS [19] and NcImp α /SV40NLS complexes using ITC, in which both studies demonstrated the presence of two binding sites for the peptide

exhibiting with different affinities. In all of these structures, SV40NLS binding to the major site is essentially identical, in which all six positions ($P_1 - P_6$) of the peptide ($^{127}\text{KKKRKV}^{132}$, Table 2) are occupying similar regions at the protein. The main differences are related to the number of peptide residues bound before the P_1 position (OsImp α exhibits 4 residues before P_1 , NcImp α exhibits 2 residues, MmImp α exhibits 1 residue and MmImp α /CN-SV40NLS exhibits 4 residues). However, these differences result from the length of the SV40NLS peptide used in these structural studies rather than differences in Imp α proteins from different organisms.

The role of the minor binding site for NcImp α specificity

The major site was usually associated with the binding of monopartite NLSs, whereas the minor site was associated with a secondary binding site for bipartite NLSs [7, 10, 40]. Recently, studies have demonstrated that some monopartite NLSs may bind to only the minor site [16, 38], indicating the importance of this binding site for Imp α specificity for cargo proteins.

In contrast to the binding of SV40NLS to the major site (Fig 6a), the binding mode of the peptide at the minor binding site is different among different Imp α proteins. As shown in Table 2 and Fig 6b, SV40NLS binds to ScImp α and MmImp α via Lys and Arg residues at the P_1' and P_2' positions, whereas the peptide binds OsImp α and NcImp α via Lys residues at both P_1' and P_2' positions, i.e., the binding of the peptide is shifted one position in the OsImp α and NcImp α structures.

Interestingly, Lys and Arg residues at the P_1' and P_2' positions, respectively, are observed for the majority of monopartite (hPLSCR1, hPLSCR4, c-Myc, and TPX2 [11, 38, 39, 49]) and bipartite NLS complexes (nucleoplasmin, N1N2, RB and FEN1 [10, 37, 40]), and it is also the predominant binding mode for MmImp α /CN-SV40NLS [37]. Furthermore, the authors of MmImp α /SV40NLS structure [10] also observed staggering of peptide one position N-terminally which may lead to an alternative binding mode with Lys and Arg residues at the P_1' and P_2' positions. The binding of KK residues at the P_1' and P_2' positions for SV40NLS in MmImp α and ScImp α seems to be exceptions in these particular cases.

An additional interesting characteristic of SV40NLS binding to Imp α is the presence of additional interactions between both the N- and the C-termini of the peptide and MmImp α in the minor site: two positions before P_1' (P126, N-terminus) and in the P_5' position (V132). These interactions are observed in only the mammalian receptor despite all SV40NLS peptides used for crystallization with Imp α proteins have these same residues. Structural studies on OsImp α have indicated that the plant-specific NLS peptide preferentially binds at the minor site in OsImp α and at the major site in MmImp α [16]. The similarity of SV40NLS binding at the minor site between OsImp α and NcImp α raises questions concerning the importance of this NLS binding site for the import mechanism of *N. crassa*.

Chang and colleagues [16] observed the presence of non-conserved residues between OsImp α and MmImp α (S394, R427, E434, E480, and K484 for OsImp α) in the region near the minor site (Arm repeats 8 and 9) and toward the C-terminus may be responsible for the specificity of NLS binding for OsImp α . Multiple sequence alignment of Imp α proteins (Fig 7a) indicates that some of these residues that are present in OsImp α (S394, E480 and K484) are also present in NcImp α (S402, E493, and K497) and in other Imp α proteins from the $\alpha 1$ family (S408, R443 and K500 in ScImp α and E491 and K495 in HsImp α). Structural comparison between NcImp α and MmImp α (Fig 7b) shows that these three residues (S402, E493, and K497 in NcImp α) are substituted by T402, S483 and A487 for MmImp α indicating that favorable interaction of particular peptides may occur. Particularly, T402 in MmImp α (S402 in NcImp α) has been reported to lie in an identical position as S394 in the OsImp α structure, sterically

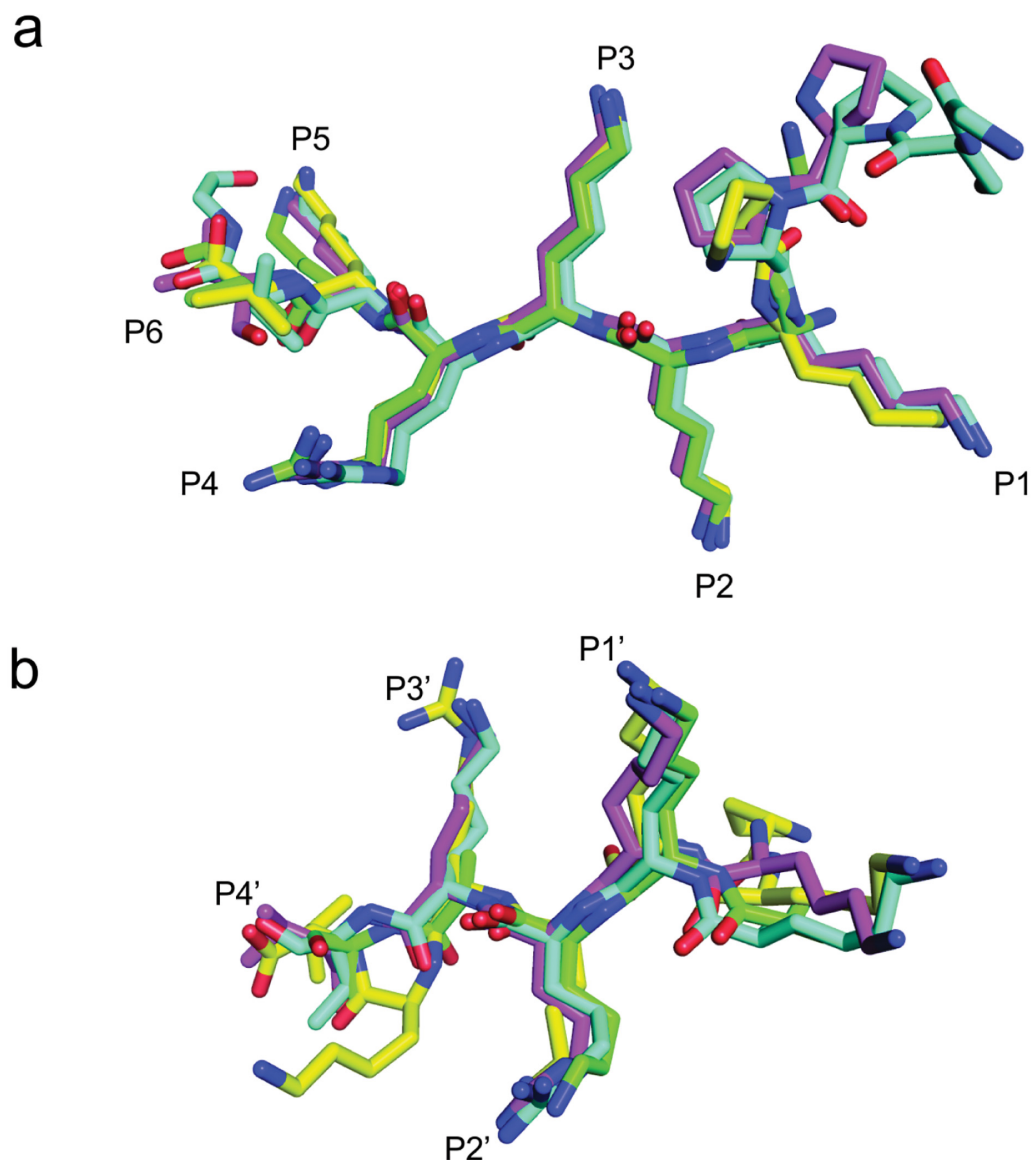


Fig 6. Comparison of SV40NLS peptides binding to the major (a) and minor (b) binding sites for Imp α structures from different organisms. SV40NLS peptides in complex with NcImp α (magenta), ScImp α (green), OsImp α (blue) and MmImp α (yellow) were superimposed using the C α atoms of the peptides. Positions binding corresponding to the major (P₁-P₅) and minor (P₁'-P₄') sites are identified along the chains (binding pocket labels were based on peptide binding with NcImp α).

doi:10.1371/journal.pone.0128687.g006

preventing the binding of the plant-specific NLS peptide to MmImp α [16]. However, these substitutions may also prevent the binding of K127 of SV40NLS to NcImp α and OsImp α , explaining the presence of this interaction in MmImp α , which belongs to the α 2 family, and the absence of this interaction in NcImp α , which belongs to the α 1 family.

The majority of monopartite (hPLSCR4, c-Myc, and TPX2 [11, 38, 39]) and bipartite NLS complexes (nucleoplasmin, N1N2, RB and FEN1 [7, 10, 40]) presented KR residues at the P₁' and P₂' positions which seems to be the most favorable residues to occupy these positions. The binding of KK residues at the P₁' and P₂' positions for SV40NLS in MmImp α seems to be an exception which probably occurs because it is also favorable [10] to bind additional residues at

a	NcImpα	NIVTGGDDVQTQVIINC	GALPCLLSLLSS-NKDGIRKEACWTISNITAGNS	367
	ScImpα	NIVTGNLDLQTQVVINAGVLPALRLLSS-PKENIKKEACWTISNITAGNT		373
	OsImpα	NIVTGGDDAQTQCIIDHQALPCLLSLLTQNLKKS	IKKEACWTISNITAGNK	359
	HsImpα5	NIVTGGDDIQTQVILNCSALQSLHLHLLSS-PKESIKKEACWTISNITAGNR		370
	HsImpα1	NIVTGTDEQTQVVIDAGALAVFPSLLTN-PKTNIQKEATWTMSNITAGRQ		367
	MmImpα	NIVTGTDEQTQKVIDAGALAVFPSLLTN-PKTNIQKEATWTMSNITAGRQ		367
	NcImpα	AQIQSVIDANIIPPLIHLLSHADLKTRKEACWAI	SNATSGGLQKPDQIRY	417
	ScImpα	EQIQAVIDANLIPPLVKLLEVAEYKTKKEACWAI	SNASSGGLQRPDIIRY	423
	OsImpα	DQIQAVINAGIIGPLVNLQTAEFDIKKEAAWAI	SNATSGGSH--DQIKY	407
	HsImpα5	AQIQTVIDANIFPALISILQTAEFRTRKEAAWAI	TNATSGGSA--EQIKY	418
	HsImpα1	DQIQQVNVHGLVPFLVSVLSKADFQTQKEAVWAV	TNYTSGGTV--EQIVY	415
	MmImpα	DQIQQVNVHGLVPFLVGVLSKADFQTQKEAAWAI	TNYTSGGTV--EQIVY	415
	NcImpα	LVAQGCICKPLCDLLACPDNKIIQVALDGLLENILKVG	EELDKNAAGDGPDSI	467
	ScImpα	LVSQGCICKPLCDLLEIADNRIIEVTLDALLENILKM	GEADKEARG---LNI	470
	OsImpα	LVSEGCICKPLCDLLICPDIRIVTVCLEGLLENILKVG	ETDKTLAAG---DV	454
	HsImpα5	LVELGCIKPLCDLLTVMSDKIVQVALNGLLENILRL	GEQEAQRNGT---GI	465
	HsImpα1	LVHCGIIEPLMNLLTAKDTKIILVILDAISNIFQAAEK	---LG---ET	457
	MmImpα	LVHCGIIEPLMNLLSAKDTKIIQVILDAISNIFQAAEK	---LG---ET	457
	NcImpα	NRYALFIEECGGMEKIHDCQTNANE	EIYMKAYNIIIEKYFSDEDEAGDEAM	517
	ScImpα	NENADFIEKAGGMEKIFNCQQNEND	KIYEKAYKIIETYFG-----	510
	OsImpα	NVFSQMIDEAEGLEKIEENLQSHDNNE	EYKAVKILEAYWMDEEDD----	499
	HsImpα5	NPYCALIEEAYGLDKIEFLQSHENQ	EIYQKAFDLIEHYFGTEDEDSS---	512
	HsImpα1	EKLSIMIEECGGGLDKIEALQNHENE	SVYKASLSLIEKYFSVEEEE----	502
	MmImpα	EKLSIMIEECGGGLDKIEALQNHENE	SVYKASLNLIEKYFSVEEEE----	502

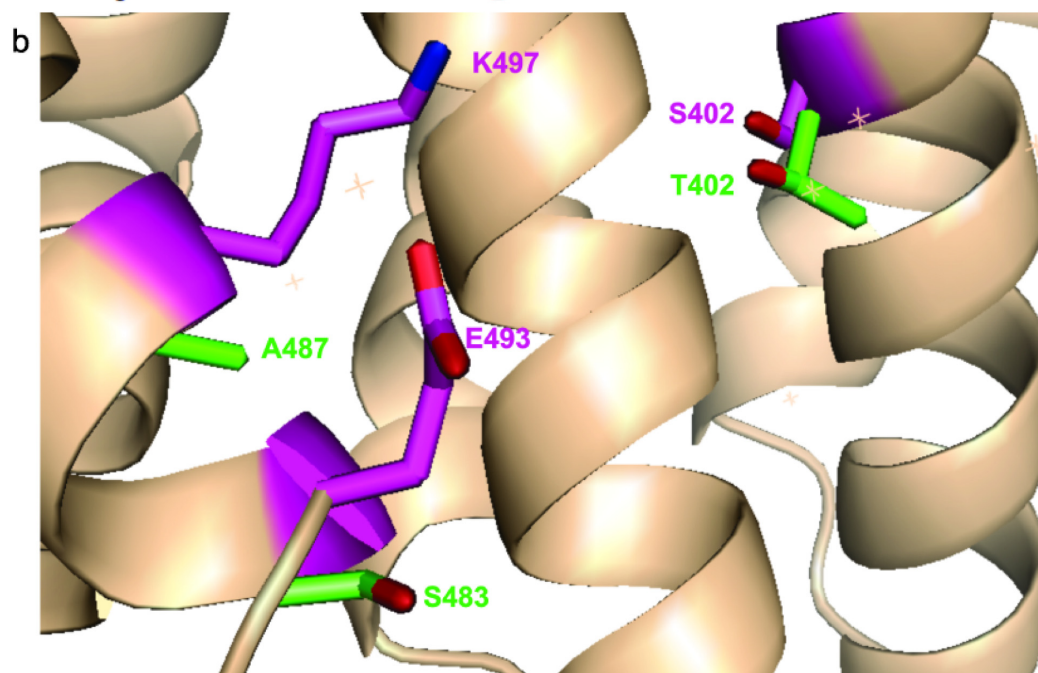


Fig 7. Non-conserved residues between Imp α proteins near the minor NLS binding region. (a) Partial alignment of amino acid sequences of Imp α proteins from different organisms. Conserved residues are shown in black. The residues S402, K497 and E493 for NcImp α and their equivalent residues for Imp α proteins are shown in red. (b) Superposition between Ca of NcImp α and MmImp α structures (performed as described in Fig 5) highlights the residues S402, K497 and E493 of NcImp α (magenta) and the residues T402, S483 and A487 of MmImp α (green). These particular residues may be associated to NLS binding specificity to the minor NLS binding site. E493 side-chain is shown in a hypothetical conformation in this figure because this residue presents lack of electron density in this structure due to its high flexibility.

doi:10.1371/journal.pone.0128687.g007

the N- and C-terminal regions of the peptide for some Imp α proteins. For OsImp α /SV40NLS and NcImp α /SV40NLS complexes, KR binding at the P_1 and P_2 positions is more favorable because fewer interactions occur with the N- and C-terminal regions of the peptide. This observation accounts for the shift in the binding of SV40NLS to OsImp α and NcImp α compared with MmImp α .

Affinity assays between NLS peptides and Imp α proteins have been performed based in indirect affinity measurements [16, 40, 49–54], using Surface Plasmon Resonance (SPR) [32], and ITC [19, 38, 55]. Indirect affinity measurements between NLSs and Imp α proteins reported dissociation constants in the nM range and permitted the comparison among these molecules. SPR experiments was only able to estimate the peptide-protein affinity in the μ M range which was lately confirmed by ITC experiments. The comparison between ITC analysis of MmImp α /SV40NLS [19] and NcImp α /SV40NLS is consistent with the features of the minor binding site observed in the structure. The higher affinity of the peptide at the minor binding site for MmImp α ($K_d = 0.98 \pm 0.08 \mu\text{M}$) compared with NcImp α ($K_d = 1.69 \pm 0.46 \mu\text{M}$) may be associated with the presence of additional interactions at N- and C-termini in the MmImp α /SV40NLS complex. The crystal structure of this complex [10] has revealed that the residues K131 and V132 of the SV40 NLS peptide form salt bridges with the conserved E354 and R315 of MmImp α , respectively. Additionally, a hydrogen bond between V132 and R135 aids in the stabilization of the backbone of the SV40 NLS C-terminus. The importance of additional interactions N- and C-termini has been also observed with ITC assays for a phosphorylated NLS peptide which enhanced by 10-fold its affinity to MmImp α compared to unphosphorylated version [54]. Furthermore, it has been observed that the full length nucleoplasmin protein binds to Imp α /Imp β complex with a 2-fold increase in affinity compared to just nucleoplasmin NLS peptide [53]. Interesting, ITC studies with the hPLSCR4 NLS peptide ($^{273}\text{GSIIRKWN}^{280}$) which binds only the minor site of MmImp α [38] showed lower affinity ($K_d = 48.7 \pm 6.5 \mu\text{M}$) compared with that of the SV40NLS peptide. This fact may be mainly attributed to the absence of a positively charged residue in the hPLSCR4 peptide at the P_1 ' position.

In conclusion, despite the structural similarities among Imp α proteins, this study and other recent studies with this receptor from different organisms or different isoforms from the same organism clearly demonstrated differences in the binding specificities for cargo proteins. The differences between NcImp α and MmImp α may result from the phylogenetic distance among the proteins and the functions of each protein family in organism development, which results in differences in affinities for NLSs. The elucidation of NcImp α in complex with specific NLSs peptides from fungi may provide an explanation for the differences between these proteins.

Supporting Information

S1 Fig. Schematic diagram of the interactions between the SV40NLS peptide (purple) and NcImp α (orange) at the major binding site. Polar contacts are shown with dashed lines, and hydrophobic contacts are indicated bay arcs with radiating spokes. Carbon, nitrogen and oxygen atoms are shown in black, blue and red, respectively. Generated with the program LIGPLOT [26].

(EPS)

S2 Fig. Schematic diagram of the interactions between the SV40NLS peptide (purple) and NcImp α (orange) at the minor binding site. Polar contacts are shown with dashed lines, and hydrophobic contacts are indicated bay arcs with radiating spokes. Carbon, nitrogen and oxygen atoms are shown in black, blue and red, respectively. Generated with the program LIGPLOT [26].

(EPS)

Acknowledgments

This work was financially supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil) and PNPd/ CAPES providing research grants and fellowships.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MRMF AAST MCB. Performed the experiments: NEB TRD FZF AAST. Analyzed the data: MRMF AAST MCB NEB TRD FZF. Contributed reagents/materials/analysis tools: MRMF MCB. Wrote the paper: MRMF AAST MCB NEB TRD FZF.

References

- Galagan JE, Calvo SE, Borkovich KA, Selker EU, Read ND, Jaffe D, et al. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*. 2003 Apr; 422(6934):859–868. PMID: [12712197](#)
- Freitas FZ, Chapeaurouge A, Perales J, Bertolini MC. A systematic approach to identify STRE-binding proteins of the *gsn* glycogen synthase gene promoter in *Neurospora crassa*. *Proteomics*. 2008 May; 8(10):2052–2061. doi: [10.1002/pmic.200700921](#) PMID: [18425733](#)
- Gonçalves RD, Cupertino FB, Freitas FZ, Luchessi AD, Bertolini MC. A genome-wide screen for *Neurospora crassa* transcription factors regulating glycogen metabolism. *Mol Cell Proteomics*. 2011 Nov; 10(11):M111.007963. doi: [10.1074/mcp.M111.007963](#) PMID: [21768394](#)
- Stewart M. Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Mar; 8(3):195–208. doi: [10.1038/nrm2114](#) PMID: [17287812](#)
- Chook YM, Blobel G. Structure of the nuclear transport complex karyopherin-beta2-Ran x GppNHp. *Nature*. 1999 May; 399(6733):230–237. doi: [10.1038/20375](#) PMID: [10353245](#)
- Dingwall C, Laskey RA. Nuclear targeting sequences—a consensus? *Trends Biochem Sci*. 1991 Dec; 16(12):478–481. doi: [10.1016/0968-0004\(91\)90184-W](#)
- Fontes MRM, Teh T, Jans D, Brinkworth RI, Kobe B. Structural basis for the specificity of bipartite nuclear localization sequence binding by importin- α . *J Biol Chem*. 2003 Jul; 278(30):27981–27987. doi: [10.1074/jbc.M303275200](#) PMID: [12695505](#)
- Kosugi S, Hasebe M, Matsumura N, Takashima H, Miyamoto-Sato E, Tomita M, et al. Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin α . *J Biol Chem*. 2009 Jan; 284(1):478–485. doi: [10.1074/jbc.M807017200](#) PMID: [19001369](#)
- Conti E, Uy M, Leighton L, Blobel G, Kuriyan J. Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin α . *Cell*. 1998 Jul; 94(2):193–204. doi: [10.1016/S0092-8674\(00\)81419-1](#) PMID: [9695948](#)
- Fontes MR, Teh T, Kobe B. Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin- α . *J Mol Biol*. 2000 Apr; 297(5):1183–1194. doi: [10.1006/jmbi.2000.3642](#) PMID: [10764582](#)
- Conti E, Kuriyan J. Crystallographic analysis of the specific yet versatile recognition of distinct nuclear localization signals by karyopherin α . *Structure*. 2000 Mar; 8(3):329–338. doi: [10.1016/S0969-2126\(00\)00107-6](#) PMID: [10745017](#)
- Rexach M, Blobel G. Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. *Cell*. 1995 Dec; 83(5):683–692. doi: [10.1016/0092-8674\(95\)90181-7](#) PMID: [8521485](#)
- Stinnett SM, Espeso EA, Cobeño L, Araújo-Bazán L, Calvo AM. *Aspergillus nidulans* VeA subcellular localization is dependent on the importin α carrier and on light. *Mol Microbiol*. 2007 Jan; 63(1):242–255. doi: [10.1111/j.1365-2958.2006.05506.x](#) PMID: [17163983](#)
- Cupertino FB, Freitas FZ, de Paula RM, Bertolini MC. Ambient pH controls glycogen levels by regulating glycogen synthase gene expression in *Neurospora crassa*. New insights into the pH signaling pathway. *PLoS One*. 2012; 7(8):e44258. doi: [10.1371/journal.pone.0044258](#) PMID: [22952943](#)
- Marfori M, Mynott A, Ellis JJ, Mehdi AM, Saunders NFW, Curmi PM, et al. Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Sep; 1813(9):1562–1577. doi: [10.1016/j.bbamcr.2010.10.013](#) PMID: [20977914](#)

16. Chang CW, Couñago RLM, Williams SJ, Bodén M, Kobe B. Crystal structure of rice importin- α and structural basis of its interaction with plant-specific nuclear localization signals. *Plant Cell*. 2012 Dec; 24(12):5074–5088. doi: [10.1105/tpc.112.104422](https://doi.org/10.1105/tpc.112.104422) PMID: [23250448](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23250448/)
17. Takeda AAS, Freitas FZ, Magro AJ, Bernardes NE, Fernandes CAH, Gonçalves RD, et al. Biophysical characterization of the recombinant importin- α from *Neurospora crassa*. *Protein Pept Lett*. 2013 Jan; 20(1):8–16. doi: [10.2174/09298665130103](https://doi.org/10.2174/09298665130103) PMID: [22789101](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22789101/)
18. Knudsen NØ, Andersen SD, Lützen A, Nielsen FC, Rasmussen LJ. Nuclear translocation contributes to regulation of DNA excision repair activities. *DNA Repair (Amst)*. 2009 Jun; 8(6):682–689. doi: [10.1016/j.dnarep.2009.03.005](https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.03.005)
19. Cutress ML, Whitaker HC, Mills IG, Stewart M, Neal DE. Structural basis for the nuclear import of the human androgen receptor. *J Cell Sci*. 2008 Apr; 121(Pt 7):957–968.
20. Bernardes NE, Takeda AAS, Freitas FZ, Bertolini MC, Fontes MRM. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of importin- α from *Neurospora crassa*. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*. 2014 Apr; 70(Pt 4):501–504. doi: [10.1107/S2053230X14005068](https://doi.org/10.1107/S2053230X14005068) PMID: [24699749](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24699749/)
21. Otwinowski Z, Minor W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. In: Charles W Carter J, editor. *Macromolecular Crystallography Part A*. vol. 276 of *Methods in Enzymology*. Academic Press; 1997. p. 307–326.
22. McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Storoni LC, Read RJ. Likelihood-enhanced fast translation functions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2005 Apr; 61(Pt 4):458–464. doi: [10.1107/S0907444905001617](https://doi.org/10.1107/S0907444905001617) PMID: [15805601](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15805601/)
23. Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2004 Dec; 60(Pt 12 Pt 1):2126–2132. doi: [10.1107/S0907444904019158](https://doi.org/10.1107/S0907444904019158) PMID: [15572765](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15572765/)
24. Adams PD, Afonine PV, Bunkóczi G, Chen VB, Davis IW, Echols N, et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2010 Feb; 66(Pt 2):213–221. doi: [10.1107/S0907444909052925](https://doi.org/10.1107/S0907444909052925) PMID: [20124702](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20124702/)
25. Chen VB, Arendall WB 3rd, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2010 Jan; 66(Pt 1):12–21. doi: [10.1107/S0907444909042073](https://doi.org/10.1107/S0907444909042073) PMID: [20057044](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20057044/)
26. Wallace AC, Laskowski RA, Thornton JM. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng*. 1995 Feb; 8(2):127–134. doi: [10.1093/protein/8.2.127](https://doi.org/10.1093/protein/8.2.127) PMID: [7630882](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7630882/)
27. DeLano WL. The PyMOL Molecular Graphics System; 2002. Available from: <http://www.pymol.org>.
28. Kabsch W. A solution for the best rotation to relate two sets of vectors. *Acta Crystallographica Section A*. 1976 Sep; 32(5):922–923. doi: [10.1107/S0567739476001873](https://doi.org/10.1107/S0567739476001873)
29. Winn MD, Ballard CC, Cowtan KD, Dodson EJ, Emsley P, Evans PR, et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2011 Apr; 67(Pt 4):235–242. doi: [10.1107/S0907444910045749](https://doi.org/10.1107/S0907444910045749) PMID: [21460441](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21460441/)
30. Kobe B. Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin alpha. *Nat Struct Biol*. 1999 Apr; 6(4):388–397. doi: [10.1038/7625](https://doi.org/10.1038/7625) PMID: [10201409](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10201409/)
31. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*. 1993 Apr; 26(2):283–291. doi: [10.1107/S0021889892009944](https://doi.org/10.1107/S0021889892009944)
32. Catimel B, Teh T, Fontes MR, Jennings IG, Jans DA, Howlett GJ, et al. Biophysical characterization of interactions involving importin-alpha during nuclear import. *J Biol Chem*. 2001 Sep; 276(36):34189–34198. doi: [10.1074/jbc.M103531200](https://doi.org/10.1074/jbc.M103531200) PMID: [11448961](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11448961/)
33. Marfori M, Lonhienne TG, Forwood JK, Kobe B. Structural basis of high-affinity nuclear localization signal interactions with importin- α . *Traffic*. 2012 Apr; 13(4):532–548. doi: [10.1111/j.1600-0854.2012.01329.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2012.01329.x) PMID: [22248489](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22248489/)
34. Trowitzsch S, Viola C, Scheer E, Conic S, Chavant V, Fournier M, et al. Cytoplasmic TAF2-TAF8-TAF10 complex provides evidence for nuclear holo-TFIID assembly from preformed submodules. *Nat Commun*. 2015; 6:6011. doi: [10.1038/ncomms7011](https://doi.org/10.1038/ncomms7011) PMID: [25586196](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25586196/)
35. Tarendeau F, Boudet J, Guilligay D, Mas PJ, Bougault CM, Boulo S, et al. Structure and nuclear import function of the C-terminal domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *Nat Struct Mol Biol*. 2007 Mar; 14(3):229–233. doi: [10.1038/nsmb1212](https://doi.org/10.1038/nsmb1212) PMID: [17310249](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17310249/)
36. Chang CW, Williams SJ, Couñago RM, Kobe B. Structural basis of interaction of bipartite nuclear localization signal from *Agrobacterium* VirD2 with rice importin- α . *Mol Plant*. 2014 Jun; 7(6):1061–1064. doi: [10.1093/mp/ssu014](https://doi.org/10.1093/mp/ssu014) PMID: [24503158](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24503158/)

37. Fontes MRM, Teh T, Toth G, John A, Pavo I, Jans DA, et al. Role of flanking sequences and phosphorylation in the recognition of the simian-virus-40 large T-antigen nuclear localization sequences by importin- α . *Biochem J*. 2003 Oct; 375(Pt 2):339–349. doi: [10.1042/BJ20030510](https://doi.org/10.1042/BJ20030510) PMID: [12852786](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12852786/)
38. Lott K, Bhardwaj A, Sims PJ, Cingolani G. A minimal nuclear localization signal (NLS) in human phospholipid scramblase 4 that binds only the minor NLS-binding site of importin α 1. *J Biol Chem*. 2011 Aug; 286(32):28160–28169. doi: [10.1074/jbc.M111.228007](https://doi.org/10.1074/jbc.M111.228007) PMID: [21690087](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21690087/)
39. Giesecke A, Stewart M. Novel binding of the mitotic regulator TPX2 (target protein for Xenopus kinesin-like protein 2) to importin- α . *J Biol Chem*. 2010 Jun; 285(23):17628–17635. doi: [10.1074/jbc.M110.102343](https://doi.org/10.1074/jbc.M110.102343) PMID: [20335181](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20335181/)
40. de Barros AC, Takeda AAS, Chang CW, Kobe B, Fontes MRM. Structural basis of nuclear import of flap endonuclease 1 (FEN1). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2012 Jul; 68(Pt 7):743–750. doi: [10.1107/S0907444912010281](https://doi.org/10.1107/S0907444912010281) PMID: [22751659](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22751659/)
41. Kosugi S, Hasebe M, Entani T, Takayama S, Tomita M, Yanagawa H. Design of peptide inhibitors for the importin α /beta nuclear import pathway by activity-based profiling. *Chem Biol*. 2008 Sep; 15(9):940–949. doi: [10.1016/j.chembiol.2008.07.019](https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.07.019) PMID: [18804031](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18804031/)
42. Pumroy RA, Nardozzi JD, Hart DJ, Root MJ, Cingolani G. Nucleoporin Nup50 stabilizes closed conformation of armadillo repeat 10 in importin α 5. *J Biol Chem*. 2012 Jan; 287(3):2022–2031. doi: [10.1074/jbc.M111.315838](https://doi.org/10.1074/jbc.M111.315838) PMID: [22130666](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22130666/)
43. Goldfarb DS, Corbett AH, Mason DA, Harreman MT, Adam SA. Importin α : a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends Cell Biol*. 2004 Sep; 14(9):505–514. doi: [10.1016/j.tcb.2004.07.016](https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.07.016) PMID: [15350979](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15350979/)
44. Köhler M, Ansieau S, Prehn S, Leutz A, Haller H, Hartmann E. Cloning of two novel human importin- α subunits and analysis of the expression pattern of the importin- α protein family. *FEBS Lett*. 1997 Nov; 417(1):104–108. doi: [10.1016/S0014-5793\(97\)01265-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01265-9) PMID: [9395085](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9395085/)
45. Köhler M, Haller H, Hartmann E. Nuclear Protein Transport Pathways. *Nephron Experimental Nephrology*. 1999; 7:290–294. doi: [10.1159/000020616](https://doi.org/10.1159/000020616)
46. Sekimoto T, Imamoto N, Nakajima K, Hirano T, Yoneda Y. Extracellular signal-dependent nuclear import of Stat1 is mediated by nuclear pore-targeting complex formation with NPI-1, but not Rch1. *EMBO J*. 1997 Dec; 16(23):7067–7077. doi: [10.1093/emboj/16.23.7067](https://doi.org/10.1093/emboj/16.23.7067) PMID: [9384585](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9384585/)
47. Fang X, Chen T, Tran K, Parker CS. Developmental regulation of the heat shock response by nuclear transport factor karyopherin- α 3. *Development*. 2001 Sep; 128(17):3349–3358. PMID: [11546751](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11546751/)
48. Mason DA, Fleming RJ, Goldfarb DS. *Drosophila melanogaster* importin α 1 and α 3 can replace importin α 2 during spermatogenesis but not oogenesis. *Genetics*. 2002 May; 161(1):157–170. PMID: [12019231](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12019231/)
49. Chen MH, Ben-Efraim I, Mitrousis G, Walker-Kopp N, Sims PJ, Cingolani G. Phospholipid scramblase 1 contains a nonclassical nuclear localization signal with unique binding site in importin α . *J Biol Chem*. 2005 Mar; 280(11):10599–10606. doi: [10.1074/jbc.M413194200](https://doi.org/10.1074/jbc.M413194200) PMID: [15611084](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15611084/)
50. Wirthmueller L, Roth C, Banfield MJ, Wiermer M. Hop-on hop-off: importin- α -guided tours to the nucleus in innate immune signaling. *Front Plant Sci*. 2013; 4:149. doi: [10.3389/fpls.2013.00149](https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00149) PMID: [23734157](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23734157/)
51. Yang SNY, Takeda AAS, Fontes MRM, Harris JM, Jans DA, Kobe B. Probing the specificity of binding to the major nuclear localization sequence-binding site of importin- α using oriented peptide library screening. *J Biol Chem*. 2010 Jun; 285(26):19935–19946. doi: [10.1074/jbc.M109.079574](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.079574) PMID: [20406804](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20406804/)
52. Takeda AAS, de Barros AC, Chang CW, Kobe B, Fontes MRM. Structural basis of importin- α -mediated nuclear transport for Ku70 and Ku80. *J Mol Biol*. 2011 Sep; 412(2):226–234. doi: [10.1016/j.jmb.2011.07.038](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.07.038) PMID: [21806995](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21806995/)
53. Falces J, Arregi I, Konarev PV, Urbaneja MA, Svergun DI, Taneva SG, et al. Recognition of nucleoplasmin by its nuclear transport receptor importin α/β : insights into a complete import complex. *Biochemistry*. 2010 Nov; 49(45):9756–9769. doi: [10.1021/bi101179g](https://doi.org/10.1021/bi101179g) PMID: [20925424](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20925424/)
54. Róna G, Marfori M, Borsos M, Scheer I, Takács E, Tóth J, et al. Phosphorylation adjacent to the nuclear localization signal of human dUTPase abolishes nuclear import: structural and mechanistic insights. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2013 Dec; 69(Pt 12):2495–2505. PMID: [24311590](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24311590/)
55. Ge Q, Nakagawa T, Wynn RM, Chook YM, Miller BC, Uyeda K. Importin- α protein binding to a nuclear localization signal of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP). *J Biol Chem*. 2011 Aug; 286(32):28119–28127. doi: [10.1074/jbc.M111.237016](https://doi.org/10.1074/jbc.M111.237016) PMID: [21665952](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21665952/)



Structural and functional evidence for membrane docking and disruption sites on phospholipase A₂-like proteins revealed by complexation with the inhibitor suramin

Guilherme H. M. Salvador,^a Thiago R. Dreyer,^a Walter L. G. Cavalcante,^a Fábio F. Mاتيoli,^a Juliana I. dos Santos,^a Adrian Velazquez-Campoy,^{b,c} Márcia Gallacci^d and Marcos R. M. Fontes^{a*}

Received 6 May 2015

Accepted 31 July 2015

Edited by J. L. Martin, University of Queensland, Australia

Keywords: phospholipase A₂-like proteins; myotoxic mechanism; snakebite envenomation; suramin.

PDB reference: myotoxin II from *Bothrops moojeni* complexed with suramin, 4yv5

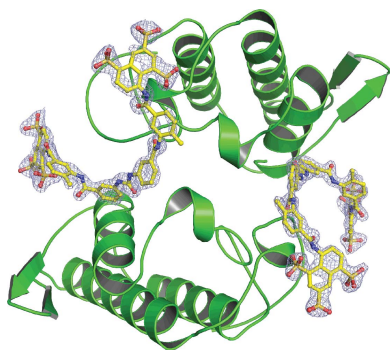
Supporting information: this article has supporting information at journals.iucr.org/d

^aDepartment of Physics and Biophysics, Institute of Biosciences, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brazil, ^bInstitute of Biocomputation and Physics of Complex Systems (BIFI), Joint Unit IQFR–CSIC–BIFI and Department of Biochemistry and Molecular and Cell Biology, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain, ^cFundación ARAID, Government of Aragon, Zaragoza, Spain, and ^dDepartment of Pharmacology, Institute of Biosciences, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brazil. *Correspondence e-mail: fontes@ibb.unesp.br

Local myonecrosis resulting from snakebite envenomation is not efficiently neutralized by regular antivenom administration. This limitation is considered to be a significant health problem by the World Health Organization. Phospholipase A₂-like (PLA₂-like) proteins are among the most important proteins related to the muscle damage resulting from several snake venoms. However, despite their conserved tertiary structure compared with PLA₂s, their biological mechanism remains incompletely understood. Different oligomeric conformations and binding sites have been identified or proposed, leading to contradictory data in the literature. In the last few years, a comprehensive hypothesis has been proposed based on fatty-acid binding, allosteric changes and the presence of two different interaction sites. In the present study, a combination of techniques were used to fully understand the structural–functional characteristics of the interaction between suramin and MjTX-II (a PLA₂-like toxin). *In vitro* neuromuscular studies were performed to characterize the biological effects of the protein–ligand interaction and demonstrated that suramin neutralizes the myotoxic activity of MjTX-II. The high-resolution structure of the complex identified the toxin–ligand interaction sites. Calorimetric assays showed two different binding events between the protein and the inhibitor. It is demonstrated for the first time that the inhibitor binds to the surface of the toxin, obstructing the sites involved in membrane docking and disruption according to the proposed myotoxic mechanism. Furthermore, higher-order oligomeric formation by interaction with interfacial suramins was observed, which may also aid the inhibitory process. These results further substantiate the current myotoxic mechanism and shed light on the search for efficient inhibitors of the local myonecrosis phenomenon.

1. Introduction

Myonecrosis is an important local effect of envenomations caused by snakebite accidents, which is not efficiently neutralized by regular antivenom administration and may evolve to permanent tissue loss, amputation and victim disability (Lomonte *et al.*, 2003; Otero *et al.*, 2002). This toxic manifestation is particularly serious in accidents involving viperid snakes from the *Bothrops* genus, which are frequent in Latin America (de Oliveira, 2009; Williams *et al.*, 2010). Myonecrosis results from the synergic action of different venom components, including haemorrhagic metalloproteinases that induce ischaemia and the myotoxic phospholipases A₂, which promote direct cytotoxicity towards skeletal muscle



cells (Gutiérrez *et al.*, 2009). Phospholipases A₂ (PLA₂s; EC 3.1.1.4) comprise a large family of proteins that exhibit similar tertiary structures and are widely found in snake venoms (Dennis *et al.*, 2011; Gutiérrez & Lomonte, 2013). PLA₂-like proteins (or PLA₂ homologues) comprise an important subclass of these proteins that are often present in viperid venoms, which are catalytically inactive because of a lack of Ca²⁺ coordination related to natural mutations of the Asp49 and Tyr28 residues (Fernandes *et al.*, 2010; Holland *et al.*, 1990). PLA₂-like proteins, particularly Lys49-PLA₂s (with an Asp49Lys mutation), are intriguing proteins. They are small proteins with conserved tertiary structure whose functions are usually associated with oligomeric conformation changes and different functional sites (Fernandes *et al.*, 2014). Crystallographic, biophysical, biochemical and functional studies aiming to understand the structural basis for myotoxic activity have been performed, resulting in some consistent results and interesting hypotheses (for a recent review, see Fernandes *et al.*, 2014). The most feasible and broad mechanism involves the toxin in a particular dimeric conformation (known as an 'alternative dimer' or a 'compact dimer') that undergoes an oligomeric change after fatty-acid binding, resulting in membrane docking by a cationic site (MDoS) and ultimately in membrane disruption by a hydrophobic site (MDiS; Fernandes *et al.*, 2013).

Structural experiments have been performed with complexes formed of PLA₂-like proteins and molecules that are potentially capable of neutralizing their biological activities (de Oliveira *et al.*, 2003; Lomonte *et al.*, 2009; Marcussi *et al.*, 2007; Murakami *et al.*, 2005, 2007; Ticli *et al.*, 2005). Some of these molecules may also serve as models for the design of drugs with anti-ophidian properties and therefore may also be applicable as supplements to conventional serum therapy (Marcussi *et al.*, 2007). Suramin [8,8'-[carbonylbis(imino-3,1-phenylenecarbonylimino(4-methyl-3,1-phenylene)carbonylimino)]di(1,3,5-naphthalenetrisulfonic acid) hexasodium salt] is one such compound because of its neutralizing properties against the myotoxicity of Lys49-PLA₂s (Arruda *et al.*, 2002; de Oliveira *et al.*, 2003). This synthetic molecule is a highly charged polysulfonated compound that has been used clinically to treat African trypanosomiasis and onchocerciasis (Burch & Ashburn, 1951; Cherry, 1960; Murakami *et al.*, 2005; Schneider, 1963; Williamson & Desowitz, 1956). When investigated with snake venoms, suramin was shown to inhibit the neuromuscular blockade induced by pre-synaptic neurotoxins such as crotoxin and β -bungarotoxin (Fathi *et al.*, 2011; Lin-Shiau & Lin, 1999) and prevent the muscle necrosis promoted by BthTX-I, a Lys49-PLA₂ from *B. jararacussu* venom (de Oliveira *et al.*, 2003; Arruda *et al.*, 2002).

We have recently performed structural and functional studies of MjTX-II, a myotoxic Lys49-PLA₂ from *B. moojeni* (Salvador, Cavalcante *et al.*, 2013). These experiments revealed that this toxin presents structural peculiarities compared with other Lys49-PLA₂s that influence ligand binding at the hydrophobic channel of the toxin. Furthermore, we also demonstrated using myographic studies that MjTX-II produces an irreversible and time-dependent blockage of

directly and indirectly evoked twitches, similar to other Lys49-PLA₂s (Cavalcante *et al.*, 2005, 2007; de Oliveira *et al.*, 2003; Heluany *et al.*, 1992; dos Santos, Cardoso *et al.*, 2011; Gallacci *et al.*, 2006; Oshima-Franco *et al.*, 2004; Randazzo-Moura *et al.*, 2008; Ponce-Soto *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2004; Stábili *et al.*, 2006; Soares *et al.*, 2001; Salvador, Fernandes *et al.*, 2013).

In the present study, we explored the interaction of MjTX-II and suramin using functional and structural approaches to advance knowledge regarding the structural basis for the mechanism of action of MjTX-II. A functional myographic study on a mice phrenic diaphragm preparation was performed to characterize the myotoxic effects of MjTX-II and its neutralization by suramin. The high-resolution crystal structure of the MjTX-II–suramin complex revealed interaction sites between the toxin and the ligand and its oligomeric conformation. Calorimetric assays were used to quantify the interactions between the protein inhibitors, and finally dynamic light-scattering and bioinformatics assays were performed to further evaluate the oligomeric characteristics of the complex.

2. Experimental procedures

2.1. Toxin isolation and suramin

MjTX-II was isolated from *B. moojeni* venom by ion-exchange chromatography using a gradient of 0.05–0.5 mM ammonium bicarbonate pH 8.0, as described previously (Soares *et al.*, 1998). Suramin sodium salt (catalogue No. S2671) was obtained from Sigma–Aldrich, St Louis, Missouri, USA.

2.2. Dynamic light scattering

Dynamic light-scattering (DLS) experiments were performed with a protein concentration of 2.5 mg ml^{−1} for native MjTX-II and its complex with suramin (MjTX-II: suramin molar ratio of 1:10) using a DynaPro Titan device (Wyatt Technology) at 291 K. Measurements were performed with the protein dissolved in 50 mM ammonium bicarbonate pH 8.0, 50 mM sodium citrate pH 5.6. 100 measurements were acquired in each experiment. Analysis of the final data was performed with *DYNAMICS* v.6.10 (Wyatt Technology).

2.3. Isothermal titration calorimetry

MjTX-II–suramin isothermal titration calorimetric experiments were performed with an iTC₂₀₀ microcalorimeter (MicroCal, GE Healthcare). Titrations were performed in triplicate with the following general conditions: 2 μ l injection volumes, a 240 s time spacing between injections, a stirring speed of 1000 rev min^{−1}, a reference differential power (DP) of 5 μ cal s^{−1}, 45 μ M MjTX-II (in the reaction cell) and 600 μ M suramin (in the syringe). Assays were performed at 298 K in 50 mM ammonium bicarbonate buffer pH 8.0. Heats of dilution and mixing of suramin sodium salt were determined in separate control experiments and were subtracted from the titrations. Data analyses were performed using scripts based on binding polynomials implemented in *Origin* (v.7.0;

OriginLab, Northampton, Massachusetts, USA) as described previously (Freire *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2008; Vega *et al.*, 2015).

2.4. Functional studies

In vitro neuromuscular studies were performed using a myographic technique in order to verify the influence of MjTX-II or its pre-incubation product with suramin upon the contractile process of isolated phrenic nerve–diaphragm muscle preparations of mice. Neuromuscular preparation has proven to be an invaluable tool in the examination of snake venoms and their components, since neuromuscular junctions and muscle fibres are the main target of action of these substances (for a review, see Hodgson & Wickramaratna, 2002). Diaphragm muscle can be stimulated either indirectly, by brief pulses in the motor nerve, or directly on the muscle. This allows discrimination between neurotoxic and myotoxic effects of a snake venom or toxin (Harvey *et al.*, 1994). While neurotoxicity only causes the loss of the indirect twitches, myotoxicity induces the depression of both direct and indirect twitches (Harvey *et al.*, 1994; Ownby *et al.*, 1999).

Adult male mice (25–30 g) were sacrificed by exsanguination after cervical dislocation. The phrenic nerve–muscle diaphragm preparations were removed and mounted vertically in a conventional, isolated organ-bath chamber containing 15 ml of a physiological solution with the following composition: 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 15 mM NaHCO₃, 1 mM Na₂HPO₄, 11 mM glucose. This solution was bubbled with carbogen (95% O₂ and 5% CO₂) and maintained at 308 ± 1 K. The preparation was attached to an isometric force transducer (FT03, Grass Technologies) to record twitch tensions. The transducer signal output was amplified and recorded on a computer *via* a transducer signal conditioner (Part No. 13-6615-50, Gould) with an AcquireLab Data Acquisition System (Gould). The resting tension was 2 g. Indirect contractions were evoked by supramaximal pulses (0.2 Hz, 0.5 ms) delivered from an electronic stimulator (S88K, Grass Technologies) and applied to the phrenic nerve by means of a suction electrode. Direct contractions were evoked by supramaximal pulses (0.2 Hz, 5 ms) through a bipolar electrode positioned on opposite sides of the muscle. The direct contraction experiments were performed in the presence of pancuronium bromide (2 × 10^{−6} M). Preparations were allowed to stabilize for 45 min before the addition of MjTX-II (1 µM) or of a mixture of MjTX-II plus suramin (10 µM) pre-incubated at 308 K for 15 min. Animal procedures were in accordance with the guidelines for animal care prepared by the Committee on Care and Use of Laboratory Animal Resources, National Research Council, USA.

2.5. Crystallization and X-ray data collection

The purified MjTX-II fraction was concentrated to 10 mg ml^{−1} in 0.05 mM ammonium bicarbonate pH 8.0 and suramin solution was added to give a 1:8 molar ratio. Crystals of the MjTX-II–suramin complex were obtained at 291 K from a mixture of 1 µl protein–suramin solution and 1 µl reservoir

solution equilibrated against 500 µl reservoir solution [30%(w/v) PEG 4000, 0.1 M Tris–HCl pH 8.5, 0.2 M lithium sulfate] by the hanging-drop vapour-diffusion method (Ducruix & Giegé, 1992).

X-ray diffraction data were collected from a single MjTX-II–suramin crystal at a wavelength of 1.459 Å (at 100 K) using a synchrotron-radiation source [MX2 station, Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS), Campinas, Brazil] and a MAR CCD imaging-plate detector (MAR Research). The crystal was mounted in a nylon loop and flash-cooled in a stream of nitrogen at 100 K without cryoprotectant. A crystal-to-detector distance of 100 mm and an oscillation range of 1° were used, resulting in the collection of 127 images. The data were processed to 1.9 Å resolution using the *HKL-2000* program package (Otwinowski & Minor, 1997).

2.6. Structure determination and refinement

The crystal structure of the MjTX-II–suramin complex was solved by the molecular-replacement method using *Phaser* (McCoy, 2007) from the *PHENIX* package v.1.8.4 (Adams *et al.*, 2010) using the coordinates of MjTX-II (PDB entry 4kf3; Salvador, Cavalcante *et al.*, 2013) as the search model. The modelling process was performed by manual rebuilding using *Coot* v.0.7.1 (Emsley & Cowtan, 2004). Polyethylene glycol (PEG) 4000, water and suramin molecules were added by *Coot* and refined using the *PHENIX* package v.1.8.4 (Adams *et al.*, 2010). Because of a lack of electron density, the amino-acid side chains of Glu86 and Lys69 in monomer *A* and Lys128 in monomer *B* were not modelled. The *PHENIX* package and *MolProbity* (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>; Chen *et al.*, 2010) were used to check the general quality of the final model. The coordinates were deposited in the PDB as entry 4yv5.

2.7. Comparative analysis

The structures of MjTX-II–suramin, MjTX-II (PDB entry 4kf3; Salvador, Cavalcante *et al.*, 2013), BaspTX-II–suramin (myotoxin II from *B. asper* venom; PDB entry 1y4l; Murakami *et al.*, 2005) and ecarpholin S–suramin (a myotoxic Ser49-PLA₂ from *Echis carinatus* venom; PDB entry 3bjw; Zhou *et al.*, 2008) were used. Molecular comparison of the structures was performed using *Coot* v.0.7.1 (Emsley & Cowtan, 2004). All structural figures were generated using *PyMOL* v.1.3 (Schrödinger).

2.8. Molecular-dynamics simulations

Molecular-dynamics (MD) simulations were performed using *GROMACS* (*Groningen Machine for Chemical Simulation*) v.4.5.3 (Van Der Spoel *et al.*, 2005) for two experimental conditions: four protomers of MjTX-II (a tetramer) without ligands and four protomers of MjTX-II (a tetramer) and four suramin molecules. The simulations were performed using the protein models in the presence of explicit water molecules. The GROMOS96 53a6 force field (Oostenbrink *et al.*, 2005) was selected to perform the MD simulations, and the protonation states of the charged groups were set to a pH

value of 7.0. The minimum distance between any atom of the models and the box wall was 0.5 nm. Energy minimization using a steepest-descent algorithm was performed to generate the starting configurations of the systems. After this step, 200 ps of MD simulation with positional restraints applied to the protein (PRMD) was executed to gently relax the systems. 50 ns of unrestrained MD simulation was then performed to evaluate the stabilities of the structures. All MD simulations were performed in a periodic truncated cubic box under constant temperature (298 K) and pressure (100 kPa), which were maintained by coupling to an isotropic pressure system and an external heat bath (van Gunsteren & Berendsen, 1984). The suramin topology and coordinate files used in the MD simulations were generated by the *PRODRG2.5* server at the University of Dundee (<http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/cgi-bin/prodrg>).

The overall stereochemistry and fold quality of the protein structural models obtained after initial modelling and MD simulations were further examined with *RAMPAGE* (Lovell *et al.*, 2003) and *ProSA-web* (Wiederstein & Sippl, 2007). To assess the quality of the MD simulations, the average root-mean-square deviation/time graphs of the protein backbone atoms were analyzed to examine the differences between the total averages of two equal sets of points (the points corresponding to the transient part of the simulations were not considered).

3. Results

3.1. *In vitro* myotoxicity

MjTX-II at 1 μ M promoted a time-dependent blockade of both indirectly and directly evoked twitches in mouse neuromuscular preparations (Fig. 1). Pre-incubation with suramin prevented approximately 85% of the muscle paralysis promoted by MjTX-II, independent of whether the stimulus was applied directly into the muscle or indirectly into the nerve. Suramin alone did not alter muscle contractions compared with the control.

3.2. Dynamic light scattering

DLS experiments were performed using the toxin dissolved in ammonium bicarbonate pH 8.0 and sodium citrate pH 5.6. An R_h value of 2.0 nm was obtained in both conditions, with polydispersity values of Pd = 9.5% at pH 5.6 and Pd = 13.9% at pH 8. An average molecular weight of approximately 17 kDa was calculated considering MjTX-II to be a globular protein (the sequence-based monomeric molecular weight is 13.887 kDa). A similar value was obtained (R_h = 2.3 Å, Pd = 12%) for native MjTX-II dissolved in ultrapure water, as described previously (Salvador, Cavalcante *et al.*, 2013). These results are also consistent with data obtained previously for other Lys49-PLA₂s (Fernandes *et al.*, 2010). Thus, taking into account that the structure is not perfectly globular, the data suggest that native MjTX-II is predominantly dimeric, but the presence of a fraction of the toxin in a monomeric conformation may also be possible. Conversely, DLS measurements

of pre-incubated MjTX-II–suramin solution indicated protein oligomerization (R_h = 4.2 nm, Pd = 13.7% at pH 5.6 and R_h = 3.5 nm, Pd = 14.5% at pH 8). The calculated molecular weight of the complex is 98 and 63 kDa at pH 5.6 and 8.0, respectively. These data clearly demonstrated the oligomerization process undergone by the complex, and also suggest that the tetramer is the predominant assembly for the complex at pH 8.0, despite the relatively high polydispersity value in these measurements.

3.3. Interaction between MjTX-II and suramin

The interaction between MjTX-II and suramin was assessed by ITC. A representative calorimetric titration is shown in Fig. 2. The thermogram exhibited biphasic behaviour, indicating at least two distinguishable binding events. To avoid *a priori* constraints regarding the ligand-binding sites, a general

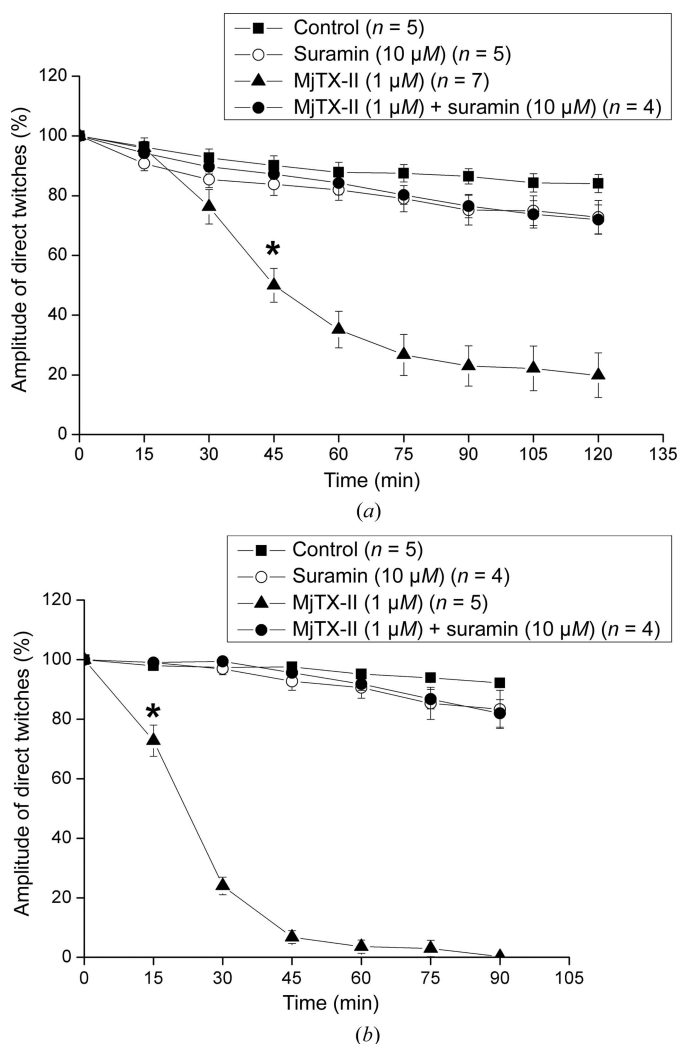


Figure 1
Effects of MjTX-II and the product of its pre-incubation with suramin on (a) directly and (b) indirectly evoked twitches in mouse phrenic diaphragm preparations. The ordinate represents the percentage of twitches relative to the initial amplitude. The abscissa indicates the time (in minutes) after the addition of MjTX-II or a mixture of MjTX-II and suramin to the organ bath. The data are grouped as means $\pm$ standard error of the mean ($P < 0.05$). The asterisk indicates the point after which there was a significant difference compared with the control.

Table 1

Thermodynamic values for the binding of suramin to MjTX-II.

k_{d1} and k_{d2} are the intrinsic dissociation constants for the binding of the first and second ligand. Δh_1 and Δh_2 are the intrinsic binding enthalpies for the binding of the first and second ligand. β_1 and β_2 are the overall association constants for the first and second binding events. ΔH_1 and ΔH_2 are the overall binding enthalpies for the first and second binding events. α is the interaction cooperativity constant ($= 4\beta_2/\beta_1^2$). Δh is the interaction cooperativity enthalpy. n_H is the Hill coefficient [$= 2/(1 + \alpha^{-1/2})$].

Dissociation binding constants and binding enthalpies	
k_{d1} (μM)	0.6 ± 0.1
Δh_1 (kcal mol ⁻¹)	5.2 ± 0.2
k_{d2} (μM)	6.2 ± 1.2
Δh_2 (kcal mol ⁻¹)	-18.2 ± 0.6
Overall binding parameters determined by nonlinear regression	
β_1 (M^{-1})	$(3.1 \pm 0.5) \times 10^6$
ΔH_1 (kcal mol ⁻¹)	5.2 ± 0.3
β_2 (M^{-2})	$(2.5 \pm 0.4) \times 10^{11}$
ΔH_2 (kcal mol ⁻¹)	-13.0 ± 0.3
α	0.10 ± 0.03
Δh (kcal mol ⁻¹)	-23.4 ± 0.4
n_H	0.5 ± 0.2

Table 2

X-ray data-collection and refinement statistics.

Values in parentheses are for the highest resolution shell.

Unit-cell parameters ($\text{\AA}$)	$a = 50.8, b = 63.6, c = 87.7$
Space group	$P2_12_12_1$
Resolution ($\text{\AA}$)	31.82–1.90 (1.96–1.90)
Unique reflections	23031 (2258)
Completeness (%)	99.9 (99.7)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	8.6 (2.5)
Multiplicity	4.9 (4.7)
Molecules in asymmetric unit	2
$R_{\text{merge}}^{\dagger}$ (%)	14.4 (78.9)
R_{cryst} (%)	19.7
R_{free} (%)	22.8
No. of non-H atoms	
Protein	1916
Waters	197
Suramin molecules	2
PEG 4K molecules	3
Sulfate ions	7
Wilson B factor ($\text{\AA}^2$)	20.6
Ramachandran plot $\ddagger$ (%)	
Favoured	95.0
Outliers	0.91

$\dagger R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$, where $I_i(hkl)$ is the intensity of an individual measurement of the reflection with Miller indices hkl and $\langle I(hkl) \rangle$ is the mean intensity of that reflection. Calculated for $I > -3\sigma(I)$. $\ddagger$ Calculated with MolProbity (Chen *et al.*, 2010).

model with two binding sites based on the overall association constants (β_1 and β_2) and binding enthalpies (ΔH_1 and ΔH_2) was employed. Nonlinear regression analysis allowed the estimation of binding parameters (Table 1). An interaction constant α ($= 4\beta_2/\beta_1^2$) of 0.1 and a Hill coefficient of 0.5 indicated that the binding sites are either non-identical or identical exhibiting negative cooperativity.

Intrinsic site-specific binding parameters were calculated from the overall association parameters: the dissociation constants for the binding of the first and second events and their corresponding binding enthalpies (Table 1). The first binding event presented a dissociation constant of $0.6 \mu M$, whereas the second binding event displayed a dissociation constant of $6.2 \mu M$ (a tenfold reduction in binding affinity).

There was a considerable difference in the binding enthalpies: the first event exhibited unfavourable enthalpy (entropically driven), whereas the second event exhibited favourable enthalpy (enthalpically driven, with a $-23.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ difference in enthalpy).

3.4. Crystallographic structure of the MjTX-II–suramin complex

The MjTX-II–suramin crystals belonged to space group $P2_12_12_1$ and diffracted to $1.9 \text{ \AA}$ resolution. The refinement converged to an R_{cryst} value of 19.7% ($R_{\text{free}} = 22.8\%$) with a final model (Fig. 3a) composed of 197 solvent molecules, two suramin molecules (Fig. 3b), seven sulfate ions and three polyethylene glycol 4000 (PEG 4K) molecules. This model revealed two protomers (identified as *A* and *B*) in the asymmetric unit. The refinement statistics and other information are provided in Table 2. Suramin molecules bind to both monomers of the MjTX-II–suramin complex in a symmetric manner, establishing interactions with both the C- and N-termini of the toxin (the Lys7, Leu10, Asn114, Lys116, Tyr119, Tyr121, Leu122 and Phe126 residues are involved in these interactions; Figs. 4a and 4b).

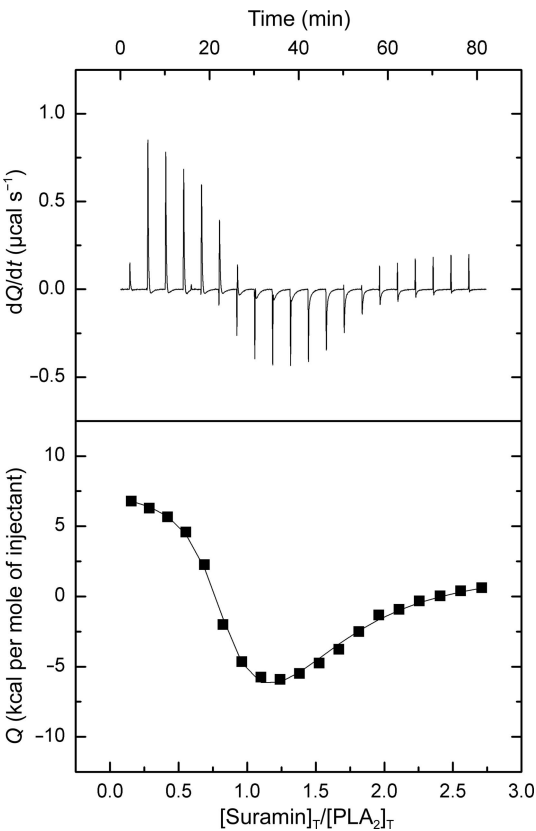


Figure 2 Calorimetric titration of suramin sodium salt into MjTX-II. The upper panel shows the raw data thermogram (thermal power as a function of time) of the titration of MjTX-II (200 μl , $45 \mu\text{M}$) with $600 \mu\text{M}$ suramin sodium salt. The lower panel shows the binding isotherm (ligand-normalized integrated heat as a function of the molar ratio). Affinities and enthalpy changes were determined by a general nonlinear regression model considering two ligand-binding sites (solid line).

The crystallographic structure of MjTX-II complexed with suramin presents a similar fold to other class II PLA₂s, is stabilized by seven disulfide bridges and is composed of the following secondary-structure elements: an N-terminal α -helix (h1), a 'short' helix, a Ca²⁺-binding loop, two antiparallel α -helices (h2 and h3), two short strands of antiparallel β -sheets (known as β -wings) and a C-terminal loop (Arni & Ward, 1996; Magro *et al.*, 2009). The MjTX-II–suramin structure, like other PLA₂-like structures, presents a hydrophobic channel which links the protein surface to its putative active site. This cleft is present for both catalytic PLA₂s and PLA₂-like proteins, displaying conserved residues (*e.g.* His48) that are fundamental for the catalytic process (in PLA₂s; Scott & Sigler, 1994) or for the mechanism of toxicity (in PLA₂-like proteins; dos Santos *et al.*, 2009).

The majority of PLA₂-like toxins present dimeric arrangements in their crystals and in solution (Fernandes *et al.*, 2014).

Additionally, the unit-cell packing of MjTX-II–suramin and most Lys49-PLA₂ structures presents two possible dimeric configurations: (i) the 'alternative dimer' or 'compact dimer' and (ii) the 'conventional dimer' or 'larger dimer'. This issue has been extensively analyzed in different studies, with the 'alternative dimer' being the most likely conformation to occur in solution (for a review, see Fernandes *et al.*, 2014). Inspection of the MjTX-II–suramin unit-cell packing using PISA (Krissinel & Henrick, 2007) also suggested that the 'alternative dimer' conformation is the most probable conformation to occur in solution: the 'alternative dimer' had a complexation signification score (CSS) of 0.2, an interfacial area of 512.5 Å² and $\Delta^iG = -9.4$ kcal mol⁻¹, while the 'conventional dimer' had a CSS of 0, an interfacial area of 348.2 Å² and $\Delta^iG = -0.2$ kcal mol⁻¹. Thus, the first assembly (alternative dimer) was selected for the MjTX-II–suramin structure and used in refinement.

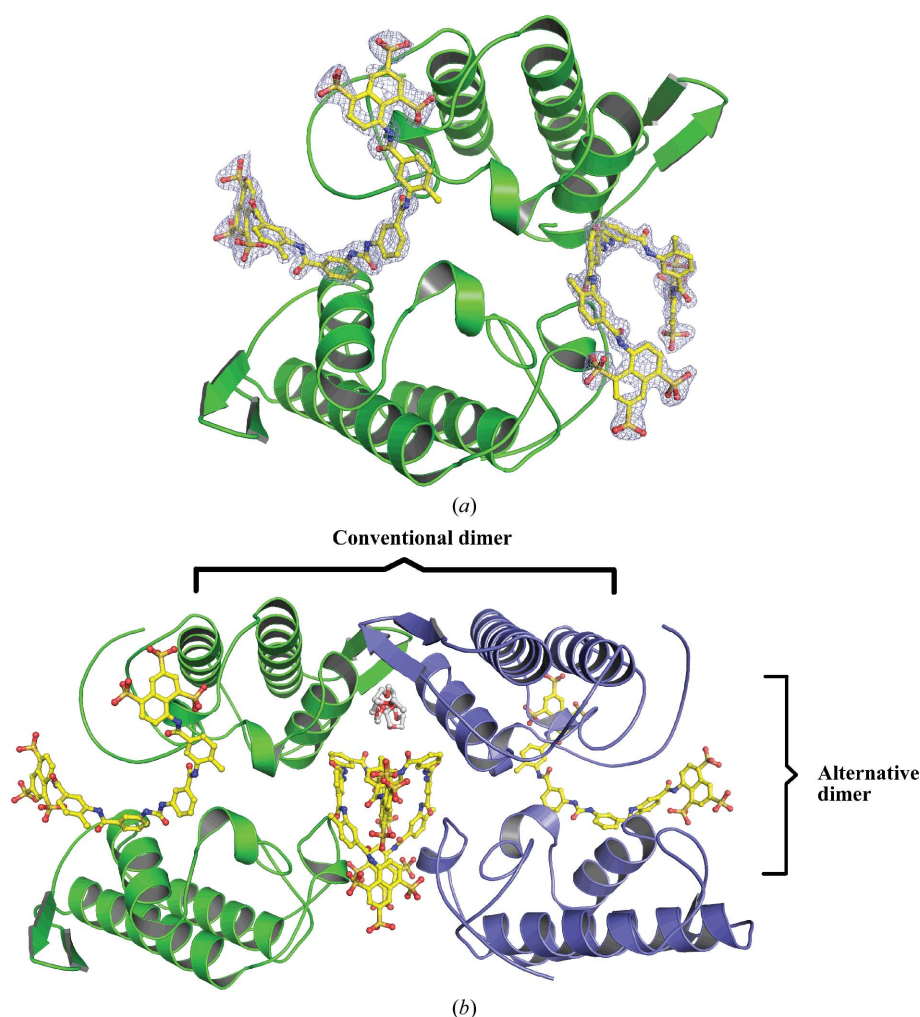


Figure 3
Crystal structure of the MjTX-II–suramin complex. (a) The overall structure of the MjTX-II–suramin complex is depicted as a ribbon diagram. Suramin molecules (yellow) are illustrated as stick representations. The electron-density map (coefficients $|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$) of the MjTX-II–suramin complex is shown in the area corresponding to the ligand and is contoured at 1.0σ . (b) Tetrameric configuration of the MjTX-II–suramin complex formed by two dimers in the asymmetric unit. This oligomeric conformation was suggested by PISA (Krissinel & Henrick, 2007), dynamic light scattering and molecular-dynamics simulations to be stable in solution. Both 'alternative' and 'conventional' dimers were observed in this oligomeric conformation (Fernandes *et al.*, 2014).

The particular mode of suramin binding on the toxin surface, in which there is a ligand on each side of the dimer (Fig. 3a), enables other toxin dimers to interact with each side of the complex, allowing higher-order complex formation (Fig. 3c). Notably, this oligomeric organization of the MjTX-II–suramin complex is composed of four protomers that are composed of two dimers in the 'alternative dimer' conformation (from two asymmetric units) related by a twofold axis. The majority of the contacts between the dimers are between two suramin molecules that are located in the dimeric interface (Fig. 3c). Further analyses with PISA (using the protomers, suramin and the interfacial PEG 4K molecules) suggested a tetrameric conformation as a stable assembly in solution. Another interesting feature that is observed in the tetrameric arrangement is the presence of both 'alternative' and 'conventional' dimers (Fig. 3c). Thus, despite the 'alternative' conformation being more favourable in solution for most Lys49-PLA₂s, the 'conventional' conformation is found in the case of a tetrameric arrangement, such as in MjTX-II–suramin and MjTX-I (Salvador, Fernandes *et al.*, 2013).

3.5. Comparison between MjTX-II and the MjTX-II–suramin complex

MjTX-II and the MjTX-II–suramin complex displayed similar dimeric structures (r.m.s.d. of 0.33 Å). The main differences between these structural

models are observed in the ligand-binding regions (Figs. 5*b* and 5*d*). The MjTX-II structure contains four PEG 4K molecules: the PEG 4K(1) and PEG 4K(2) molecules inside the hydrophobic channel of each dimer, PEG 4K(3) interacting with the Lys7 region and PEG 4K(4) interacting with the hydrophobic channels of both monomers simultaneously (each tail is bound to each monomer). In the MjTX-II–suramin complex there are only three PEG 4K molecules [the PEG 4K(4) molecule is absent]. Additionally, the PEG 4K(3) molecule observed in the vicinity of the Lys7 residue presents a different configuration compared with that observed in the MjTX-II structure. Part of this PEG 4K molecule interacts with one of the monomers of the adjacent dimer of the asymmetric unit of the MjTX-II–suramin structure (Fig. 3*a*). Finally, the most important characteristic of the complex is the presence of two suramin molecules on the surface of the toxin dimer. This particular binding mode of the ligands on the protein surface creates the possibility of the occurrence of a high-order oligomeric assembly.

3.6. Comparison between PLA₂-like toxins complexed with suramin

Three structures of PLA₂-like toxins complexed with suramin have been solved: (i) MjTX-II–suramin (this work),

(ii) BaspTX-II–suramin (a Lys49-PLA₂ from *B. asper*; Murakami *et al.*, 2005) and (iii) ecarpholin S–suramin (a Ser49-PLA₂ from *E. carinatus*; Zhou *et al.*, 2008). Notably, the ligand binds to different parts of each protein, leading to different oligomeric conformations of the toxins.

A comparison between the crystal structures of the two Lys49-PLA₂s complexed with suramin (MjTX-II–suramin and BaspTX-II–suramin) in their dimeric arrangement is shown in Fig. 5(*a*). The structure of the BaspTX-II–suramin complex demonstrated that suramin interacts with the putative calcium-binding loop and C-terminal regions. The ligand is bound at the entrance to the hydrophobic channel of the toxin, blocking the access to a possible activator molecule (see §4.3). In MjTX-II–suramin, by contrast, the inhibitor is bound at the external portion of the protein in both monomers (Fig. 3*a*) by several hydrophobic contacts and three polar contacts (Figs. 4*a* and 4*b*). This particular mode of interaction also results in oligomerization of the complex, mainly by contacts between the suramin molecules. The reasons for the ligand-binding differences between these two proteins arise from two unique sequence features of MjTX-II compared with all other Lys49-PLA₂s (Salvador, Cavalcante *et al.*, 2013): (i) a mutation in the putative Ca²⁺-binding loop (Leu32Gly) causes the binding of the additional PEG 4K(4) molecule (Fig. 5*d*) in the structure of MjTX-II–PEG 4K and of an additional fatty-acid

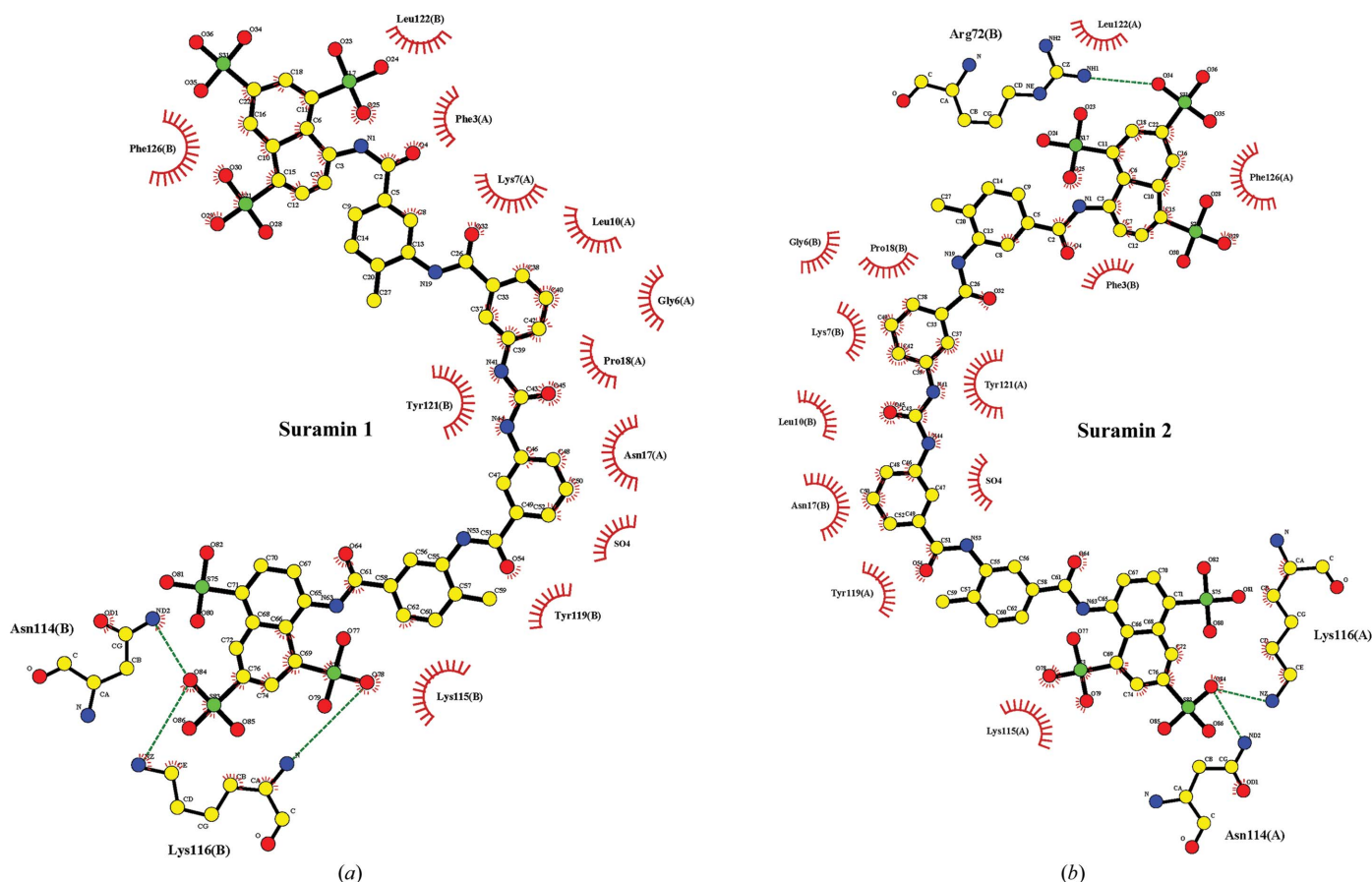


Figure 4

Interaction of suramin molecules in the MjTX-II structure. (*a*) and (*b*) represent the interactions of suramin 1 and suramin 2 bound to monomers *A* and *B* of MjTX-II, respectively. Polar contacts are depicted as broken lines and hydrophobic contacts are indicated by arcs with radiating spokes. This figure was drawn using LIGPLOT (Wallace *et al.*, 1995).

molecule in the structure of MjTX-II–stearic acid (Watanabe *et al.*, 2005) and (ii) an insertion in the MjTX-II C-terminus (Asn120) also confers a different conformation to this region, leading to the binding of the additional PEG 4K(3) (Fig. 5*d*) in the MjTX-II–PEG 4K structure or a fatty-acid molecule in the MjTX-II–stearic acid structure (Salvador, Cavalcante *et al.*, 2013; Watanabe *et al.*, 2005). Indeed, phylogenetic studies with PLA₂-like toxins demonstrated that the MjTX-II sequence is in an isolated and primitive branch of the Lys49-PLA₂ clade (dos Santos, Cintra-Francischini *et al.*, 2011; Salvador, Fernandes *et al.*, 2013).

A superposition of the MjTX-II–suramin and ecarpholin S–suramin (Zhou *et al.*, 2008) dimers is shown in Fig. 6. It can be observed that although they present a conserved secondary structure, their oligomeric structures are very different and the

C-terminal regions also display different conformations. The ecarpholin S–suramin crystal structure contained three suramin ligands interacting with different portions of C-terminal and N-terminal regions of the toxin mainly by polar contacts. Interestingly, despite structural and sequential differences between the toxins (MjTX-II and ecarpholin S), some parts of the suramin ligands bind to similar regions (the C-terminal and N-terminal portions), and interaction between the ligands resulted in the oligomerization of both proteins.

3.7. Molecular-dynamics studies

MD simulations were performed to check the stability of the tetrameric structure of the complex observed in the unit cell. Thus, two different models were used for the MD simu-

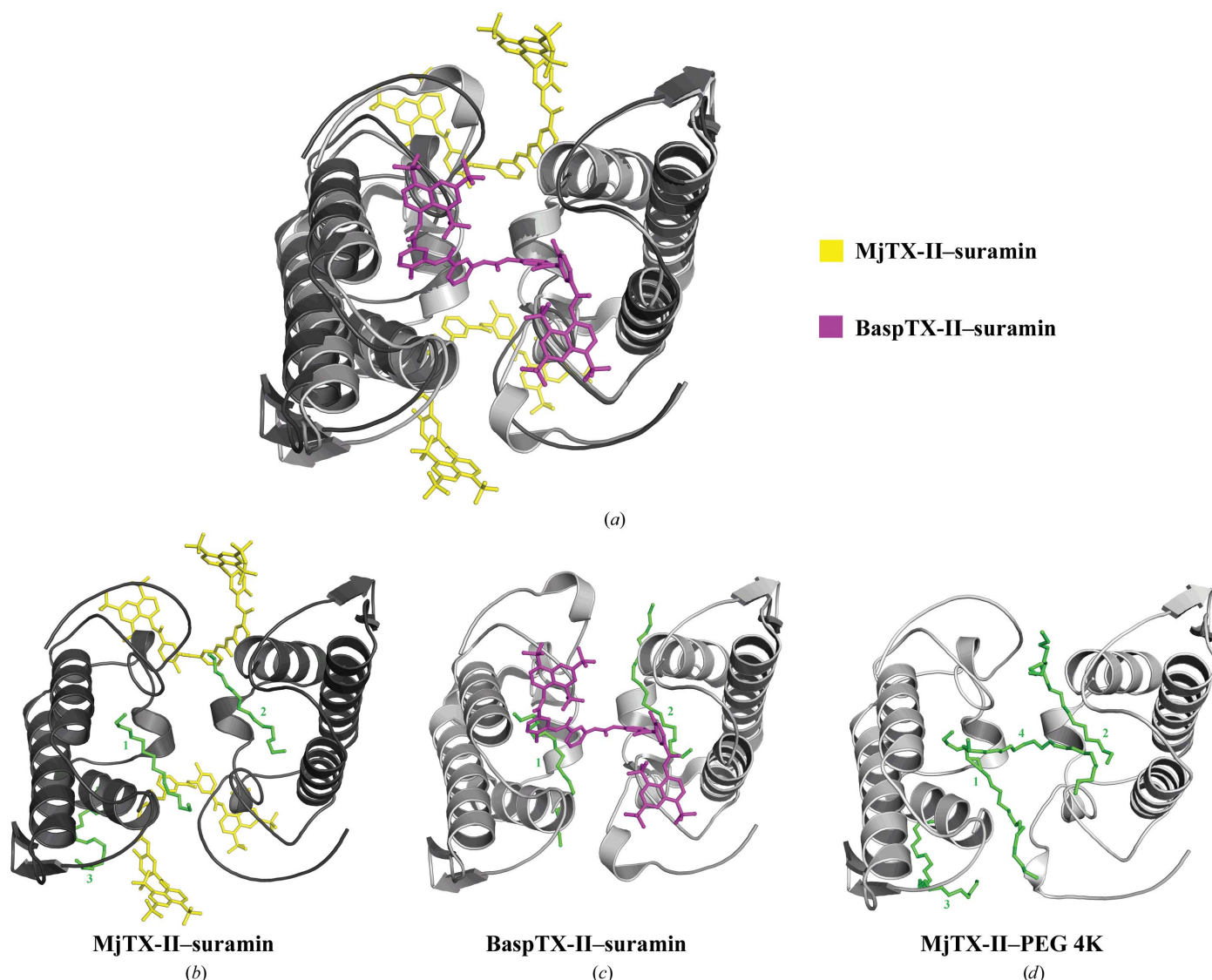


Figure 5

Structural comparison between the dimeric MjTX-II–suramin complex structure and other Lys49-PLA₂ structures. (a) Superposition of the MjTX-II–suramin (ribbon diagram in black and suramin molecules in yellow) and BaspTX-II–suramin (ribbon diagram in grey and suramin molecules in magenta) structures. (b) Cartoon representation of the dimeric MjTX-II–suramin complex structure (black); the three PEG 4K molecules and two suramin molecules are shown in green and yellow, respectively. (c) Cartoon representation of the BaspTX-II–suramin complex structure (grey); the two PEG 4K molecules are shown in green and the two suramin molecules are shown in magenta. (d) Cartoon representation of the MjTX-II structure (grey) with its four PEG 4K molecules shown in green.

lations: (i) a crystallographic tetrameric assembly of the complex (four protomers and four interfacial suramin molecules, named the bound assembly) and (ii) a crystallographic tetrameric assembly without suramin ligands (four protomers, named the unbound assembly).

The simulations showed that the bound assembly had a lower average r.m.s.d. value and also a lower level of r.m.s.d. fluctuations compared with the unbound assembly (Fig. 7). Thus, these data showed that the bound tetrameric assembly presented a lower tendency for movement between the dimers along the tetrameric interface, indicating tight interactions between the suramin molecules and toxin protomers.

4. Discussion

4.1. Myotoxic activity of MjTX-II is neutralized by suramin

Functional myographic studies performed on isolated neuromuscular preparations are suitable for screening the neurotoxic and myotoxic components of snake venoms (Gallacci & Cavalcante, 2010; Harvey *et al.*, 1994; Ownby *et al.*, 1999). Although neurotoxic activity is characterized by the exclusive blockade of indirect contractions, myotoxicity causes a loss of both direct and indirect twitches (Ownby *et al.*, 1999). The present study demonstrates that MjTX-II, similar to other Lys49-PLA₂s, induces a blockade of both indirect and direct twitches in mouse phrenic diaphragm preparations (Cavalcante *et al.*, 2005; de Oliveira *et al.*, 2003; Gallacci *et al.*, 2006;

Heluany *et al.*, 1992; Oshima-Franco *et al.*, 2004; Ponce-Soto *et al.*, 2009; Randazzo-Moura *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2004; Salvador, Fernandes *et al.*, 2013; Salvador, Cavalcante *et al.*, 2013; Soares *et al.*, 2001; Stábeli *et al.*, 2006). The muscle paralysis induced by myotoxic PLA₂s has been attributed to muscle-fibre unexcitability consequent to prolonged depolarization resulting from the alteration of cell-membrane permeability. Even though morphological studies clearly demonstrate that Lys49-PLA₂s can induce muscle damage, functional myographic approaches reveal the early stages of this toxic effect (de Oliveira *et al.*, 2003; Cavalcante *et al.*, 2007; dos Santos, Cardoso *et al.*, 2011).

As described above, pre-incubation with suramin neutralizes the muscle paralysis promoted by MjTX-II in mouse phrenic nerve–diaphragm preparations, regardless of whether the stimulus was applied indirectly on the nerve or directly on the muscle. Thus, based on the above considerations, we suggest that suramin neutralizes the myotoxic effect of MjTX-II. Similar findings regarding the antimyotoxic effect of suramin have previously been described against other PLA₂-like proteins, such as Lys49-PLA₂s [BthTX-I from *B. jararacussu* (de Oliveira *et al.*, 2003), BaspTX-II (Murakami *et al.*, 2005)] and ecarpholin S (Zhou *et al.*, 2008).

The mechanism of action of suramin at the neuromuscular junction remains unclear, but it is known that suramin blockades presynaptic voltage-dependent Ca²⁺ channels on the motor nerve terminal, reducing the release of acetylcholine (Henning *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 2000). However, this mode of

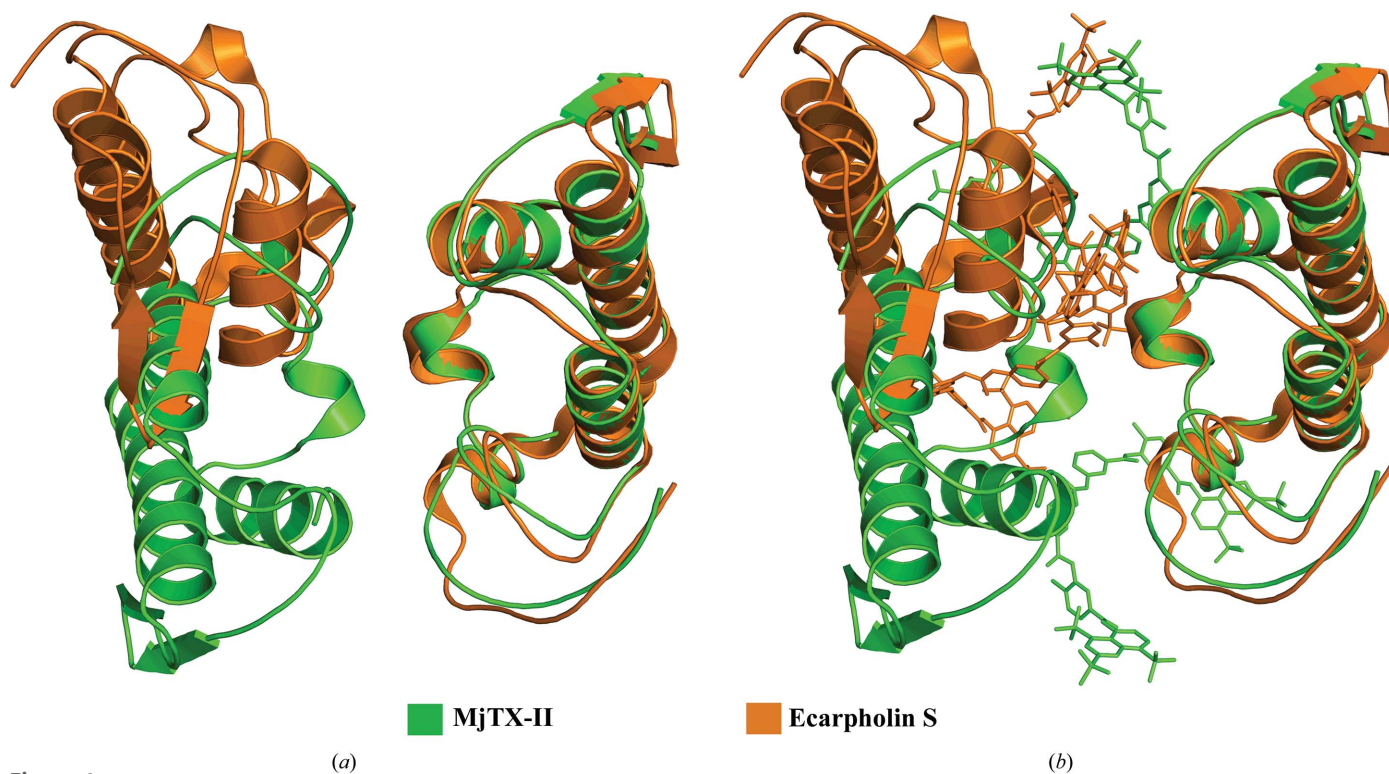


Figure 6

Superposition of the dimeric MjTX-II-suramin and the Ser49-PLA₂ ecarpholin S-suramin structures. (a) Cartoon representation of the MjTX-II-suramin (green) and ecarpholin S-suramin (light brown) structures. (b) The same superposition as in (a) but including the suramin molecules. One monomer of each structure was superposed to illustrate the oligomeric differences between the complexes.

action cannot account for the inhibitory effect of suramin on muscle paralysis induced by MjTX-II and other PLA₂-like toxins. Indeed, these functional results also corroborate our crystallographic and calorimetric assay results, indicating that suramin can interact with MjTX-II with high affinity and form complexes that are inactive.

4.2. Oligomerization of the MjTX-II–suramin complex

Most apo and complexed PLA₂-like structures are dimeric, as demonstrated by crystallography, DLS, SAXS and size-exclusion chromatography, among other techniques (Murakami *et al.*, 2007; dos Santos *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2010, 2014). In particular, the crystal structure of MjTX-II was also solved as a dimer (de Azevedo *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 2005; Salvador, Cavalcante *et al.*, 2013). The MjTX-II–suramin structure also presents a dimeric conformation in its asymmetric unit; however, analysis of its unit cell shows that owing to crystallographic symmetry the tetrameric conformation seems to be most likely to occur. Notably, the dimeric conformation observed in the MjTX-II structure is also preserved in the MjTX-II–suramin structure. However, because the ligand binds on the surface of the toxin, a tetrameric arrangement formed by two dimers occurs in the unit cell.

To test whether the tetrameric arrangement occurs in solution, we also performed other experiments which, despite the particularities and limitations of each technique, demonstrated that a high-order oligomeric conformation is feasible. MD simulations demonstrated that the tetrameric conformation is more stable in the presence of the ligand. DLS assays indicated that the presence of the ligand induces the formation of higher-order oligomers, and also suggested that the tetrameric assembly is predominant at pH 8. ITC experiments indicated two binding events characterized by dissociation constants in the low micromolar range with a tenfold difference. Thus, these two events may be attributed to binding of

suramin to the surface of MjTX-II (the first event with a higher dissociation constant, with positive enthalpy and entropically driven) and the interaction between the two dimers (by suramin and β -sheet residues) forming the tetrameric arrangement (the second event with a lower dissociation constant and enthalpically driven).

Suramin-induced oligomerization has also been reported for ecarpholin S, a Ser49-PLA₂ from *E. carinatus* venom (Zhou *et al.*, 2008). The myotoxic activity of ecarpholin S is significantly inhibited by suramin, and oligomerization may be essential for this inhibition: the apo form of this protein changed from a monomeric to a dimeric state (in the asymmetric unit) and an octameric conformation (in the unit cell) when in the presence of suramin (Zhou *et al.*, 2008). Thus, considering the crystallographic and biophysical experiments, in which we showed that the oligomerization process also occurs for MjTX-II, we suggest that this phenomenon may also play an important role in the mechanism of inhibition of PLA₂-like toxins by suramin.

4.3. Structural basis for the inhibition of MjTX-II by suramin

The mechanism of action of Lys49-PLA₂s upon muscle fibres has been much discussed over the last several years, and great progress has been achieved regarding this topic. It is already known that Lys49-PLA₂s act as dimers through their C-terminal region (Chioato *et al.*, 2002; Ward *et al.*, 2002). It has been proposed that C-terminal (Lys115 and Arg118) and other basic residues (such as Lys20) are the main residues responsible for membrane anchorage (dos Santos *et al.*, 2009). More recently, this anchorage site was named the membrane-docking site (MDoS) and other functional sites responsible for membrane disruption (called membrane-disruption sites; MDiS) consisting of the C-terminal hydrophobic residues (Leu121 and Phe125 in Lys49-PLA₂s and Leu122 and Phe126 in MjTX-II because of a residue insertion) have been identified (Fernandes *et al.*, 2013). Thus, a myotoxic mechanism composed of five steps was proposed: (i) fatty-acid binding at the hydrophobic channel of the toxin, (ii) allosteric activation, (iii) protein–membrane docking (MDoS), (iv) protein penetration and disruption (MDiS) and (v) cell death (Fernandes *et al.*, 2013).

Based on the available structural and functional data, different ‘classes’ of inhibitors of PLA₂-like proteins have been proposed: (i) ligands that bind in the hydrophobic channel (*e.g.* *p*-bromophenacyl bromide; BPB), (ii) ligands that block or restrict access to the hydrophobic channel (*e.g.* rosmarinic acid) and (iii) ligands that bind to the C-terminus or the MDoS (dos Santos *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2014). Notably, the crystal structure of the MjTX-II–suramin complex shows that suramin binds simultaneously to the MDoS and MDiS regions (primarily localized at the C-termini of PLA₂-like toxins; Figs. 4 and 8). Suramin simultaneously neutralizes the myotoxic and neuromuscular blocking activity of MjTX-II when pre-incubated *in vitro*. Calorimetric data demonstrated that suramin ligands bind to MjTX-II in the low micromolar range, which corroborates the functional data.

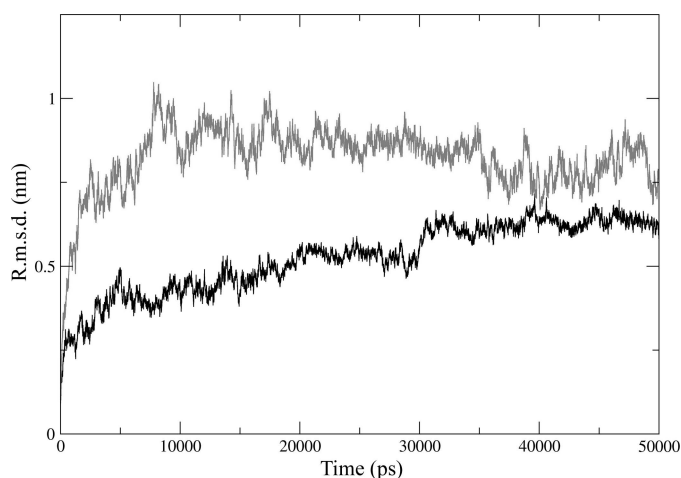


Figure 7
Average backbone r.m.s.d. during 50 ns molecular-dynamic simulations of the tetrameric assembly of MjTX-II with (black) and without (grey) suramin ligands. The simulations demonstrated that the bound assembly (in black) presents a lower average r.m.s.d. value and a lower level of r.m.s.d. fluctuations compared with the unbound assembly (grey).

Thus, the interaction of suramin with MjTX-II is in agreement with the previous hypothesis for class (iii) inhibitors (C-termini) but also reveals a broader class of inhibitor that is able to bind to both the MDiS and MDoS regions. This is the first report of a ligand that binds simultaneously to both sites

and explains its high efficiency as an inhibitor, as demonstrated by functional and calorimetric assays.

In addition to suramin binding at the MDiS and MDoS regions of MjTX-II, the oligomerization process observed for the MjTX-II–suramin complex also strengthens the MDiS and

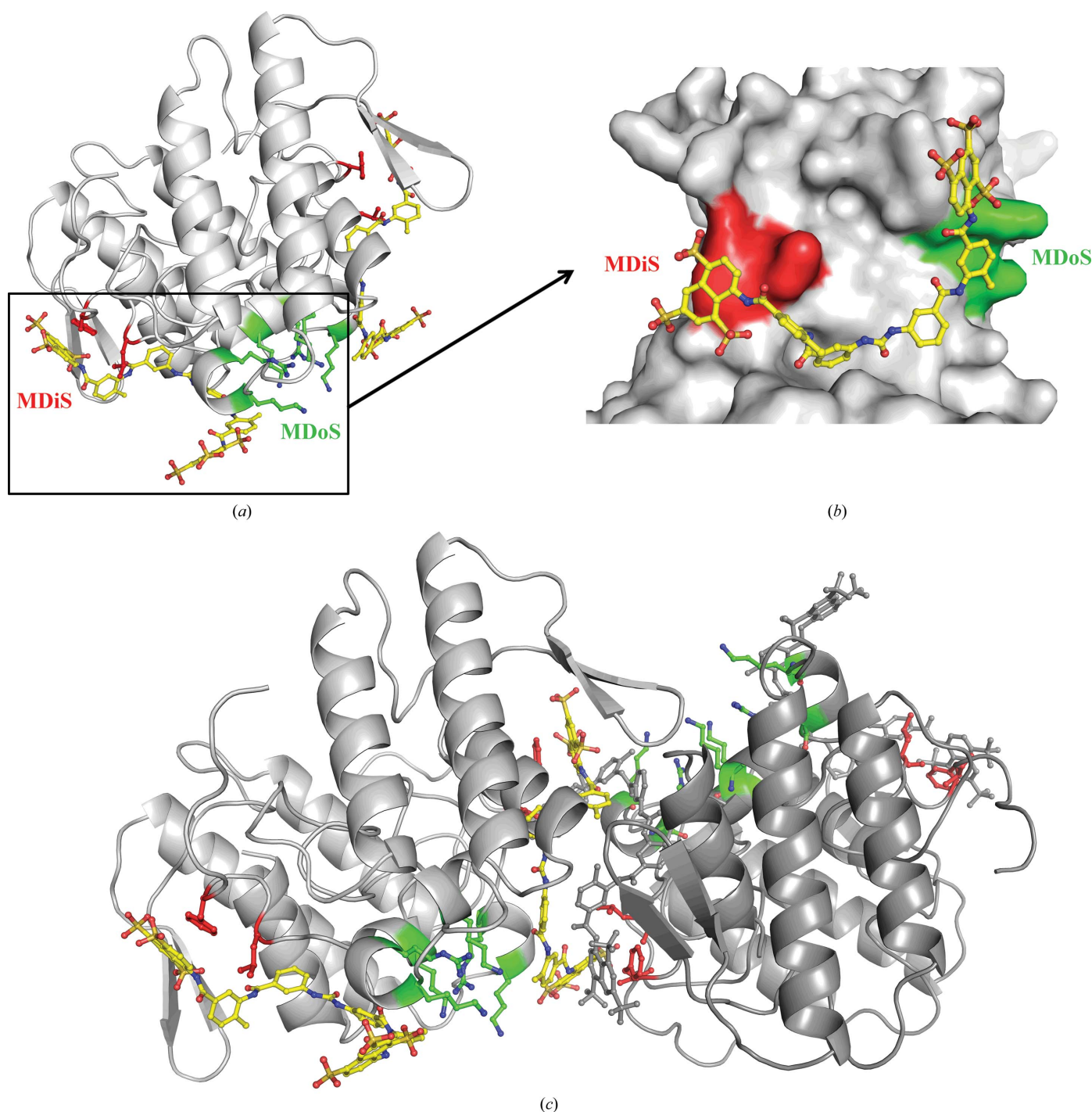


Figure 8

MDoS (cationic membrane-docking site) and MDiS (hydrophobic membrane-disruption site) in the MjTX-II–suramin structure, highlighting the interaction between the inhibitor and these sites. (a) Cartoon representation of the asymmetric unit of the crystal structure of the MjTX-II–suramin complex with the inhibitor interacting with MDoS (residues in green) and MDiS (residues in red). Suramin and the MDoS and MDiS residues are shown in ball-and-stick representation. (b) Detailed view of the interaction between a suramin molecule and a monomer of MjTX-II, highlighting the MDiS (red) and MDoS (green) regions. The protein is represented as a surface and the suramin ligand is shown in ball-and-stick representation. (c) Tetrameric conformation of the MjTX-II–suramin complex with the inhibitor interacting with the MDiS (red) and MDoS (green) regions.

MDoS burial process. Therefore, two synergic mechanisms can potentially explain the demonstrated inhibition of MjTX-II by suramin: (i) the suramin-binding mode on the toxin surface that results in a blockade of both the MDoS and MDiS sites, thus impairing toxin–membrane contacts (Figs. 8*a* and 8*b*), and (ii) MjTX-II–suramin-induced oligomerization resulting in a special protein–ligand quaternary arrangement that makes the MDoS and MDiS of all of the oligomerized toxins physically inaccessible (Fig. 8*c*).

4.4. Inhibitory mechanism of PLA₂-like toxins

As shown in §3.6, in the crystal structure of the BaspTX-II–suramin complex the suramin ligand interacts with the putative calcium-binding loop and C-terminal regions, obstructing the hydrophobic channel (Murakami *et al.*, 2005). By contrast, in the crystal structure of the ecarpholin S–suramin complex (Zhou *et al.*, 2008) interactions of the ligand with the C-terminal region were observed, particularly with Asn114, Lys115 and Lys116 (this basic cluster has been proposed to be part of the putative MDoS; Fernandes *et al.*, 2014). Similarly, suramin interacts with MjTX-II residues from the MDoS (Lys115 and Lys116) and MDiS (Leu122 and Phe126). Thus, despite the particularities of the interaction between suramin and MjTX-II or ecarpholin S, there are some similarities in the regions where the ligand binds to the toxins (MDoS region) and in the oligomerization process undergone by the toxins after ligand binding. These facts indicate that the inhibitory processes of suramin towards both proteins are related.

In addition to suramin, rosmarinic acid also showed efficient neutralizing characteristics for Lys49-PLA₂s (Ticli *et al.*, 2005; dos Santos, Cardoso *et al.*, 2011) and its complex has been crystallographically characterized (dos Santos, Cardoso *et al.*, 2011). The authors of this study observed that rosmarinic acid is bound at the entrance to the hydrophobic channel. Therefore, based on the proposed myotoxic mechanism, dos Santos, Cardoso *et al.* (2011) suggested that the inhibitory processes occur because of ligand steric hindrance that blocks the access of substrates to the hydrophobic channel.

Consequently, based on the effective inhibition by suramin and rosmarinic acid, we propose two modes of inhibition of PLA₂-like proteins: (i) ligands binding in the hydrophobic channel or blocking its access and (ii) ligands binding or blocking access to the MDoS and MDiS regions. The first inhibition mode avoids the binding of fatty acid to the toxin that is necessary to activate the protein *via* an oligomeric change, whereas the second mode avoids toxin docking and membrane disruption. Because suramin and rosmarinic acid act in both inhibitory processes, our experimental results are promising for their potential use as drugs against the local effects of myotoxic toxins.

5. Conclusions

In this study, we demonstrated that suramin is a potent inhibitor that binds to MjTX-II with high affinity. The crystal structure of the MjTX-II–suramin complex demonstrated for

the first time an inhibitor that binds simultaneously to the sites of the toxin involved in membrane docking and disruption. Furthermore, the crystal structure, DLS and MD simulations identified the formation of higher-order oligomers (mainly tetramers), which also aids in the inhibitory process. The findings described in this work showed a great convergence with the data in the literature and with mechanism of action of PLA₂-like toxins proposed by our group in recent years. Based on these data, we suggest that suramin and other ligands (*e.g.* rosmarinic acid) should be clinically studied as inhibitors of the local myotoxic effects generated by PLA₂-like proteins.

Acknowledgements

This work was financially supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil. We are grateful for the use of the Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Brazil.

References

- Adams, P. D. *et al.* (2010). *Acta Cryst.* **D66**, 213–221.
- Arni, R. K. & Ward, R. J. (1996). *Toxicon*, **34**, 827–841.
- Arruda, E. Z., Silva, N. M., Moraes, R. A. & Melo, P. A. (2002). *Braz. J. Med. Biol. Res.* **35**, 723–726.
- Azevedo, W. F. de, Ward, R. J., Lombardi, F. R., Giglio, J. R., Soares, A. M., Fontes, M. R. M. & Arni, R. K. (1997). *Protein Pept. Lett.* **4**, 329–334.
- Burch, T. A. & Ashburn, L. L. (1951). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **31**, 617–623.
- Cavalcante, W. L. G., Campos, T. O., Dal Pai-Silva, M., Pereira, P. S., Oliveira, C. Z., Soares, A. M. & Gallacci, M. (2007). *J. Ethnopharmacol.* **112**, 490–497.
- Cavalcante, W. L. G., Silva, M. D. & Gallacci, M. (2005). *Chem. Biol. Interact.* **151**, 95–100.
- Chen, V. B., Arendall, W. B., Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S. & Richardson, D. C. (2010). *Acta Cryst.* **D66**, 12–21.
- Cherry, J. K. (1960). *East Afr. Med. J.* **37**, 550–558.
- Chioato, L., De Oliveira, A. H. C., Ruller, R., Sá, J. M. & Ward, R. J. (2002). *Biochem. J.* **366**, 971–976.
- Dennis, E. A., Cao, J., Hsu, Y.-H., Magriotti, V. & Kokotos, G. (2011). *Chem. Rev.* **111**, 6130–6185.
- Ducruix, A. & Giegé, R. (1992). *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins: A Practical Approach*. Oxford University Press.
- Emsley, P. & Cowtan, K. (2004). *Acta Cryst.* **D60**, 2126–2132.
- Fathi, B., Harvey, A. L. & Rowan, E. G. (2011). *J. Venom Res.* **2**, 6–10.
- Fernandes, C. A. H., Borges, R. J., Lomonte, B. & Fontes, M. R. M. (2014). *Biochim. Biophys. Acta*, **1844**, 2265–2276.
- Fernandes, C. A. H., Comparetti, E. J., Borges, R. J., Huancahuire-Vega, S., Ponce-Soto, L. A., Marangoni, S., Soares, A. M. & Fontes, M. R. M. (2013). *Biochim. Biophys. Acta*, **1834**, 2772–2781.
- Fernandes, C. A. H., Marchi-Salvador, D. P., Salvador, G. M., Silva, M. C. O., Costa, T. R., Soares, A. M. & Fontes, M. R. M. (2010). *J. Struct. Biol.* **171**, 31–43.
- Freire, E., Schön, A. & Velazquez-Campoy, A. (2009). *Methods Enzymol.* **455**, 127–155.
- Gallacci, M. & Cavalcante, W. L. G. (2010). *Toxicon*, **55**, 1–11.
- Gallacci, M., Oliveira, M., Pai-Silva, M. D., Cavalcante, W. L. G. & Spencer, P. J. (2006). *Exp. Toxicol. Pathol.* **57**, 239–245.
- Gunsteren, W. F. van & Berendsen, H. J. (1984). *J. Mol. Biol.* **176**, 559–564.
- Gutiérrez, J. M. & Lomonte, B. (2013). *Toxicon*, **62**, 27–39.

- Gutiérrez, J. M., Rucavado, A., Chaves, F., Díaz, C. & Escalante, T. (2009). *Toxicon*, **54**, 958–975.
- Harvey, A. L., Barfaraz, A., Thomson, E., Faiz, A., Preston, S. & Harris, J. B. (1994). *Toxicon*, **32**, 257–265.
- Heluany, N. F., Homs-Brandeburgo, M. I., Giglio, J. R., Prado-Franceschi, J. & Rodrigues-Simioni, L. (1992). *Toxicon*, **30**, 1203–1210.
- Henning, R. H., Rowan, E. G., Braga, M. F., Nelemans, A. & Harvey, A. L. (1996). *Eur. J. Pharmacol.* **301**, 91–97.
- Hodgson, W. C. & Wickramaratna, J. C. (2002). *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **29**, 807–814.
- Holland, D. R., Clancy, L. L., Muchmore, S. W., Ryde, T. J., Einspahr, H. M., Finzel, B. C., Heinrikson, R. L. & Watenpugh, K. D. (1990). *J. Biol. Chem.* **265**, 17649–17656.
- Krissinel, E. & Henrick, K. (2007). *J. Mol. Biol.* **372**, 774–797.
- Lin, M.-J., Tan, C.-T., Lee, S.-Y. & Lin-Shiau, S.-Y. (2000). *Neurosci. Lett.* **287**, 97–100.
- Lin-Shiau, S.-Y. & Lin, M.-J. (1999). *Eur. J. Pharmacol.* **382**, 75–80.
- Lomonte, B., Angulo, Y. & Calderón, L. (2003). *Toxicon*, **42**, 885–901.
- Lomonte, B., León, G., Angulo, Y., Rucavado, A. & Núñez, V. (2009). *Toxicon*, **54**, 1012–1028.
- Lovell, S. C., Davis, I. W., Arendall, W. B., de Bakker, P. I. W., Word, J. M., Prisant, M. G., Richardson, J. S. & Richardson, J. S. (2003). *Proteins*, **50**, 437–450.
- Magro, A. J., Fernandes, C. A. H., dos Santos, J. I. & Fontes, M. R. M. (2009). *Protein Pept. Lett.* **16**, 852–859.
- Marcussi, S., Sant’Ana, C. D., Oliveira, C. Z., Rueda, A. Q., Menaldo, D. L., Belebony, R. O., Stabeli, R. G., Giglio, J. R., Fontes, M. R. M. & Soares, A. M. (2007). *Curr. Top. Med. Chem.* **7**, 743–756.
- McCoy, A. J. (2007). *Acta Cryst.* **D63**, 32–41.
- Murakami, M. T., Arruda, E. Z., Melo, P. A., Martinez, A. B., Calil-Eliás, S., Tomaz, M. A., Lomonte, B., Gutiérrez, J. M. & Arni, R. K. (2005). *J. Mol. Biol.* **350**, 416–426.
- Murakami, M. T., Viçoti, M. M., Abrego, J. R. B., Lourenzoni, M. R., Cintra, A. C. O., Arruda, E. Z., Tomaz, M. A., Melo, P. A. & Arni, R. K. (2007). *Toxicon*, **49**, 378–387.
- Oliveira, M. de, Cavalcante, W. L. G., Arruda, E. Z., Melo, P. A., Dal-Pai Silva, M. & Gallacci, M. (2003). *Toxicon*, **42**, 373–379.
- Oliveira, R. C. W. de (2009). *Animais Peçonhentos do Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Envenenamentos*, p. 550. São Paulo: Sarvier.
- Oostenbrink, C., Soares, T. A., van der Vegt, N. F. & van Gunsteren, W. F. (2005). *Eur. Biophys. J.* **34**, 273–284.
- Oshima-Franco, Y., Leite, G. B., Belo, C. A. D., Hyslop, S., Prado-Franceschi, J., Cintra, A. C. O., Giglio, J. R., da Cruz-Hofling, M. A. & Rodrigues-Simioni, L. (2004). *Pharmacol. Toxicol.* **95**, 175–182.
- Otero, R. et al. (2002). *Toxicon*, **40**, 1107–1114.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). *Methods Enzymol.* **276**, 307–326.
- Ownby, C. L., Selistre de Araujo, H. S., White, S. P. & Fletcher, J. E. (1999). *Toxicon*, **37**, 411–445.
- Ponce-Soto, L. A., Barros, J. C., Marangoni, S., Hernandez, S., Dal Belo, C. A., Corrado, A. P., Hyslop, S. & Rodrigues-Simioni, L. (2009). *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **150**, 291–297.
- Randazzo-Moura, P., Ponce-Soto, L. A., Rodrigues-Simioni, L. & Marangoni, S. (2008). *Protein J.* **27**, 355–362.
- Rodrigues, V. M., Marcussi, S., Cambraia, R. S., de Araújo, A. L., Malta-Neto, N. R., Hamaguchi, A., Ferro, E. A., Homs-Brandeburgo, M. I., Giglio, J. R. & Soares, A. M. (2004). *Toxicon*, **44**, 305–314.
- Salvador, G. H. M., Cavalcante, W. L. G., dos Santos, J. I., Gallacci, M., Soares, A. M. & Fontes, M. R. M. (2013). *Toxicon*, **72**, 52–63.
- Salvador, G. H. M., Fernandes, C. A. H., Magro, A. J., Marchi-Salvador, D. P., Cavalcante, W. L. G., Fernandez, R. M., Gallacci, M., Soares, A. M., Oliveira, C. L. P. & Fontes, M. R. M. (2013). *PLoS One*, **8**, e60610.
- Santos, J. I. dos, Cardoso, F. F., Soares, A. M., dal Pai Silva, M., Gallacci, M. & Fontes, M. R. M. (2011). *PLoS One*, **6**, e28521.
- Santos, J. I. dos, Cintra-Francischini, M., Borges, R. J., Fernandes, C. A. H., Pizzo, P., Cintra, A. C. O., Braz, A. S. K., Soares, A. M. & Fontes, M. R. M. (2011). *Proteins* **79**, 61–78.
- Santos, J. I. dos, Soares, A. M. & Fontes, M. R. M. (2009). *J. Struct. Biol.* **167**, 106–116.
- Schneider, J. (1963). *Bull. World Health Organ.* **28**, 763–786.
- Scott, D. L. & Sigler, P. B. (1994). *Adv. Protein Chem.* **45**, 53–88.
- Soares, A. M., Andrião-Escarso, S. H., Bortoleto, R. K., Rodrigues-Simioni, L., Arni, R. K., Ward, R. J., Gutiérrez, J. M. & Giglio, J. R. (2001). *Arch. Biochem. Biophys.* **387**, 188–196.
- Soares, A. M., Rodrigues, V. M., Homs-Brandeburgo, M. I., Toyama, M. H., Lombardi, F. R., Arni, R. K. & Giglio, J. R. (1998). *Toxicon*, **36**, 503–514.
- Stábeli, R. G., Amui, S. F., Sant’Ana, C. D., Pires, M. G., Nomizo, A., Monteiro, M. C., Romão, P. R. T., Guerra-Sá, R., Vieira, C. A., Giglio, J. R., Fontes, M. R. & Soares, A. M. (2006). *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **142**, 371–381.
- Ticli, F. K., Hage, L. I. S., Cambraia, R. S., Pereira, P. S., Magro, A. J., Fontes, M. R. M., Stábeli, R. G., Giglio, J. R., França, S. C., Soares, A. M. & Sampaio, S. V. (2005). *Toxicon*, **46**, 318–327.
- Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E. & Berendsen, H. J. (2005). *J. Comput. Chem.* **26**, 1701–1718.
- Vega, S., Abian, O. & Velazquez-Campoy, A. (2015). *Methods*, **76**, 99–115.
- Wallace, A. C., Laskowski, R. A. & Thornton, J. M. (1995). *Protein Eng. Des. Sel.* **8**, 127–134.
- Ward, R. J., Chioato, L., de Oliveira, A. H. C., Ruller, R. & Sá, J. M. (2002). *Biochem. J.* **362**, 89–96.
- Watanabe, L., Soares, A. M., Ward, R. J., Fontes, M. R. M. & Arni, R. K. (2005). *Biochimie*, **87**, 161–167.
- Wiederstein, M. & Sippl, M. J. (2007). *Nucleic Acids Res.* **35**, W407–W410.
- Williams, D., Gutiérrez, J. M., Harrison, R., Warrell, D. A., White, J., Winkler, K. D. & Gopalakrishnakone, P. (2010). *Lancet*, **375**, 89–91.
- Williamson, J. & Desowitz, R. S. (1956). *Nature (London)*, **177**, 1074–1075.
- Zhou, X., Tan, T.-C., Valiyaveetil, S., Go, M. L., Manjunatha Kini, R., Velazquez-Campoy, A. & Sivaraman, J. (2008). *Biophys. J.* **95**, 3366–3380.



Structural and Calorimetric Studies Demonstrate that Xeroderma Pigmentosum Type G (XPG) Can Be Imported to the Nucleus by a Classical Nuclear Import Pathway via a Monopartite NLS Sequence

Andrea C. de Barros¹, Agnes A.S. Takeda¹, Thiago R. Dreyer¹,
Adrian Velazquez-Campoy^{2,3,4}, Bostjan Kobe⁵ and Marcos R.M. Fontes¹

1 - Departamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 18618-970 Brazil

2 - Institute of Biocomputation and Physics of Complex Systems, Joint-Unit Institute of Physical Chemistry "Rocasolano"—Consejo Superior de Investigaciones Científicas—Institute of Biocomputation and Physics of Complex Systems, University of Zaragoza, Zaragoza, 50018, Spain

3 - Department of Biochemistry and Molecular and Cell Biology, University of Zaragoza, Zaragoza, 50018, Spain

4 - Fundación Agencia Aragonesa para la Investigación y el Desarrollo, Government of Aragon, Zaragoza, 50018, Spain

5 - School of Chemistry and Molecular Biosciences, Institute for Molecular Bioscience and Australian Infectious Diseases Research Centre, University of Queensland, Brisbane, Queensland 4072, Australia

Correspondence to Marcos R.M. Fontes: Departamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 18618-970, Brazil. fontes@ibb.unesp.br
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2016.01.019>

Edited by: M. Guss

Abstract

Xeroderma pigmentosum type G (XPG) proteins are involved in DNA lesion recognition and promotion of nucleotide excision repair. Specific mutations in these proteins may lead to Cockayne syndrome, in which the patients may display severe developmental retardation and neurological abnormalities. No structural information is available for their spacer region or the C-terminal domain, which are important, respectively, for specific nucleotide excision repair activity and substrate specificity, as well as nuclear translocation. Immunofluorescence studies suggested two specific regions of the XPG C-terminus as potential bipartite nuclear localization sequences, which would be responsible for its translocation to the nucleus by the classical nuclear import pathway mediated by the importin- α (Imp α). Thus, in order to test these hypotheses and gain insight into the structural basis for the nuclear import process for the XPG protein, we solved the crystal structures of complexes formed by the Imp α and peptides corresponding to both putative nuclear localization signal (NLS) sequences (XPG1 and XPG2) and performed isothermal titration calorimetry assays to determine their binding affinities. Structural experiments confirm the binding of both NLS peptides to Imp α but, unexpectedly, they bind to the receptor as monopartite NLSs. The isothermal titration calorimetry assays demonstrated that XPG1 and XPG2 peptides bind to two separate binding sites, but with high affinity to the major NLS-binding site of the Imp α , resembling classical monopartite SV40 TAg NLS. The results lead to insights about what distinguishes monopartite and bipartite NLSs, as well as the differential roles of XPG1 and XPG2 NLSs in the nuclear localization of XPG.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Xeroderma pigmentosum proteins are involved in DNA lesion recognition and promotion of nucleotide excision repair (NER) [1]. Xeroderma pigmentosum proteins are classified in seven groups (XPA through XPG) associated with distinct steps of NER [2]. They also interact with proteins critical for genome

organization and maintenance not involved in NER [3]. Mutations in xeroderma pigmentosum proteins are often related to different cancer types and are responsible for the disease xeroderma pigmentosum, an autosomal recessive skin disorder characterized by extreme UV sensitivity and an increased incidence of sunlight-induced skin cancers. Xeroderma pigmentosum type G (XPG) proteins (also known as excision

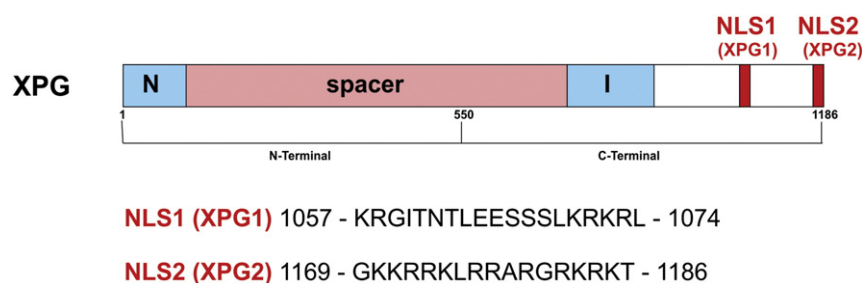


Fig. 1. Schematic diagram of the XPG domains and its putative NLS regions. Nucleases domains (N and I) are shown in blue, spacer region is in salmon and the two putative NLS regions (termed here as XPG1 and XPG2) are in red. Both putative NLS sequences [12] are also shown.

repair cross-complementation group 5) belong to the FEN-1 family of structure-specific nucleases and play an essential role in both NER pathways, transcription-coupled repair and global genome repair [1,4–8]. Mutations in XPG proteins may also lead to the Cockayne syndrome, associated with severe developmental retardation, dwarfism and neurological abnormalities [9,10].

XPG proteins are large proteins (134 kDa) that have two nuclease domains similar to FEN-1 proteins but also contain a spacer region of approximately 600 amino acids between them, as well as a C-terminal region of approximately 300 amino acids [11] (Fig. 1). Despite that both XPG and FEN-1 contain nuclease domains, they present different activities; FEN-1 is primarily involved in DNA replication, while XPG is involved in DNA repair by NER, which is a function mainly attributed to the spacer region. Domain-swap studies between FEN-1 and XPG indicated specific regions of XPG involved in its NER activity and substrate specificity [11]. Immunofluorescence studies suggested two regions of the XPG C-terminal domain as potential nuclear localization signals (NLSs) [12] responsible for the translocation of the XPG to the nucleus. Structural data of the XPG are scarce; structures are available for its nuclease domains [13], but no structural information is available for the spacer region or for its C-terminal domain.

Thus, in order to learn more about structure–function relationships in XPG, it is essential to understand how its transport to the cell nucleus occurs and how it is regulated. Several proteins whose functions are associated to DNA replication (such as FEN-1) or DNA repair [14–17] are imported to the cell nuclei by the so-called classical nuclear import pathway. This is the best characterized and probably the most used protein import mechanism to the cell nucleus, which involves the binding of the cargo protein via nuclear localization sequence (NLS) recognized by the importin- α protein (Imp α). Imp α is an adaptor that binds to the carrier importin- β

(Imp β), forming the cargo protein–Imp α –Imp β complex. This complex is transported to the nucleus through interaction between Imp β and proteins from the nuclear pore complex, known as nucleoporins [18]. Classical nuclear localization sequences (cNLSs) are the best-characterized targeting signals that link the cargo proteins to the Imp α import receptor. They are formed by one or two basic clusters of amino acid residues, termed monopartite or bipartite NLSs, respectively, and have the following consensus sequences: **K**(K/R)**X**(K/R) for monopartite cNLS and **KRR**_{10–12}**K**(K/R)**X**(K/R) for bipartite cNLS (where X corresponds to any residue and residues in boldface indicate critical residues) [19,20]. Imp α receptor is able to bind these positively charged clusters at two different sites, called as minor or major binding sites [21]; monopartite sequences usually bind to the major binding site, and bipartite sequences bind at both sites.

Previous studies with peptides from the XPG C-terminal region, using *in situ* immunofluorescence localization of transiently expressed β -galactosidase fusion proteins, uncovered two putative bipartite cNLSs [12] (Fig. 1). The authors of this study also hypothesized that one of these peptides may contain a putative nuclear retention signal (NRS) [22]. Thus, in order to test these hypotheses and gain insights into the structural basis for nuclear import for the XPG protein, we solved the crystal structures of the complexes formed by Imp α and both putative NLSs sequences (termed here as Imp α -XPG1 and Imp α -XPG2). Furthermore, we also performed isothermal titration calorimetry (ITC) assays aiming to quantify the binding process between XPG NLS peptides and Imp α . Structural experiments confirmed the binding of both NLS peptides to Imp α , but surprisingly, they bound to the receptor as classical monopartite NLS peptides. ITC assays demonstrated that XPG1 and XPG2 peptides bind with high affinity to the major NLS-binding site of the Imp α , similarly to the classical monopartite SV40 TAG NLS [23,24].

Table 1. X-ray data collection and refinement statistics

	Imp α -XPG1 NLS	Imp α -XPG2 NLS
Diffraction data statistics		
Unit cell (Å)		
<i>a</i>	78.6	78.5
<i>b</i>	89.5	90.8
<i>c</i>	99.8	101.0
Space group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	
Resolution (Å)	40.0–2.0 (2.07–2.0) ^a	40.0–2.8 (2.88–2.8) ^a
Unique reflections	47,986	33,617
Multiplicity	4.3 (4.0) ^a	4.4 (4.3) ^a
Completeness (%)	99.4 (99.1) ^a	99.3 (100) ^a
<i>R</i> _{merge} ^b (%)	12.9 (64.1) ^a	13.8 (94.9) ^a
Average <i>I</i> /σ(<i>I</i>)	6.3 (2.4) ^a	6.9 (1.5) ^a
Refinement statistics		
Resolution (Å)	40.0–2.0 (2.07–2.0) ^a	40.0–2.80 (2.88–2.80) ^a
Number of reflections	47,972	17,937
<i>R</i> _{cryst} (%) ^c	17.1	17.1
<i>R</i> _{free} (%) ^d	19.2	21.7
Number of non-hydrogen atoms		
Protein	3250	3163
Peptide	139	107
Solvent	189	02
Mean <i>B</i> -factor (Å ²)	46.5	77.0
Coordinate error (Å) ^e	0.20	0.33
RMSD from ideal values ^e		
Bond lengths (Å)	0.007	0.010
Bond angles (°)	1.08	1.28
Ramachandran plot (%)		
Residues in most favored (disallowed) regions ^f	99.7 (0.23)	95.3 (1.40)

^a Values in parentheses are for the highest-resolution shell.

^b $R_{\text{merge}} = \sum hkl (\sum i |I(hkl, i) - \langle I(hkl) \rangle|) / \sum hkl, i I(hkl)$, where $I(hkl, i)$ is the intensity of an individual measurement of the reflection with Miller indices h , k and l , and $\langle I(hkl) \rangle$ is the mean intensity of that reflection. Calculated for $IN - 3\sigma(I)$ [40].

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

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

^e Calculated based on Luzzati plot with the program SFCHECK [44].

^f Calculated with the program PROCHECK [44].

Results

Structure of Imp α complexed with NLS peptides corresponding to different regions of the XPG protein

Peptides corresponding to two different regions of the human XPG (XPG1 NLS and XPG2 NLS) were co-crystallized with N-terminally truncated mouse Imp α lacking residues 1–69 (Imp α ΔIBB); the truncated residues are responsible for its autoinhibition [25]. Mouse Imp α is a suitable model for the human protein as the residues interacting with NLS peptides are strictly conserved, as previously observed [17,21,26]. The co-crystals were grown under similar conditions

to other mouse Imp α -NLS peptides complexes and were isomorphous to them [17,26,27]. The structures were refined at 2.0 and 2.8 Å resolutions, respectively, for Imp α -XPG1 NLS and Imp α -XPG2 NLS complexes (Table 1). Electron density maps based on the Imp α model clearly showed electron density corresponding to fragments of the peptides in two different regions of the protein, known as major and minor binding sites (Figs. 2 and 3). These NLS-binding sites are located in a concave groove on the surface of Imp α formed by the H3 helices. The major binding site is located at armadillo (ARM) repeats 2–4, while the minor site is located at ARM repeats 6–8. The Imp α structures in both XPG1 and XPG2 NLS complexes are essentially identical with that of full-length Imp α and other complexes with monopartite NLS-like peptides reported previously. The root-mean-square deviations (RMSDs) of C α atoms of Imp α residues 72–496 are 0.24 and 0.30 Å between the full-length Imp α (PDB ID 1IAL) and the Imp α -XPG1 or Imp α -XPG2 complexes, respectively. The equivalent superpositions between Imp α -SV40 TAg NLS (PDB ID 1EJL) and the Imp α -XPG1 NLS or Imp α -XPG2 NLS complexes yield RMSD values of 0.25 and 0.32 Å, respectively.

Binding of XPG1 NLS to Imp α structure

The crystal structure of Imp α -XPG1 NLS complex showed the presence of two peptides bound to Imp α . Although the peptide contains two clusters of positively charged amino acids, it appears to interact with its NLS-binding sites resembling a monopartite NLS sequence [21]. The peptides bind with their main chains positioned in antiparallel configuration when compared to the direction of the ARM repeats and the sequences could be identified unambiguously in the electron density maps. At the major NLS-binding site, the electron density is present for seven peptide residues (¹⁰⁶⁹LKRKRLS¹⁰⁷⁵) with an average *B*-factor of 53.8 Å² (the average *B*-factor for entire Imp α is 52.4 Å²) (Fig. 2). The residues bound to the core of major NLS-binding site (residues 1070–1074; positions P1–P5) have lower average *B*-factors (49.6 Å²) compared to Imp α . The residues K1071 and R1074 (positions P2 and P5) have the lowest *B*-factors (41.6 and 46.5 Å², respectively) and the largest number of interactions between NLS side chains and side chains of conserved residues of Imp α (Fig. 4). At the minor site, the electron density is present for six peptide residues (¹⁰⁶⁹LKRKRL¹⁰⁷⁴) with an average *B*-factor of 61.8 Å² (Fig. 2). The residues bound in the core of the minor NLS-binding site (residues 1071–1074; positions P1'–P4') have higher average *B*-factors (58.2 Å²) compared to the entire protein. The buried surface area between the protein and the peptide corresponds to 775.0 Å² at the major site and 570.3 Å² at the minor site. The superposition of C α atoms between XPG1 and SV40

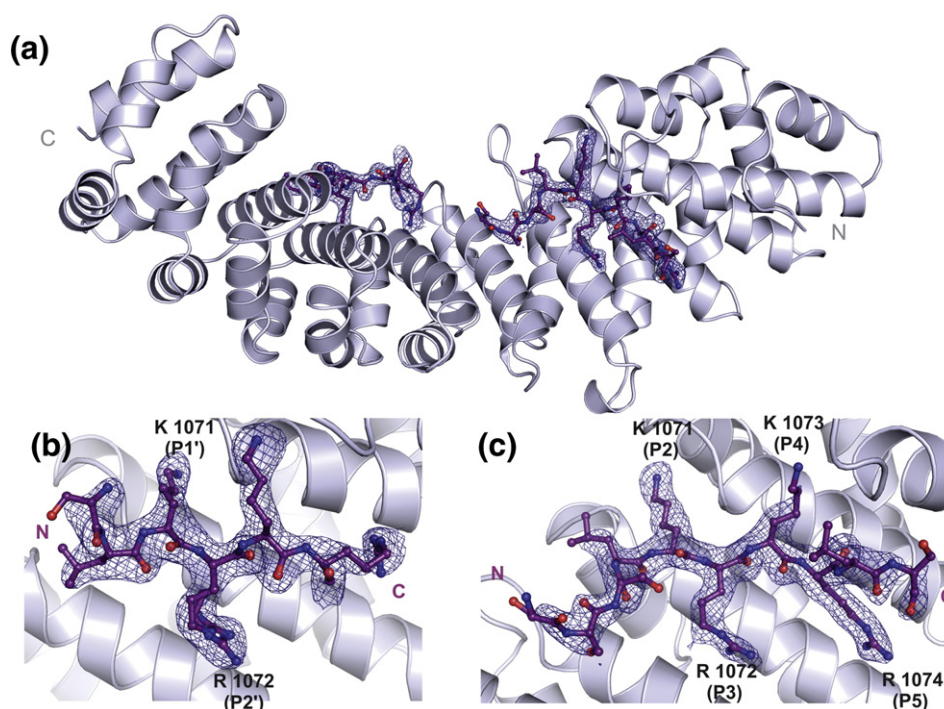


Fig. 2. Crystal structure of the Imp α -XPG1 NLS complex. (a) Overall structure of the Imp α -XPG1 NLS complex. Imp α is shown as a ribbon diagram and XPG1 NLS peptide at major and minor binding sites are shown in stick representation. (b) Electron density omit map of the XPG1 NLS peptide at the minor site region of Imp α (contoured at 2 S.D.). The main peptide residues are labeled in their corresponding binding position. (c) As in (b), but for major site region of the Imp α .

TAg NLS peptides yields an RMSD of 0.11 Å for the major binding site and 0.12 Å for the minor binding site (Fig. 5).

Binding of XPG2 NLS to Imp α structure

The crystal structure of Imp α -XPG2 NLS complex showed the presence of two peptides bound to Imp α , again interacting with its NLS-binding sites resembling a monopartite NLS sequence [21]. In this case, some ambiguity was observed in the electron density for few positions of the minor binding site, which could be related to multiple binding conformation of the peptide and to the moderated resolution of the data. At the major NLS-binding site, the electron density is present for eight peptide residues (¹¹⁶⁸GKKRRKLR¹¹⁷⁶) with an average *B*-factor of 84.0 Å² (the average *B*-factor for Imp α is 74.4 Å²) (Fig. 3). The residues bound in the core of the major NLS-binding site (residues 1169–1073; positions P1–P5) have lower average *B*-factors (69.9 Å²) compared to Imp α . The residues K1070 and R1073 (positions P2 and P5) have the lowest *B*-factors (64.9 and 67.8 Å², respectively) and the largest number of interactions between NLS side chains and side chains of conserved residues of Imp α (Fig. 4). At the minor site, the electron density is present for five peptide residues (¹¹⁸²RKRKT¹¹⁸⁶)

with an average *B*-factor of 80.9 Å² (Fig. 3). The residues bound in the core of the minor NLS-binding site (residues 1183–1186; positions P1'–P4') have higher average *B*-factors (80.3 Å²) compared to the entire protein. The buried surface area between the protein and the peptide corresponds to 666.7 Å² at the major site and 530.4 Å² at the minor site. The superposition of C α atoms between XPG2 and SV40 TAg NLS peptides yields an RMSD of 0.09 Å for the major binding site and 0.53 Å for the minor binding site (Fig. 5).

Comparison between the binding of XPG1, XPG2 and other NLSs to Imp α

The comparison between XPG1, XPG2, SV40 TAg and other NLS peptides displays high conservation of the peptides conformation in major site region but higher deviation for the minor binding site, particularly for the XPG2 peptide (Fig. 5). The alignments of XPG1, XPG2, SV40 TAg and other monopartite NLSs are shown in Table 2. It can be observed that XPG1 and XPG2 NLSs bind according to the established consensus sequence in the major binding site. Furthermore, XPG1 and XPG2 NLSs have KR residues, respectively, at positions P1' and P2' of the minor binding site; this is the pattern adopted for the majority of monopartite NLS

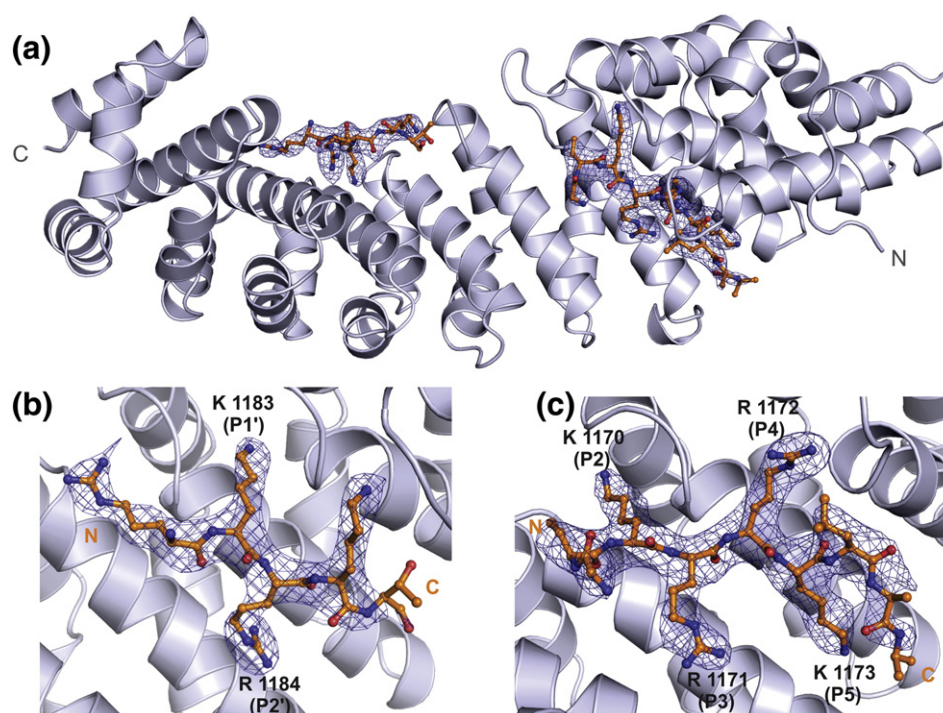


Fig. 3. Crystal structure of the Imp α -XPG2 NLS complex. (a) Overall structure of the Imp α -XPG2 NLS complex. Imp α is shown as a ribbon diagram and XPG2 NLS peptide at major and minor binding sites are shown in stick representation. (b) Electron density omit map of the XPG2 NLS peptide at the minor site region of Imp α (contoured at 2 S.D.). The main peptide residues are labeled in their corresponding binding position. (c) As in (b), but for major site region of Imp α .

peptides, which bind to both major and minor binding sites (SV40 TAg NLS is an exception where alternative registers were observed [21]).

Calorimetric assays of XPG1 and XPG2 NLSs and Imp α

Representative thermograms of calorimetric titrations for both complexes are shown in Fig. 6. Binding isotherms for XPG1 and XPG2 NLS peptides and Imp α receptor were best fitted with a non-linear regression model of two binding sites. Thermodynamic parameters determined in the data analysis are presented in Table 3. The dissociation constants (K_d) of XPG1 and XPG2 NLSs for major binding site of Imp α are in the same order of magnitude; however, for the minor binding site, the binding affinity for XPG2 NLS to the receptor is very low ($140 \pm 20 \mu\text{M}$). Thermodynamic parameters (ΔH and ΔS) are very similar for the major NLS-binding site for both XPG1 and XPG2 NLSs, with favorable enthalpic and entropic contributions to the binding Gibbs energy. However, the interaction in the minor NLS-binding site differs significantly not only in affinity but also in the partition of the Gibbs energy into binding enthalpy and entropy.

Discussion

XPG1 and XPG2 are classical monopartite NLSs

The crystal structures of Imp α -XPG1 NLS and Imp α -XPG2 NLS complexes are very similar to other monopartite NLS-Imp α complexes for Imp α from *Mus musculus* [17,21,26] and from other organisms [23,28–30]. Imp α structures have conserved concave surfaces, formed by α -helices where the NLS-binding sites are localized. Conserved Asn residues form hydrogen bonds with the cNLS backbone, and Trp side chains form an array of binding cavities with negative residues located at the end of these grooves. The disruption of this Trp-Asn array in the ARM repeats 5 and 6 is also a conserved feature in all Imp α structures, creating a region where the so-called linker region for bipartite NLSs is accommodated. The presence of an Arg residue in the ARM repeat 6 and a Tyr residue in the ARM repeat 5 can increase the affinity of the NLS linker region to Imp α [17,31].

Structural comparisons of XPG1 and XPG2 bound to Imp α , with the cNLS monopartite peptides, such as SV40 TAg, Ku70 and Ku80 NLSs bound to Imp α ,

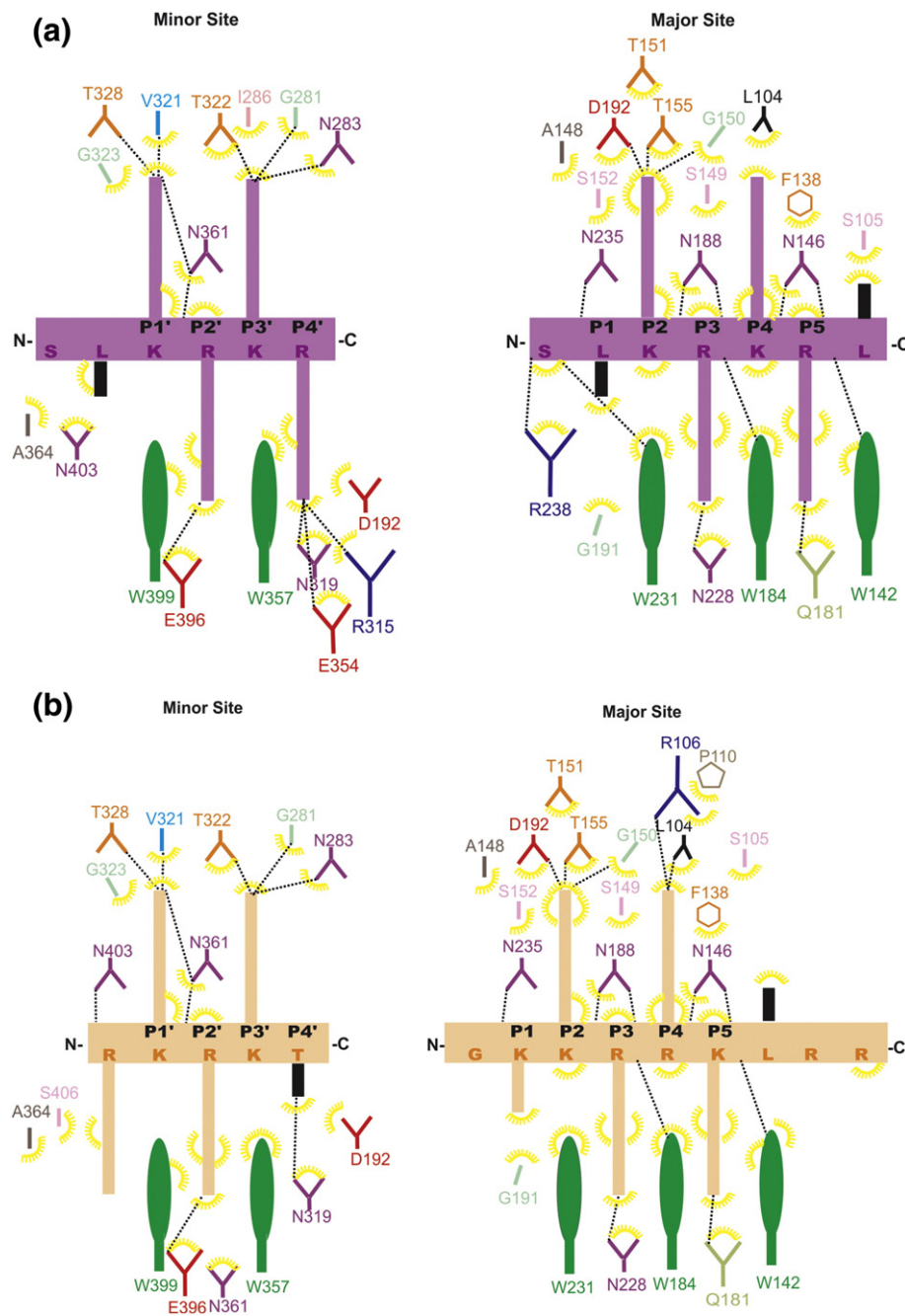


Fig. 4. Schematic diagram of the interactions between the XPG1 and XPG2 NLS peptides and minor and major binding sites of Imp α . The peptide backbone is drawn in purple [(a), XPG1 NLS] or in orange [(b), XPG2 NLS] with the residues identified by the one-letter code. Imp α side-chain residues interacting with the peptide are indicated with their names and different colors. Polar contacts are shown with broken lines, and hydrophobic contacts are indicated by arcs with radiating spokes.

show that these structures are well conserved, as observed in Fig. 5. Other structural studies also demonstrated the high structural conservation of monopartite NLS peptides [26] when bound to the protein receptor. ITC assays using XPG1 and XPG2 NLS peptides reveal two binding sites of Imp α with

different affinity values, similar to the monopartite SV40 TAg NLS peptide [23,24]. K_d values for XPG1, XPG2 or SV40 TAg NLSs binding to the major binding sites of mammalian or *Neurospora crassa* Imp α proteins are of similar magnitude. This fact is consistent with the high conservation of residues in

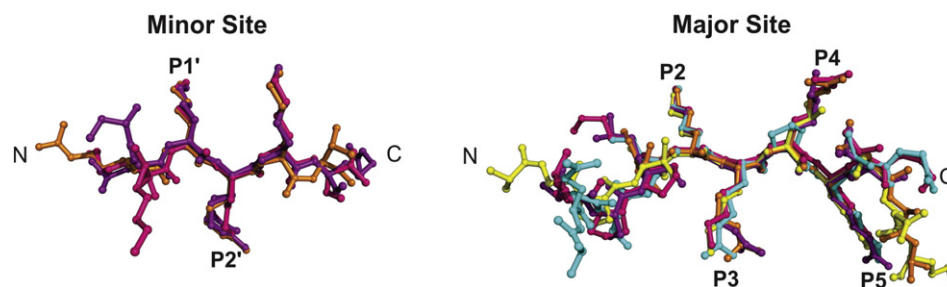


Fig. 5. Comparison of NLS peptides in the minor and major NLS-binding sites. XPG1 (purple), XPG2 (orange), SV40 TAg (pink) [31], Ku70 (cyan) [26] and Ku80 (yellow) [26]. Positions binding to the major (P1–P5) and minor (P1'–P4') binding sites are identified along the chains.

the most important positions of major binding sites, consistent with the consensus sequence (Table 2). Thus, structural and calorimetric data unambiguously show that XPG1 and XPG2 NLS peptides bind to Imp α as a classical monopartite NLSs.

At the minor binding site, the XPG2 peptide has a slightly higher RMSD to the SV40 TAg NLS peptide, compared to XPG1, but the residues in the key positions P1'–P2'–P3' positions are structurally conserved (Fig. 5). However, the analysis of the electron density map of the XPG2 NLS peptide shows some ambiguity, particularly at the N- and C-termini of the peptide, which could be caused by multiple interaction modes between the peptide and

the receptor, peptide staggering and the moderate resolution of the data. This behavior may be due to the presence of several Lys/Arg residues in three different regions of the XPG2 NLS (Table 2), which may enable multiple binding modes. Peptide staggering has been also observed in the minor NLS-binding site of the SV40 TAg NLS structure, which also has a large content of basic residues [21]. The ITC assays performed using XPG2 NLS peptide show lower-affinity values compared to XPG1 NLS (40-fold difference). The structural reasons for this are not entirely clear, but we suggest that it may be related to the multiple binding modes of peptide with the protein receptor. Nuclear localization patterns

Table 2. Binding of monopartite and bipartite NLSs to specific binding pockets of *M. musculus* Imp α

NLSs		Minor					Major				
Monopartite		P1'	P2'	P3'	P4'		P1	P2	P3	P4	P5
Ku80						E D G P T A K K L K T E					
Ku70		K	V	T	K R	K H D N E G S G S K R P K K					
PLSCR1							G K I S K H W				
AR			R	K	C Y	E A G M T L G A R K K L K K L G					
SV40	P	K	K	R	K V	A A P P K K K K V E					
CN-SV40		K	K	R	K V	... A P P K K K R K V					
c-Myc			K	R	V K L		P A A K R V K L D				
mPet TM		K	K	R	R E A		F K K K R R E A				
XPG1	S	L	K	R	K R		S L K R K R R				
XPG2		R	K	R	K T		G K K R R K L R				
Bipartite		P1'	P2'	P3'	P4'	Linker	P1	P2	P3	P4	P5
FEN-1	S	S A	K R	K R	E A	P E P K A G S T K K K A K T					
NP		A V	K R	P S	A	A T K K A G Q A K K K K L					
RB			K R	S A		E G S N P P K P L K K L R G					
N1N2		R K	K R	K T	E	E E S P L K D K A K K S K G					
CBP80		S	R R	R H	S	D E N D G G Q P H K R R K T S					
mCBP80		M	S R	R R	H S	Y E N D G G Q P H K R R K T S					
yCBP80	N	R	K R	R G	D	FDEDENYRDFRPR	M P K R R Q R I P				
TPX2			K R	K H	...		... V K M I K L				
Prp20			K R	T V		ATNGDASGA	H R A K K M S K				
BIMAX1	P	R	K R	P L		E W D E D E E P P R K R R L W					
BIMAX2	R	R R	K R	K R		E W D D D D D P P K K R R R L D					
Consensus			K R			10–12 residues		K	R/K	X	R/K

Ku80 [26]; Ku70 [26]; PLSCR1 [46]; AR [24]; SV40 [21]; CN-SV40 [27]; c-Myc [47]; mPet TM [48]. FEN-1 [17]; NP [21]; RB [27]; N1N2 [27]; CBP80 [49]; mCBP80 [19]; yCBP80 [19]; TPX2 [50]; Prp20 [51]; BIMAX1 [19]; BIMAX2 [19]. Consensus [33].

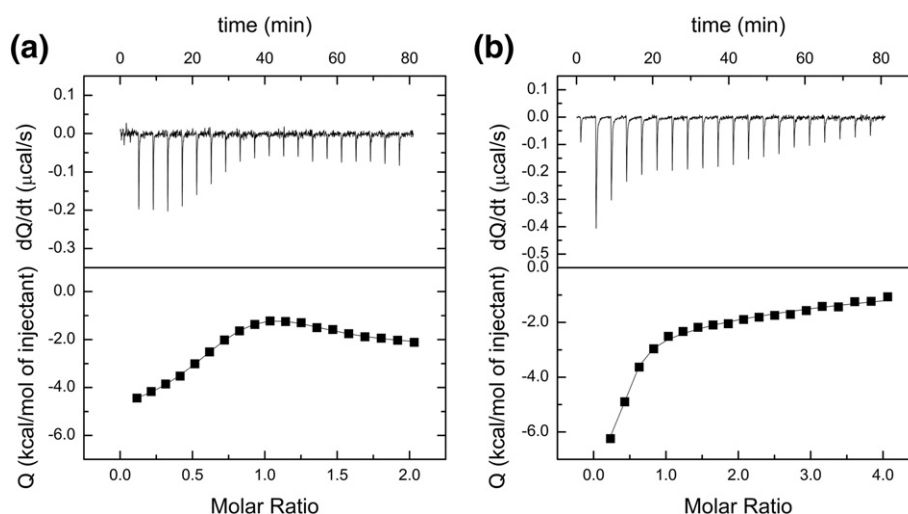


Fig. 6. Calorimetric titration of XPG1 and XPG2 NLS peptides into Imp α . The upper panel shows the raw data thermogram (thermal power as a function of time) of the titration of Imp α with (a) XPG1 and (b) XPG2 NLSs. The lower panel shows the binding isotherm (ligand-normalized integrated heat as a function of the molar ratio). Affinities and enthalpy changes were determined by a general non-linear regression model considering two ligand binding sites (continuous line).

differ between XPG1 and XPG2 [13], which may be caused by the binding differences between the NLS peptides.

Why XPG1 and XPG2 NLS peptides do not bind to Imp α as classic bipartite NLSs?

Candidates for NLS in the XPG protein have been tested using *in situ* immunofluorescence localization of transiently expressed β -galactosidase fusion proteins [12]. The authors of the study proposed two peptides from the C-terminal region of XPG: NLS-B or XPG1 (¹⁰⁵⁷KRGITNTLEESSSLKRKRL¹⁰⁷⁴) and NLS-C or XPG2 (¹¹⁶⁹GKKRRKLRRARGRKRT¹¹⁸⁶) as putative bipartite NLSs. This conclusion is partially supported by the analysis using the PSORT program [32], which predicts only the XPG1 sequence as a probable bipartite NLS. Surprisingly, our structural results clearly show that both peptides are bound to the Imp α receptor as classic monopartite NLSs. Furthermore, ITC results for XPG1 and XPG2 NLSs demonstrate that the ligands bind to the receptor at two sites with different

affinities, similarly to the classical monopartite NLS SV40 TAg, supporting the structural results [24].

Taking into account that the current consensus sequence for a classical bipartite NLS is KRX₁₀₋₁₂K(K/R)X(K/R) [27,31,33], it is possible to conclude that the XPG2 sequence does not match the consensus sequence for bipartite NLSs because a Lys residue should be present in the position P1' and an Arg residue should be present in the position P2' with a minimum of 10 residues in the linker region [31] (Table 2). On the other hand, XPG1 matches all requirements for a classical bipartite NLS; however, the structural data obtained here indicate that the C-terminal basic cluster (KRKR) of the peptide has a higher affinity for the minor site than its N-terminal basic cluster (KR).

It has been suggested that the positions preceding the P1' and following P2' contribute significantly to the binding with the minor site [16,19,31]. Additionally, the content of acidic, proline and hydrophobic residues in the linker region also has a role in the stabilization of bipartite NLS peptides [17,19,34,35]. It can be observed in the Imp α -XPG1 NLS structure that P3' and P4' positions are often occupied with, respectively, Lys and Arg residues (Table 2). The Lys side chain at the P3' position interacts to N283, T322 and G381 by hydrogen bonds and with other residues by hydrophobic contacts (Fig. 4). These interactions would not occur if the peptide bound to Imp α as a bipartite NLS because a Gly residue would be in the P3' position (Table 2). Similarly, the Arg side chain at the P4' position is hydrogen-bonded to E354, R315 and N319 (Fig. 4). These interactions would be not possible if the Ile residue would be in this position for a supposed bipartite interaction of the XPG1 peptide.

Table 3. Thermodynamic parameters for binding of XPG1 and XPG2 NLSs to Imp α

		Major binding site	Minor binding site
Imp α -XPG1 NLS	K_d (μ M)	0.45 ± 0.05	3.4 ± 0.5
	ΔH (kcal/mol)	-3.2 ± 0.3	3.8 ± 0.3
	$-T\Delta S$ (cal/mol/deg)	-5.3 ± 0.3	11.1 ± 0.1
Imp α -XPG2 NLS	K_d (μ M)	0.91 ± 0.09	140 ± 20
	ΔH (kcal/mol)	-6.9 ± 0.8	-21 ± 1
	$-T\Delta S$ (cal/mol/deg)	-1.2 ± 0.8	16 ± 1

Furthermore, the putative linker region of the XPG1 peptide presents several uncharged polar residues and just two polar residues. These residues do not present favorable interactions with Imp α according to previous studies [19,35]. It has also been observed that the 12-residue length for linker region, as for XPG1 NLS, is less favorable compared to the 11-residue length or the 10-residue length [27].

It can be noted from Table 2 that the majority of bipartite NLS sequences bound to Imp α present Lys/Arg residues in the P3' position and it was observed that monopartite NLS peptides that only bind to major binding site do not contain three sequential Lys/Arg residues; their binding to the minor binding site is therefore not favored (Table 2). These observations point to the importance of Lys/Arg residues at the P3' for minor site binding. Similar features are observed in the P3 position (major NLS-binding site), where the side chain of a basic residue is hydrogen-bonded to Asn of Imp α and it is not a mandatory residue for peptide binding but strengthens its affinity (e.g., TPX2 and Prp20 peptides do not contain basic residues in the P3 position; Table 2).

What is the role of XPG1 and XPG2 sequences in the XPG protein ?

XPG is a protein with a molecular mass of 134 kDa (1186-amino-acid residues for human XPG) that needs to be actively translocated to the cell nucleus to promote DNA repair by NER. It has been experimentally demonstrated that NLSs are responsible for the delivery of XPG into the nucleus [12] and that a β -galactosidase fusion protein containing the C-terminal region of the XPG protein (residues 1146–1185) localizes to the nucleus after UV irradiation [6]. These authors [6] also observed that the XPG protein is retained within the nucleus by a tight, but reversible, association with nuclear structures and its distribution in the nucleus may regulate relative NER rates in the transcriptionally active and inactive nuclear compartments. Indeed, as previously discussed here, localization of transiently expressed β -galactosidase fusion proteins identified two putative bipartite cNLSs in the same C-terminal region [6].

In the light of structural and calorimetric studies presented here and the functional studies with the C-terminal region of XPG protein [6,13], some questions arise:

- Are the two adjacent NLS sequences required to translocate the XPG protein?

Because only one is sufficient for nuclear translocation, and taking into account the affinity measurements presented here (2-fold lower affinity for the major

NLS-binding site and 40-fold lower affinity for minor NLS-binding site for XPG2 compared to XPG1), it is likely that only the XPG1 sequence is the NLS responsible for the translocation of the XPG protein to the nucleus.

- Is the XPG protein translocated to the nucleus via a monopartite or bipartite NLS process?

The results presented here unambiguously demonstrate that the NLS peptide binds to Imp α as a monopartite NLS. However, the binding of full-length XPG to Imp α may be more complex. It is likely that the main basic cluster identified in this work (KRKR) only binds to the major binding site due to steric hindrance; thus, the minor binding site would be empty and available for eventual binding of KR residues to P1' and P2' binding pockets. However, as discussed here, due to the relative low affinity of this region of NLS to the receptor, this is not a mandatory event for the translocation process of the XPG protein and an eventual mutation in these residues will not affect significantly the nuclear import process. Thus, the monopartite NLS binding is the major event for the XPG dockage to Imp α .

- What is the role for XPG2 sequence in the XPG protein?

Park and colleagues [6] suggested XPG2 as a putative NRS [22], based on functional experiments. Our affinity experiments demonstrated the lower affinity for this peptide fragment to NLS-binding regions to both binding sites of Imp α . However, this sequence is a suitable candidate for an NRS.

In conclusion, based on crystallographic and calorimetric assays, we demonstrate that a C-terminal region previously proposed to be a potential NLS sequence of the XPG protein (XPG1 fragment) is able to bind with high affinity to Imp α receptor as a classical monopartite NLS sequence. By contrast, the other C-terminal basic cluster (XPG2), previously also proposed to be an NLS, binds to Imp α with lower affinity and possibly using multiple binding modes. This latter sequence may therefore function instead as an NRS, rather than NLS.

Materials and Methods

Synthesis of NLS peptides

The peptides corresponding to XPG1 NLS (¹⁰⁵⁴KTQKRGITNTLEESSLKRRKRLSD¹⁰⁷⁶) and XPG2 NLS (¹¹⁶⁶VFGKKRRKLRARRGKRKT¹¹⁸⁶) were synthesized by Proteimax (Brazil) with purity higher than 99%. The peptides have additional residues at the N- and

C-termini to the minimal identified NLS [36] to avoid artifactual binding at the termini [21].

Protein expression and purification

Hexa-His-tagged truncated *M. musculus* Imp α 2, comprising amino acids 70–529 (Imp α ΔIBB), was expressed and purified by nickel affinity chromatography as described previously [37]. The protein was eluted using a gradient of imidazole followed by dialysis. The Imp α sample was stored in a buffer composed of 20 mM Tris–HCl (pH 8.0), 100 mM sodium chloride and 10 mM DTT at –20 °C. The purity was estimated to be 98% by SDS-PAGE.

Calorimetric assays

ITC assays were used to quantify the binding of XPG1 and XPG2 NLS peptides and Imp α ΔIBB. ITC measurements were performed using a MicroCal iTC200 microcalorimeter (GE Healthcare) calibrated according to the manufacturer's instructions. All samples were dialyzed against the ITC buffer [20 mM Tris–HCl (pH 8.0) and 100 mM sodium chloride] and degassed before titration. The sample cell was loaded with 30 μ M (200 μ l) of Imp α ΔIBB that was individually titrated with the NLS peptides at a concentration of 300 μ M XPG1 and 450 μ M XPG2. Titrations were performed at 20 °C with 20 injections, first containing 0.4 μ l (excluded from data analysis) and the following containing 2 μ l with an interval of 240 s with an 800-rpm homogenization speed. Heats of dilution and mixing were measured by titration with XPG1 or XPG2 NLSs into the ITC buffer and the values were subtracted for data analyses. Data were analyzed with binding polynomials [38,39].

Crystallization and crystal structure determination

Imp α ΔIBB was concentrated to 18 mg/ml using a Vivaspin 20, 30 kDa (GE Healthcare) and stored at –20 °C. Crystallization conditions were screened by systematically altering various parameters using, as a starting point, the crystallization conditions that had been successful for other peptide complexes [21,27]. The crystals were obtained using co-crystallization, by combining 1 μ l of protein solution, 0.5 μ l of peptide solution (peptide/protein molar ratio of 4 for XPG1 and of 8 to XPG2 peptides) and 1 μ l of reservoir solution on a coverslip and suspending the mixture over 0.5 ml of reservoir solution. Single crystals were obtained with a reservoir solution containing 0.6–0.7 M sodium citrate (pH 6) and 10 mM DTT after 15–20 days.

X-ray diffraction data were collected from a single NLS crystal at the National Synchrotron Light Source, Upton, New York, with a Pilatus 6M detector at the beamline X25. For the Imp α -XPG2 complex, X-ray diffraction data were also collected from a single crystal at Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas, Brazil, with a MarMosaic 225 detector (MAR Research) at the beamline MX-2. Crystals were mounted in nylon loops, transiently soaked in a reservoir solution supplemented with 25% glycerol and flash-cooled at 100 K in a nitrogen stream (Oxford

Nitrogen Cryojet XL, Oxford Cryosystems). Data were processed using the HKL2000 package [40]. Crystals have the symmetry of the $P2_12_12_1$ space group and are isomorphous to other mammalian Imp α ΔIBB-NLS peptide complexes (Table 1). The structure of the complex with CN-SV40 Tag NLS (PDB ID 1Q1S [31]), with the NLSs peptides omitted, was employed as the starting model for crystallographic refinement. Refmac5 [41] and PHENIX [42] programs were used to refine the structures and the Coot [43] program for manual modeling. The final models consist of 424 residues of Imp α ΔIBB for both complexes and of 185 and 2 water molecules, respectively, for Imp α -XPG1 NLS and Imp α -XPG2 NLS structures. For both complexes, fragments of the NLS peptides were found in the minor and major binding sites of the protein (residues 1069–1075 and 1069–1173 in the major binding site and residues 1069–1074 and 1182–1186 in the minor binding site, respectively, for Imp α -XPG1 NLS and Imp α -XPG2 NLS). Structure quality was checked with the program PROCHECK [44] and the contacts were analyzed by the program LIGPLOT [45] (Table 1).

PDB accession codes

Coordinates and structure factors from both structures have been deposited in the PDB under accession codes 5EKF (XPG1-NLS:mImp α ΔIBB) and 5EKG (XPG2-NLS:mImp α ΔIBB).

Acknowledgements

This work was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil) and Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2013-47064-P to A.V.C.). B.K. is an NHMRC (National Health and Medical Research Council) Research Fellow (1003325), A.A.S.T. is a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) Research Fellow and M.R.M.F. is a CNPq Research Fellow. We acknowledge the use of the Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (Brazil) and National Synchrotron Light Source (New York, USA).

Received 17 November 2015;

Received in revised form 8 January 2016;

Accepted 14 January 2016

Available online 23 January 2016

Keywords:

importin- α ;
xeroderma pigmentosum protein;
nuclear localization sequence (NLS);
DNA repair proteins;
nucleotide excision repair;

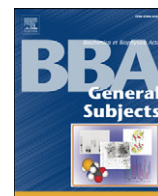
Abbreviations used:

XPG, xeroderma pigmentosum type G; NER, nucleotide excision repair; NLS, nuclear localization signal; ITC, isothermal titration calorimetry; cNLS, classical nuclear localization sequence; NRS, nuclear retention signal; Imp α , importin- α .

References

- [1] O.D. Scharer, Nucleotide excision repair in eukaryotes, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5 (2013) a012609.
- [2] L.C. Gillet, O.D. Scharer, Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair, *Chem. Rev.* 106 (2006) 253–276.
- [3] S.M. Shell, Y. Zou, Other proteins interacting with XP proteins, *Adv. Exp. Med. Biol.* 637 (2008) 103–112.
- [4] O.D. Scharer, XPG: Its products and biological roles, *Adv. Exp. Med. Biol.* 637 (2008) 83–92.
- [5] M. Wakasugi, J.T. Reardon, A. Sancar, The non-catalytic function of XPG protein during dual incision in human nucleotide excision repair, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 16030–16034.
- [6] M.S. Park, J.A. Knauf, S.H. Pendergrass, C.H. Coulon, G.F. Strniste, B.L. Marrone, et al., Ultraviolet-induced movement of the human DNA repair protein, Xeroderma pigmentosum type G, in the nucleus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93 (1996) 8368–8373.
- [7] S.J. Araujo, R.D. Wood, Protein complexes in nucleotide excision repair, *Mutat. Res.* 435 (1999) 23–33.
- [8] B.C. Feltes, D. Bonatto, Overview of xeroderma pigmentosum proteins architecture, mutations and post-translational modifications, *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 763 (2015) 306–320.
- [9] S. Emmert, H. Slor, D.B. Busch, S. Batko, R.B. Albert, D. Coleman, et al., Relationship of neurologic degeneration to genotype in three xeroderma pigmentosum group G patients, *J. Investig. Dermatol.* 118 (2002) 972–982.
- [10] T. Narita, K. Narita, A. Takedachi, M. Saijo, K. Tanaka, Regulation of transcription elongation by the XPG-TFIIF complex is implicated in Cockayne syndrome, *Mol. Cell. Biol.* 35 (2015) 3178–3188.
- [11] M. Hohl, I. Dunand-Sauthier, L. Staresincic, P. Jaquier-Gubler, F. Thorel, M. Modesti, et al., Domain swapping between FEN-1 and XPG defines regions in XPG that mediate nucleotide excision repair activity and substrate specificity, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) 3053–3063.
- [12] J.A. Knauf, S.H. Pendergrass, B.L. Marrone, G.F. Strniste, M.A. MacInnes, M.S. Park, Multiple nuclear localization signals in XPG nuclease, *Mutat. Res.* 363 (1996) 67–75.
- [13] A. Constantinou, D. Gunz, E. Evans, P. Lalle, P.A. Bates, R.D. Wood, et al., Conserved residues of human XPG protein important for nuclease activity and function in nucleotide excision repair, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 5637–5648.
- [14] T.W. Kirby, N.R. Gassman, C.E. Smith, L.C. Pedersen, S.A. Gabel, M. Sobhany, et al., Nuclear localization of the DNA repair scaffold XRCC1: Uncovering the functional role of a bipartite NLS, *Sci. Rep. Uk.* 5 (2015).
- [15] A. Lange, R.E. Mills, C.J. Lange, M. Stewart, S.E. Devine, A.H. Corbett, Classical nuclear localization signals: Definition, function, and interaction with importin α , *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 5101–5105.
- [16] C.W. Chang, R.M. Counago, S.J. Williams, M. Boden, B. Kobe, Distinctive conformation of minor site-specific nuclear localization signals bound to importin- α , *Traffic* 14 (2013) 1144–1154.
- [17] A.C. de Barros, A.A.S. Takeda, C.W. Chang, B. Kobe, M.R.M. Fontes, Structural basis of nuclear import of flap endonuclease 1 (FEN1), *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 68 (2012) 743–750.
- [18] M. Rexach, G. Blobel, Protein import into nuclei—Association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins, *Cell* 83 (1995) 683–692.
- [19] M. Marfori, T.G. Lonhienne, J.K. Forwood, B. Kobe, Structural basis of high-affinity nuclear localization signal interactions with importin- α , *Traffic* 13 (2012) 532–548.
- [20] M. Marfori, A. Mynott, J.J. Ellis, A.M. Mehdi, N.F. Saunders, P.M. Curmi, et al., Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization, *Biochim. Biophys. Acta* 2011 (1813) 1562–1577.
- [21] M.R. Fontes, T. Teh, B. Kobe, Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin- α , *J. Mol. Biol.* 297 (2000) 1183–1194.
- [22] M.S. Schmidt-Zachmann, C. Dargemont, L.C. Kuhn, E.A. Nigg, Nuclear export of proteins: The role of nuclear retention, *Cell* 74 (1993) 493–504.
- [23] N.E. Bernardes, A.A. Takeda, T.R. Dreyer, F.Z. Freitas, M.C. Bertolini, M.R. Fontes, Structure of importin- α from a filamentous fungus in complex with a classical nuclear localization signal, *PLoS ONE* 10 (2015) e0128687.
- [24] M.L. Cutress, H.C. Whitaker, I.G. Mills, M. Stewart, D.E. Neal, Structural basis for the nuclear import of the human androgen receptor, *J. Cell Sci.* 121 (2008) 957–968.
- [25] B. Kobe, Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin α , *Nat. Struct. Biol.* 6 (1999) 388–397.
- [26] A.A.S. Takeda, A.C. de Barros, C.W. Chang, B. Kobe, M.R.M. Fontes, Structural basis of importin- α -mediated nuclear transport for Ku70 and Ku80, *J. Mol. Biol.* 412 (2011) 226–234.
- [27] M.R. Fontes, T. Teh, D. Jans, R.I. Brinkworth, B. Kobe, Structural basis for the specificity of bipartite nuclear localization sequence binding by importin- α , *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 27981–27987.
- [28] E. Conti, M. Uy, L. Leighton, G. Blobel, J. Kuriyan, Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin α , *Cell* 94 (1998) 193–204.
- [29] C.W. Chang, R.L. Counago, S.J. Williams, M. Boden, B. Kobe, Crystal structure of rice importin- α and structural basis of its interaction with plant-specific nuclear localization signals, *Plant Cell* 24 (2012) 5074–5088.
- [30] R.A. Pumroy, G. Cingolani, Diversification of importin- α isoforms in cellular trafficking and disease states, *Biochem. J.* 466 (2015) 13–28.
- [31] M.R.M. Fontes, T. Teh, G. Toth, A. John, I. Pavo, D.A. Jans, et al., Role of flanking sequences and phosphorylation in the recognition of the simian-virus-40 large T-antigen nuclear localization sequences by importin- α , *Biochem. J.* 375 (2003) 339–349.
- [32] K. Nakai, P. Horton, PSORT: A program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization, *Trends Biochem. Sci.* 24 (1999) 34–36.
- [33] D. Chelsky, R. Ralph, G. Jonak, Sequence requirements for synthetic peptide-mediated translocation to the nucleus, *Mol. Cell. Biol.* 9 (1989) 2487–2492.

- [34] S. Kosugi, M. Hasebe, T. Entani, S. Takayama, M. Tomita, H. Yanagawa, Design of peptide inhibitors for the importin α /beta nuclear import pathway by activity-based profiling, *Chem. Biol.* 15 (2008) 940–949.
- [35] S. Kosugi, M. Hasebe, N. Matsumura, H. Takashima, E. Miyamoto-Sato, M. Tomita, et al., Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin α , *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 478–485.
- [36] N.O. Knudsen, S.D. Andersen, A. Lutzen, F.C. Nielsen, L.J. Rasmussen, Nuclear translocation contributes to regulation of DNA excision repair activities, *DNA Repair (Amst)* 8 (2009) 682–689.
- [37] T. Teh, T. Tiganis, B. Kobe, Crystallization of importin α , the nuclear-import receptor, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 55 (1999) 561–563.
- [38] S. Vega, O. Abian, A. Velazquez-Campoy, A unified framework based on the binding polynomial for characterizing biological systems by isothermal titration calorimetry, *Methods* 76 (2015) 99–115.
- [39] E. Freire, A. Schon, A. Velazquez-Campoy, Isothermal titration calorimetry: General formalism using binding polynomials, *Methods Enzymol.* 455 (2009) 127–155.
- [40] Z. Otwinowski, Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode, *Methods Enzymol.* 276 (1997) 307–326.
- [41] G.N. Murshudov, A.A. Vagin, E.J. Dodson, Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 53 (1997) 240–255.
- [42] P.D. Adams, R.W. Grosse-Kunstleve, L.W. Hung, T.R. Ioerger, A.J. McCoy, N.W. Moriarty, et al., PHENIX: Building new software for automated crystallographic structure determination, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 58 (2002) 1948–1954.
- [43] P. Emsley, K. Cowtan, Coot: Model-building tools for molecular graphics, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 60 (2004) 2126–2132.
- [44] R.A. Laskowski, J.A. Rullmann, M.W. MacArthur, R. Kaptein, J.M. Thornton, AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein structures solved by NMR, *J. Biomol. NMR* 8 (1996) 477–486.
- [45] A.C. Wallace, R.A. Laskowski, J.M. Thornton, LIGPLOT—A program to generate schematic diagrams of protein ligand interactions, *Protein Eng.* 8 (1995) 127–134.
- [46] M.H. Chen, I. Ben-Efraim, G. Mitrousis, N. Walker-Kopp, P.J. Sims, G. Cingolani, Phospholipid scramblase 1 contains a nonclassical nuclear localization signal with unique binding site in importin α , *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 10599–10606.
- [47] E. Conti, J. Kuriyan, Crystallographic analysis of the specific yet versatile recognition of distinct nuclear localization signals by karyopherin α , *Structure* 8 (2000) 329–338.
- [48] S.N. Yang, A.A. Takeda, M.R. Fontes, J.M. Harris, D.A. Jans, B. Kobe, Probing the specificity of binding to the major nuclear localization sequence-binding site of importin- α using oriented peptide library screening, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 19935–19946.
- [49] S.M. Dias, K.F. Wilson, K.S. Rojas, A.L. Ambrosio, R.A. Cerione, The molecular basis for the regulation of the cap-binding complex by the importins, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16 (2009) 930–937.
- [50] A. Giesecke, M. Stewart, Novel binding of the mitotic regulator TPX2 (target protein for *Xenopus* kinesin-like protein 2) to importin- α , *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 17628–17635.
- [51] N. Roman, M. Christie, C.M. Swarbrick, B. Kobe, J.K. Forwood, Structural characterisation of the nuclear import receptor importin α in complex with the bipartite NLS of Prp20, *PLoS ONE* 8 (2013) e82038.



Functional and structural studies of a Phospholipase A₂-like protein complexed to zinc ions: Insights on its myotoxicity and inhibition mechanism



Rafael J. Borges^a, Fábio F. Cardoso^a, Carlos A.H. Fernandes^a, Thiago R. Dreyer^a, Delkia S. de Moraes^b, Rafael S. Floriano^b, Léa Rodrigues-Simioni^b, Marcos R.M. Fontes^{a,*}

^a Departamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rua Prof. Dr. Antonio Celso Wagner Zanin, s/n, 18618-689 Botucatu, SP, Brazil

^b Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, 13083-862 Campinas, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 April 2016

Received in revised form 5 August 2016

Accepted 10 August 2016

Available online 13 August 2016

Keywords:

PLA₂-like proteins

Snake venom

Zinc ions

Inhibition by divalent ions

Myotoxic mechanism

X-ray crystallography

ABSTRACT

Background: One of the main challenges in snakebite envenomation treatment is the development of stable, versatile and efficient *anti*-venom therapies. Local myotoxicity in accidents involving snakes from the *Bothrops* genus is still a consequence of serum therapy inefficient neutralization that may lead to permanent sequelae in their victims. One of the classes of toxins that participate in muscle necrosis is the PLA₂-like proteins. The aim of this work was to investigate the role of zinc ions in the inhibition of PLA₂-like proteins and to advance the current knowledge of their action mechanism.

Methods: Myographic and electrophysiological techniques were used to evaluate the inhibitory effect of zinc ions, isothermal titration calorimetry assays were used to measure the affinity between zinc ions and the toxin and X-ray crystallography was used to reveal details of this interaction.

Results: We demonstrated that zinc ions can effectively inhibit the toxin by the interaction with two different sites, which are related to two different mechanism of inhibition: preventing membrane disruption and impairing the toxin state transition. Furthermore, structural study presented here included an additional step in the current myotoxic mechanism improving the comprehension of the allosteric transition that PLA₂-like proteins undergo to exert their function.

Conclusions: Our findings show that zinc ions are inhibitors of PLA₂-like proteins and suggest two different mechanisms of inhibition for these ions.

General significance: Zinc is a new candidate that can assist in *anti*-venom treatments and can promote the design of new and even more accurate structure-based inhibitors for PLA₂-like proteins.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Snakebite envenomings are an important global health issue. According to recent estimates, at least 421,000 ophidian accidents occur each year, of which 20,000 cases result in death, although these number may be underestimated by poor reporting in the areas with the highest frequencies of accidents, such as regions in Asia, Africa and Latin America [1]. Specifically, in the Latin America region, the high estimates expect approximately 130,000 accidents, in which 1.8% of cases result in death *per* year, and *Bothrops* genus

snakes (American lance heads from Viperidae family) are the most important responsible genus [2]. In addition to the high mortality, the local myotoxicity of bothropic snake bites may cause permanent sequelae and disability, with member amputation in cases where the *anti*-venom is not quickly administered [3]. Most of these accidents happen in rural areas, and these consequences may incapacitate rural workers [4]. This scenario led the World Health Organization to classify snakebite envenomings as a neglected tropical disease [5].

Two groups of toxins, metalloproteinases and phospholipase A₂ (PLA₂) proteins, may cause the local myonecrosis which is the main effect caused by *Bothrops* snake bite. For some snakes of the Viperidae family, PLA₂ protein is the most abundant toxin in their venoms [6,7], and its rapid damage is one of the major difficulties in treating snake venom accidents because *anti*-venom therapy is not able to reverse its effects [4]. PLA₂s are small (approximate molecular weight of 14 kDa) and stable proteins, which frequently have 7 disulfide bridges. These

Abbreviations: Phospholipase A₂, PLA₂; Membrane-Docking Site, MDoS; Membrane-Disruption Site, MDiS; Bothropstoxin I, BthTX-I; Phrenic nerve-diaphragm, PND; Resting potential, RP; Polyethylene glycol, PEG; PEG4000, PEG4k; Protein Data Bank identification code, PDB id; Root-mean square deviation, RMSD; *p*-bromophenacyl bromide, BPB.

* Corresponding author.

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

enzymes are able to hydrolyze the *sn*-2 ester bond of phospholipids in the lipid bilayer of micelles, vesicles and membranes, releasing lysophospholipids and fatty acids through a catalytic mechanism that is dependent on calcium ions [8,9]. A subtype of PLA₂s, the PLA₂-like proteins, also named the PLA₂-homologues due to their similar tertiary structures and common evolutionary ancestor, do not possess catalytic activity, but still present high myotoxicity and a wide range of pharmacological activities [9,10]. The proteins from PLA₂-like group have different residues at 49 positions (Lys, Ser and Arg) and may present similar myotoxic mechanisms of action, although the most studied subgroup is the Lys49-PLA₂ proteins [10].

Since the identification of PLA₂-like toxins in the 1980s, these proteins have been investigated using many different approaches to elucidate their toxic mechanism [10]. The large charge distribution on the toxins' surface and their various pharmacological and toxic effects enhance the complexity and hinder our comprehension of their mechanisms of action. Functional studies highlighted the importance of their dimeric oligomerization [11,12], as well as the C-terminal region, which has a high distribution of basic and hydrophobic residues, for myotoxicity [13,14]. Based on the different dimeric orientations observed in available crystallographic structures, PLA₂-like proteins from the *Bothrops* genus were classified as being in: i) an **inactive state**, whose toxins are native with void hydrophobic channels and ii) an **active state**, whose toxins were complexed to either hydrophobic molecules or inhibitors. Recently, based on structural and functional studies, a myotoxic mechanism has been proposed that involves specific regions in the C-terminal region, the MDoS (Membrane-Docking Site) and the MDiS (Membrane-Disruption Site) [15]. The entrance of a hydrophobic molecule in the toxin hydrophobic channel would induce an allosteric modification of the protein, with dimer reorientation [16] from the **inactive** to **active state**, enabling the MDoS to dock with the cell membrane and the MDiS to perturb cell membrane integrity [15]. After the toxin penetrates the lipid bilayer and disturbs the phospholipids and membrane integrity, ion homeostasis is disrupted [9]. Consequently, the calcium influx increases membrane damage by inducing hypercontraction of myofilaments, mitochondrial damage, calcium-dependent proteases and cytosolic PLA₂s activity, leading to muscle necrosis [9,17]. All of these indirect effects of PLA₂-like activity enhance cytotoxicity [17].

One of the main themes in current toxinology is the development of alternatives to the conventional serum therapy that does not efficiently neutralize snake venom injuries. Currently, the majority of studies with this objective focus on compounds isolated from plants used in folk medicine in developing countries [18,19]. Functional and structural studies of the toxins complexed to these compounds led to the proposal of three different possibilities for the mechanism by which the PLA₂-like proteins are inhibited [20–22]. On the other hand, only a few studies were performed to evaluate the inhibitory effects of divalent cations against snake venoms and, more particularly, PLA₂-like toxins [23–25], despite their role in physiological functions and their use in the treatment of diseases [26,27]. Zinc ions are relatively harmless to humans and have been used in different treatments. It is an effective antioxidant and anti-inflammatory agent, and it may have beneficial effects on myocardial pathologies and atherosclerosis [28]. Zinc has been administered to prevent specific types of cancer [27,29,30] and blindness in patients with age-related macular degeneration, to complement the treatment of diarrhea, to assist the immune system, and to treat the common cold, Wilson's disease, and sickle cell disease [26].

Here, the complex between bothropstoxin I (BthTX-I), a PLA₂-like toxin from *Bothrops jararacussu* venom, and zinc ions was studied using functional, calorimetric and structural methods to obtain new insights into the mechanism by which the PLA₂-like proteins are inhibited. As result of this study, it has been shown that zinc ions are able to inhibit the myotoxic effect through two different ways. Furthermore, by comparing this structure with the crystallographic structures of other PLA₂-like proteins, more details of the

current myotoxic mechanism [15] were revealed, particularly those related to the conformational changes of the MDiS region and the hydrophobic channel.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male Swiss mice (25–30 g) obtained from the Multidisciplinary Center for Biological Investigation (CEMIB/Unicamp) were housed 10/cage at 23 °C on a 12 h light/dark cycle, with the lights on at 6 a.m. The animals had free access to food and water. For *in vitro* protocols, the animals were euthanized with isoflurane immediately prior the experiments according to the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA); this study was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Use (CEUA/UNICAMP, protocol no. 3312-1).

2.2. Protein purification

BthTX-I was isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom by ion-exchange chromatography on CM-Sepharose, as previously described [31].

2.3. Twitch-tension experiments

Mouse phrenic nerve-diaphragm preparations (PND) were mounted under a resting tension of 1 g in a 5 mL organ bath containing aerated (95% O₂ and 5% CO₂) Tyrode's solution (composition, in mM: NaCl 137, KCl 2.7, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 0.49, NaH₂PO₄ 0.42, NaHCO₃ 11.9 and glucose 11.1, pH 7.0) at 37 °C and allowed to stabilize for 10 min prior to use, as described elsewhere [32,33]. Supramaximal stimuli (0.1 Hz and 0.2 ms) were delivered to the nerve from a Grass S88 stimulator (Grass Instrument Co., Quincy, MA, USA), and the muscle twitches were recorded using a TRI201AD force displacement transducer coupled to a Quad Bridge Amp and LabChart 6.0 software (all from AD Instruments Pty Ltd., Bella Vista, Australia). The preparations were incubated with BthTX-I (20 µg/mL), ZnCl₂ (0.4 mM) or BthTX-I (20 µg/mL) + ZnCl₂ (0.4 mM) for 120 min or until complete neuromuscular blockade, and the changes in twitch-tension were recorded.

2.4. Intracellular recordings

The effects of BthTX-I (20 µg/mL), ZnCl₂ (0.4 mM) or BthTX-I (20 µg/mL) + ZnCl₂ (0.4 mM) on membrane resting potential (RP) were recorded using a mouse hemidiaphragm muscle mounted in a Lucite chamber containing Tyrode's solution (composition shown above), as previously described [32,34]. The RP was measured using an amplifier (AM 502 Tektronix) and digitized by an A/D converter CAD12/36 12 bits (Lynx, São Paulo, SP, Brazil) coupled to a microcomputer (Microtec, São Paulo, SP, Brazil) loaded with AqDados 5 software (Lynx, São Paulo, SP, Brazil). The RP were monitors in different regions of the muscle considering basal values as *t*₀ (control); the effects of BthTX-I (20 µg/mL), ZnCl₂ (0.4 mM) or BthTX-I (20 µg/mL) + ZnCl₂ (0.4 mM) were analyzed in different intervals (*t*₁₅, *t*₃₀, *t*₆₀, *t*₉₀ and *t*₁₂₀).

2.5. Crystallographic studies of BthTX-I in the presence of zinc ions

Cocrystallization experiments were performed with lyophilized samples of BthTX-I and ZnCl₂. The protein was dissolved in ultrapure water, and the concentration was measured by determining the absorbance at 280 nm with a NanoDrop 2000c (Thermo Scientific™) using the theoretical protein molecular weight and extinction molar coefficient. Crystals were obtained by the hanging drop vapor diffusion method at 18 °C [35]. Hexagonal shape crystals were obtained from drops of 0.8 µL of protein (10.1 mg/mL), 0.09 µL of ZnCl₂ (1 M), 0.32 µL of MnSO₄ (12.5 mM) and 0.48 µL of reservoir solution composed of 0.1 M TRIS-HCl, pH 8.5,

30% polyethylene glycol 4000 (PEG4k) and 0.1 M LiSO₄. Crystals were collected with nylon loops and flash cooled in liquid nitrogen. Datasets from crystals of BthTX-I complexed to Zn²⁺ were collected at the Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brazil) using the MX1 beamline on a MAR CCD 165 mm detector, and diffracted up to 2.16 Å resolution (remote dataset in Table 1). To ensure that the metal was present in the crystallographic structure, isomorphous crystals were diffracted by exploiting the zinc anomalous signal in the MX2 beamline and collected on a MarMosaic 225 CCD detector at wavelength of 1.283 Å, in which the zinc peak was determined experimentally using the Fluorescence detector Amptek XR100CR. The datasets were indexed, integrated, and scaled using XDS [36] in the trigonal space group, although the anomalous dataset were processed by specifically distinguishing the Friedel pairs using scaling, strategy and completeness statistics, with strict absorption correction and a 3.24 Å resolution cut, where the anomalous signal was still strong. The structure was solved by the molecular replacement technique using the *apo* (native) BthTX-I structure (PDB id: 3HZD) and the PHASER program [37]. Refinement was performed using Phenix.refine [38] and the model was manually build with Coot [39] using the F_{obs}-F_{calc} and 2F_{obs}-F_{calc} maps. The side chains of residues K19, L31, K35, K83, K106, and K116 of monomer A and K53, K60, K61, E84, K105, K112 and K116 of monomer B were excluded due to the lack of electron density

Table 1
X-ray data collection and refinement.

Datasets	remote	anomalous
Beamlines in LNLS	MX1	MX2
Wavelength (Å)	1.608	1.283
Space group	P3 ₁ 21	P3 ₁ 21
Unit cell (Å)	a = 56.6, b = 56.6, c = 129.5	a = 57.2, b = 57.2, c = 131.3
Resolution (Å)	45.83–2.16 (2.28–2.16) ^a	49.5–3.24 (3.43–3.24) ^a
Total reflections	52,634	63,982
Unique reflections	13,020 (2051) ^a	7626 (1228) ^a
Average redundancy	3.9	8.4
R _{means} ^b (%)	8.9 (116.2) ^a	9.6 (18.6) ^a
CC (1/2)	99.7 (79.6) ^a	99.7 (98.8)
Completeness (%)	96.5 (96.5) ^a	99.7 (98.4%)
Average I/σ (I)	13.2 (2.0) ^a	19.0 (11.3) ^a
Anomalous correction		29 (2) ^a
Anomalous signal		1.16 (0.82) ^a
R ^c (%)	19.1	
R _{free} ^c (%)	23.4	
RMS deviations from ideal values		
Bond lengths (Å)	0.004	
Bond angles (°)	0.883	
Ramachandran plot (%)		
Residues in most favorable regions	96.7	
Residues in accepted regions	3.3	
Molprobit score	1.20	
Number of molecules/atoms, their averaged B factor (Å ²) and averaged occupancy		
Protein	2 (34.5) [1.0] ^b	
SO ₄	2 (48.3) [0.7] ^b	
H ₂ O	116 (34.7) [1.0] ^b	
Cl ⁻	2 (41.8) [0.8] ^b	
Zn ²⁺	3 (43.4) [0.6] ^b	

^aNumber in parenthesis are for highest resolution shell. ^bNumber in parenthesis and

in brackets are B factor and occupation, respectively. $R_{\text{meas}} = \frac{\sum_h \sqrt{\frac{n_h}{n_h - 1}} \sum_i |I_{h,i} - \bar{I}_h|}{\sum_h \sum_i I_{h,i}}$ redundancy independent R-factor. Calculated for $I > -3\sigma(I)$. $R_{\text{cryst}} = \frac{\sum_h \frac{1}{n_h} \sum_i |I_{h,i} - \bar{I}_h|}{\sum_h \sum_i I_{h,i}}$ is equivalent to R_{crist} , but calculated with reflections (5%) omitted from the refinement process. RMS *root-mean-square*. Anomalous correction: percentage of correlation between random half-sets of anomalous intensity differences. Anomalous signal: mean anomalous difference in units of its estimated standard deviation $R_{\text{hkl}} \frac{|F(+)-F(-)|}{\sigma(F)}$. $F(+)$, $F(-)$ are structure factor estimates obtained from the merged intensity observations in each parity class. LNLS stands for Brazilian Synchrotron Light Laboratory.

map. In the final stages of refinement, the optimization of the X-ray/stereochemistry weight and X-ray/ADP weight, occupancy and addition of waters options were included in the refinement. The zinc sites were located by generating the anomalous difference map after the protein phases were obtained by restrained refinement of the high-resolution isomorphous model. The final model is in agreement with the validation results from MOLPROBITY [40], and it was deposited in the PDB under the code 4WTB.

PISA [41], an algorithm that evaluates the interfaces in macromolecular crystallographic structures using thermodynamics, was used to foresee the BthTX-I/Zn biological unit. The MOLE program [42], an algorithm that is proposed to locate and characterize molecular tunnels and pores, was used with the default options to identify the hydrophobic channel and tunnels that access H48, their constituent residues and their physicochemical properties. Structural comparisons were performed using the following structures, with the Protein Data Bank identification code in parentheses (PDB id): *apo* BthTX-I (3HZD and 3I3H), BthTX-I/PEG4k (3IQ3), dimeric BthTX-I/BPB (*p*-bromophenacyl bromide) (3HZW) [43], BthTX-I/PEG400 (2H8I) [44], BthTX-I/α-tocopherol (3CXI), PrTX-I/α-tocopherol (3CYL), *apo* PrTX-I (2Q2J) [16], PrTX-I/BPB (2OK9) [45], PrTX-I/rosmarinic acid/PEG330 (3QNL) [20], PrTX-I/cafeic acid/PEG4k (4YU7), PrTX-I/aristolochic acid/PEG4k (4Y27) [21], PrTX-II/*n*-tridecanoic acid (1QLL) [46], *apo* BnSP6 (1PC9), *apo* BnSP7 (1PA0) [47], BbTX-II (4K09), MTX-II/PEG4k (4K06) [15], BaspTX-II (1CLP) [48], BaspTX-II/suramin (1Y4L) [49], BnIV/myristic acid (3MLM) [50], MjTX-II/stearic acid (1XXS) [51], MjTX-II/PEG4k (4KF3) [52] and MjTX-II/suramin/PEG4k (4YV5) [22]. The structures complexed with either PEG or fatty acid may be analyzed together because the protein structures are similar; both ligands induce the same effect, and their discrimination by electron density and B-factor analysis alone is difficult [53]. Cartoon and sticks images were generated by PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3 Schrödinger, LLC.) and tunnels images were generated by MOLE local version 2.13.9.6.

2.6. Calorimetric studies

Calorimetric studies were performed with a microcalorimeter iT₂₀₀ (GE HealthCare) at 25 °C. ZnCl₂ (2 mM) were titrated (40 injections of 1 μL at each 240 s) into the calorimetric cell containing BthTX-I (53 μM) diluted in 100 mM Tris HCl, 100 mM NaCl, pH 7.0. Dilution and stirring effects were determined in control titrations and were subtracted from the BthTX-I - Zn²⁺ titration prior to data analysis, which was performed with Origin v.7.0 software (OriginLab, Northampton, MA, EUA).

3. Results

3.1. Functional experiments

BthTX-I (20 μg/mL) caused irreversible and complete neuromuscular blockade in indirectly stimulated PND preparations from 90 min of incubation. In the preparations incubated with only ZnCl₂ (0.4 mM), there was 20 ± 5% reduction on the twitch-tension response after 120 min incubation compared to the control preparations. When the PND preparations were treated with BthTX-I (20 μg/mL) and ZnCl₂ (0.4 mM), the BthTX-I-induced neuromuscular blockade was attenuated from 20 min of incubation, with a 19 ± 1% reduction in the twitch amplitude after 120 min of incubation (Fig. 1A). Fig. 1B shows a representative recording of the neuromuscular blockade induced by BthTX-I (20 μg/mL) (Fig. 1B₁) and the lack of this effect in the presence of ZnCl₂ (0.4 mM) (Fig. 1B₂). In addition, the attenuation of the BthTX-I-induced neuromuscular blockade by ZnCl₂ treatment was also corroborated using intracellular recordings to measure the membrane RP of muscle fibers from the PND preparations. BthTX-I (20 μg/mL) induced significant membrane depolarization from 30 min of incubation [from −80 ± 1 mV (*t*₀) to −27 ± 3 mV (*t*₁₂₀), *p* < 0.05, *n* = 4]. Whereas in

the presence of ZnCl_2 (0.4 mM), the depolarizing effect of BthTX-I was significantly attenuated [from -79 ± 1 mV (t_0) to -71 ± 2 mV (t_{120}), $p < 0.05$, $n = 4$]; ZnCl_2 (0.4 mM) alone did not induce any membrane depolarization [from -81 ± 1 mV (t_0) to -77 ± 1 mV (t_{120}), $p < 0.05$, $n = 4$] (Fig. 2).

3.2. Structural experiments

To understand the molecular interactions between BthTX-I and the zinc ions, this protein was crystallized in presence of this ion. Supplementary Fig. 1 shows typical crystals of the BthTX-I/Zn complex, and Table 1 summarizes the data collection and refinement statistics. BthTX-I/Zn preserves the general PLA_2 -like fold. The zinc binding sites were confirmed using peaks in the anomalous difference map that were clearly distinguishable from noise (below 3σ), with the following anomalous signals and interactions: i) Zn1: H48/A (histidine in position 48 of monomer A) with 8.0σ (Fig. 3A); ii) Zn2: H120/A with 13.2σ (Fig. 3B); and iii) Zn3: H120/B with 5.8σ (Fig. 3C). The occupancy and B-factors of the zinc ions are: i) 0.54 and $39.7\text{ \AA}^2$; ii) 0.69 and $38.8\text{ \AA}^2$; iii) 0.58 and $51.8\text{ \AA}^2$, respectively, for Zn1, Zn2 and Zn3. All zinc ions interact with one histidine imidazole nitrogen, and its coordination is completed by water molecules in a tetrahedral geometry with the expected distances and angles, as confirmed by the CheckMyMetal web server [54]. An anomalous signal above noise is observed close to Glu84/A, although the zinc refinement trial at this position generated a B-factor higher than $100\text{ \AA}^2$ and an occupation lower than 0.5 using the non-anomalous high resolution dataset; thus, it was excluded from the final model. The crystallographic model quality was evaluated with validation tools, and it is within all stereochemical requirements, as verified by a MolProbity score of 1.2 (More details in Table 1).

In addition to the zinc-binding regions, a chloride (partial occupation of 0.56 and B-factor of $35.9\text{ \AA}^2$) was shown to interact with Arg34/A. This last residue, together with L31 and G32 from the putative calcium binding loop, also partially occupied two possible conformations, one with the Arg34 side chain pointed toward the end of the C-terminal region, and the other pointed toward the MDiS. This last alternative conformation is different from all other published structures, with exception of an *apo* BthTX-I structure (PDB id: 3I3H/B).

BthTX-I/Zn presents a homo-dimeric structure in the asymmetric unit, but as often found in other PLA_2 -like structures (Fig. 4A); thus, two possible structures can be chosen: i) a compact dimer (also termed alternative) and ii) a large dimer (termed conventional). Dimer descriptions and discussion may be found elsewhere [10]. BthTX-I/Zn was solved as a compact dimer because its interface area is greater than

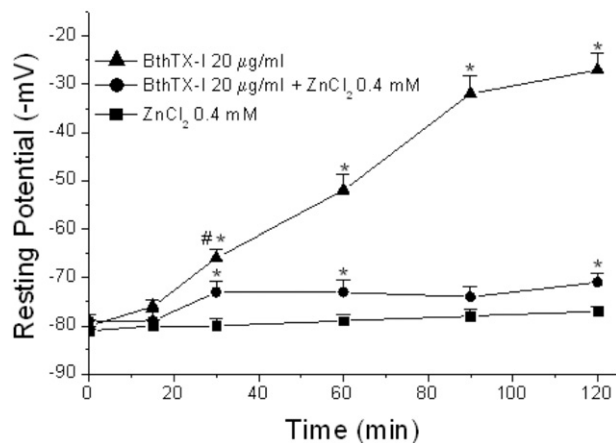


Fig. 2. Effects of BthTX-I and ZnCl_2 in membrane resting potential measurements of isolated mouse phrenic nerve-diaphragm preparations. ZnCl_2 (0.4 mM) markedly attenuated the known depolarization induced by BthTX-I (20 µg/mL) (▲) from 30 min (●). There were no important changes on membrane resting potential measurements in ZnCl_2 -incubated preparations. Results are expressed as mean $\pm$ S.E.M. ($n = 4-6$). * $p < 0.05$ indicates significant differences relative to control group (ZnCl_2) and # $p < 0.05$ was relative to BthTX-I + ZnCl_2 treated group.

the area of the larger dimer (770 versus $496.3\text{ \AA}^2$) with a lower free energy (-17.1 against -1.7 kcal/mol); all values were calculated using the PISA program. In addition, previous small-angle X-ray scattering experiments [44] also indicated that the compact dimer is more likely to occur in solution.

3.2.1. Structural comparisons of the BthTX-I/Zn monomers

The monomers of the BthTX-I/Zn are different from each other; their RMSD (root-mean square deviation) is $1.08\text{ \AA}$, mainly due to the variability in the residues from Y119 to F125 in the C-terminal regions (Fig. 4). Among these residues, the hydrophobic ones were described by Ambrosio et al. as able to form a hydrophobic knuckle, conserved in PLA_2 -like proteins, and related to toxicity [53]. Subsequently, two residues of this region (L121 and F125) were suggested to be responsible for toxin-induced membrane disruption and called the MDiS [15]. The MDiS is stabilized by one hydrogen bond between the main chain oxygen of L121 and main chain nitrogen of F125, two hydrophobic and exposed residues and by the rigid P123 that, together with K122, form a short 3_{10} helix. BthTX-I/Zn possesses these residues in an asymmetrical configuration: monomer A is in the canonical conformation, where

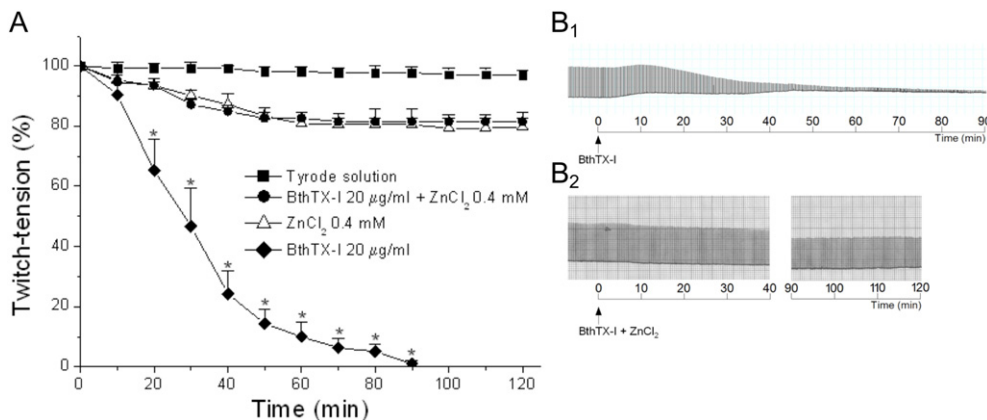


Fig. 1. Effects of BthTX-I and ZnCl_2 on indirectly evoked twitches in isolated mouse phrenic nerve-diaphragm preparations. (A) ZnCl_2 (0.4 mM) markedly attenuated BthTX-I (20 µg/mL)-induced blockade. There were no significant differences in twitch-tension responses in ZnCl_2 -incubated preparations. Results are expressed as mean $\pm$ S.E.M. ($n = 4-6$); * $p < 0.05$ indicates significant differences relative to BthTX-I + ZnCl_2 treated group. (B₁) Neuromuscular blockade induced by BthTX-I in PND preparations. (B₂) Representative record shows the lack of blockade by BthTX-I (20 µg/mL) when incubated with ZnCl_2 (0.4 mM) after 120 min.

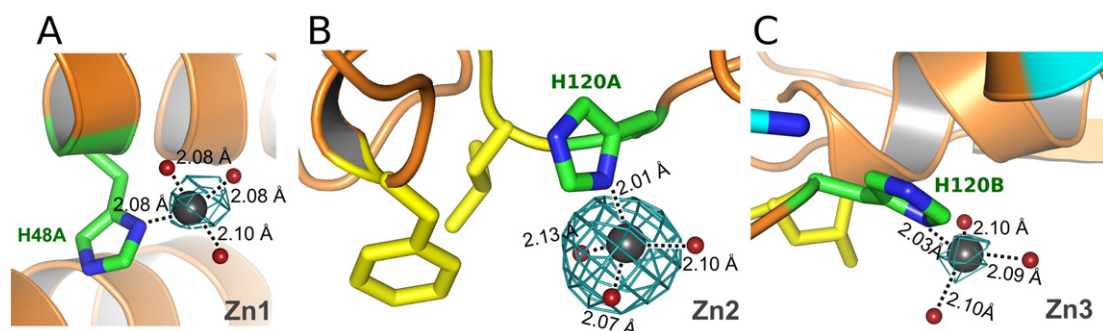


Fig. 3. BthTX-I and zinc ions interacting regions and coordination distances (black dashes). Anomalous difference map is contoured at 5 σ and shown in cyan. Zinc spheres are represented in grey, water spheres in red, side chain of interacting histidine in green sticks, MDiS and MDiS side chains in cyan and yellow, respectively. (A) Zn1 and H48/A (monomer A); (B) Zn2, C-terminal H120/A and the MDiS/A; and (C) Zn3 and H120/B.

MDiS is present (Fig. 4 in orange) and will be referred to as the **canonical monomer**; monomer B possesses residues 121 to 125 far from each other in a loop secondary structure and will be referred to as the **non-canonical monomer**. In the BthTX-I/Zn structure, the distances between the L121 and F125 C β s are 4.7 Å for the **canonical monomer** and 10.3 Å for the **non-canonical monomer**.

3.2.2. Hydrophobic channel accessibility analyses

The BthTX-I/Zn dimer has a large cavity of 2757 Å³ surrounding the interior and interface of both monomers, according to the calculations from the MOLE2 algorithm (Supplementary Table 1). Inside this cavity, hydrophobic channel accessibility was assessed through tunnel computations using each H48 residue as the starting point. This amino acid is the deepest residue that interacts with different ligands found in the hydrophobic channel, such as zinc ions, *p*-bromophenacyl bromide (BPB), fatty acids and polyethylene glycol (PEG) molecules (Supplementary Fig. 2A). Three different tunnels were identified (Supplementary Table 2) in this region: **tunnel 1** (Fig. 5A, green surface and Fig. 5B) and **tunnel 2** (Fig. 5A, dark red surface and Fig. 5B) in the hydrophobic channel of the **canonical monomer** and **tunnel 3** (Fig. 5A, purple surface) in the **non-canonical monomer**. Both **tunnels 1** and **2** are long, 19.1 and 22.8 Å long, respectively, and are accessible to the solvent through the N-terminal region of the **canonical monomer** and C-terminal region of the **non-canonical monomer**. **Tunnel 3** in the **non-canonical monomer** is rather short, 6.0 Å long, and accesses exterior through residues that are essential only for catalytic PLA₂s (calcium binding loop, K49 and Y52). The hydropathy values of **tunnels 1**, **2** and **3** are 0.29, −0.07 and −0.98, respectively; thus, only **tunnel 1** is hydrophobic. A superimposition between the monomers of the BnIV/myristic acid and the BthTX-I/Zn structures shows that the myristic acid lays

exactly inside **tunnel 1** of the **canonical monomer** of the BthTX-I/Zn structure (zoomed square in Fig. 5B₁), which is in contrast to the **non-canonical monomer**, where the fatty acid clashes with the protein residues. Thus, BthTX-I/Zn has only one accessible hydrophobic channel in the **canonical monomer** (**tunnel 1**).

3.3. Calorimetric experiments

As shown in Fig. 6, the titration presented just a monotonic exothermic behavior and a binding isotherm characteristic of low affinity [55] between BthTX-I and Zn ions. In order to obtain the most likely interaction stoichiometry (*n*) for this assay, it was tested the following possibilities: *n* = 1, 2 or 3. According to previous studies [56], the lowest χ^2 value for the curve adjust to the experimental data represent the most likely stoichiometry to the system. The following χ^2 values were obtained: 7683, 3792 and 2691, respectively for *n* = 1, 2 or 3, suggesting that there is the binding of three Zn ions for each BthTX-I. F-test (*p* < 0.05) also confirmed that the *n* = 3 is the best fit to the isotherm. Therefore, considering three Zn binding sites at BthTX-I, the obtained dissociation constants (*K_d*) are 83.3 ± 25.4, 62.1 ± 25.1 and 300 ± 104.3 μM.

4. Discussion

4.1. Zinc ions and neuromuscular preparations

Classically, zinc ions have been described to be essential to two main roles in proteomics: as a cofactor for enzymes and as the essential constituent of zinc fingers and related structural motifs found in numerous transcription factors [57,58]. Moreover, this ion has recently been

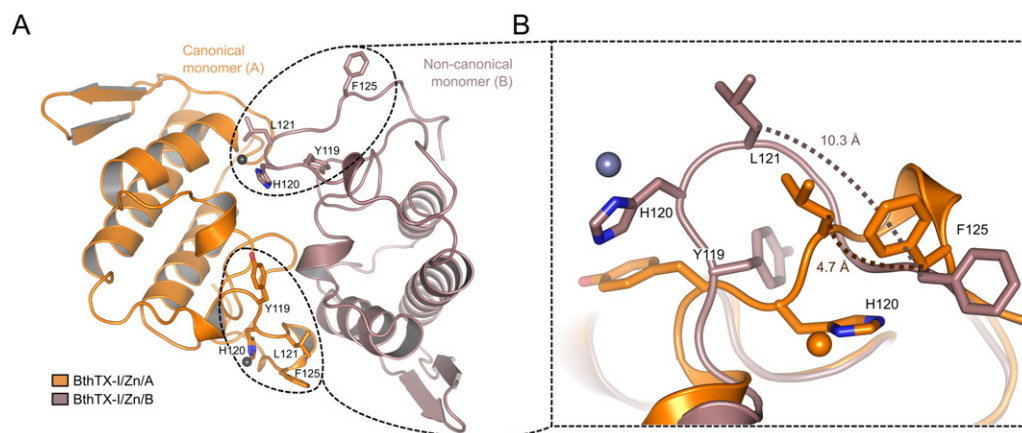


Fig. 4. Cartoon representation of the **canonical** (in orange), **non-canonical monomers** (in brown) of the BthTX-I/Zn and asymmetry between its C-termini. (A) Overall structure dimeric representation highlighting C-terminal regions inside the dashed circle. (B) C α superposition of the C-terminal monomers displays the high asymmetry between both regions. Distances between MDiS C β residues (121 and 124) are showed on brown dots.

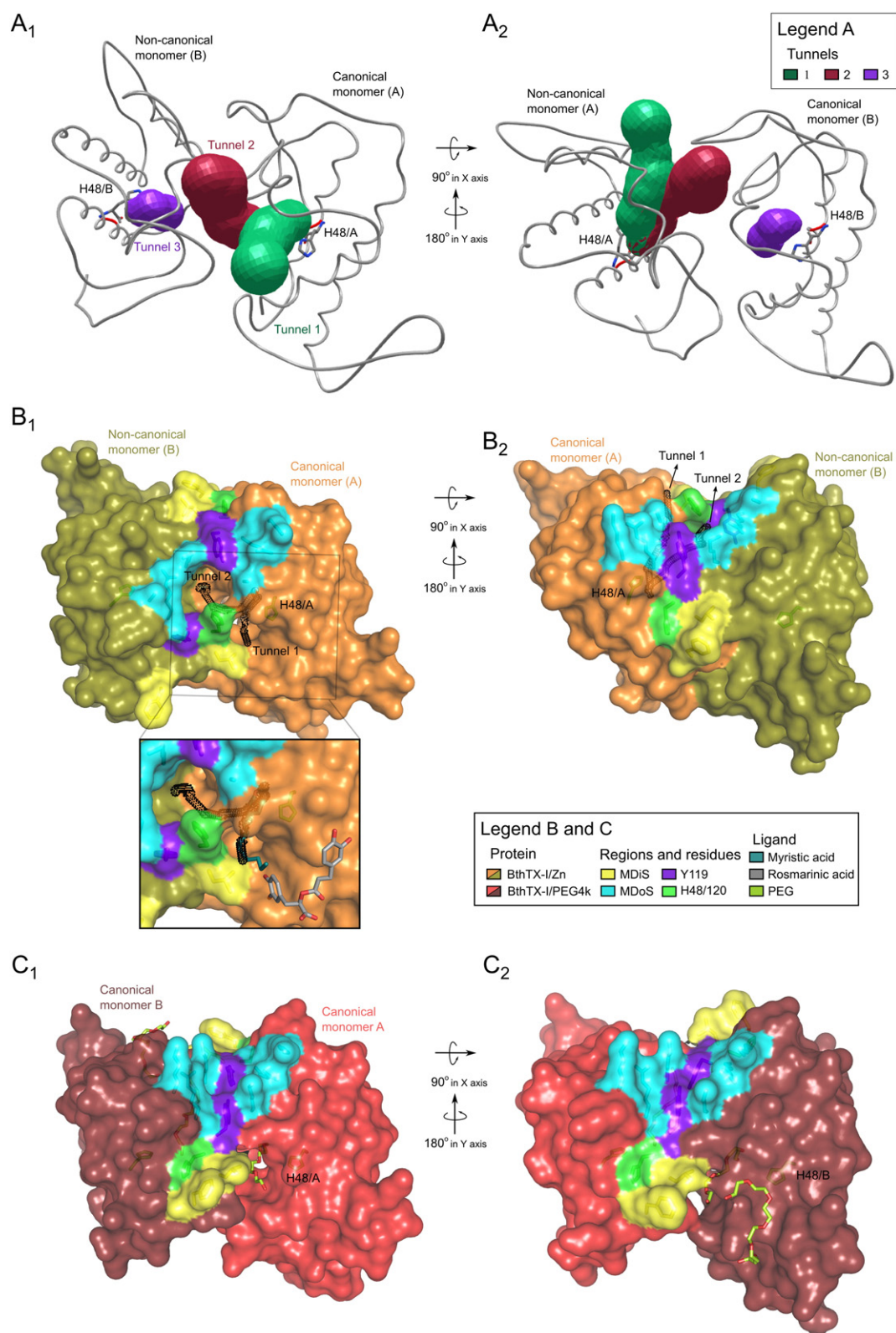


Fig. 5. Tunnels analysis for bothropic PLA₂s-like crystal structures in the **inactive** (A and B) and **active** states (C). **Tunnel 1**, which is only tunnel with hydrophobic feature, exists in **canonical monomers** (A₁, B₁, C₁ and C₂) and is accessible to the solvent through the N-terminal region of the **canonical monomer** and C-terminal region of the **non-canonical monomer** (A and B₁). (Zoom region in B₁) After superimposition, myristic acid (PDB id: 3MLM) occupies **tunnel 1** and rosmarinic acid (PDB id: 3QNL) is in **tunnel 1** entrance region. (B₂) The hydrophobic channel of the **non-canonical monomer** is inaccessible. (B and C) MDiS is in yellow, MDoS is in cyan, Y119 residue is in purple, H48 and H120 residues are in green. Myristic acid and rosmarinic acid ligands are represented in dark green and grey sticks, respectively.

implicated in a number of novel functions and pathologies of various tissues, organs and systems [59]. Here, zinc ions efficiently inhibit the myotoxicity of BthTX-I in mouse phrenic nerve-diaphragm (PND) preparations (Figs. 1A, B₂ and 2). Thus, the question arises of how zinc ions inhibit BthTX-I myotoxicity: by complexing to the toxin, by protecting PND preparation, or both? To address these questions, the effects of zinc alone were evaluated.

This study showed that zinc chloride (0.4 mM) reduced partially the evoked twitch amplitude in mouse PND preparations. Different effects of this concentration were reported for other nerve-muscle preparations, such as partial inhibition of indirect twitches in chick biventer cervicis [60], full inhibition of twitch amplitudes in rat atria [61], and no effect on the rat diaphragm [62]. The observed twitch reduction could be related to membrane damage, as zinc toxicity has been shown to be concentration- and cell type-dependent [59]. However, this hypothesis is rejected by the maintenance of the resting potential throughout entire PND experiment, at least using the evaluated zinc concentration, because sarcolemma damage would generally increase resting potential. Similar electrophysiological results with ZnCl₂ treatment were obtained by other groups in rat and mouse PND preparations [63].

When BthTX-I was pre-incubated with zinc ions, the PND preparations were protected from the paralyzing and depolarizing effects initiated by this PLA₂-like protein. Thus, the observed decreased in twitch amplitudes in the myographic assays following this treatment is related to another factor involved in the muscle contraction process. According

to the results obtained from the myographic and electrophysiological assays and shown here in the crystallographic and calorimetric experiments, the inhibition of myotoxic activity was due to the interaction between BthTX-I and the zinc ions.

4.2. Zinc interaction sites in BthTX-I and their relationship to the inhibitory process

Based on previous functional and structural experiments with PLA₂-like toxins and inhibitors, three different inhibition mechanisms were suggested for these proteins: i) ligands binding inside the hydrophobic channel or in its entrance, blocking the access of fatty acid molecules; ii) ligands interacting to specific residues of the MDos or MDIs regions [21], preventing the protein/membrane interaction; or iii) ligands inducing toxin oligomerization [22], which may result in a combination of the two previous processes. BPB and rosmarinic acid are example of the first class, and they inhibit all or a substantial fraction of the myotoxic, paralyzing and edematogenic effects of different toxins [20, 64,65]. Caffeic acid and aristolochic acid are examples of the second type of inhibitor, with partial myotoxic inhibition of PrTX-I from *Bothrops pirajai* venom [21]. Curiously, suramin was initially identified as a member of the first group because of its interaction site to BaspTX-I, from *Bothrops asper* venom [49], and it was recently classified into the second and third categories for MjTX-II, from *Bothrops moojeni* venom [22], but it always possesses high inhibition against PLA₂-like proteins [22,49,66]. The crystallographic study identified that the zinc ions interact with the BthTX-I structure at two different sites (Figs. 3 and 4): i) H48 in the hydrophobic channel from the **canonical monomer** (Zn1) and ii) H120 (near the MDIs) from both the **canonical** (Zn2) and **non-canonical monomers** (Zn3). The structural data also corroborated with the calorimetric studies which suggested the stoichiometry of three Zn ions for each BthTX-I.

The conservation of H48 and the other residues from the catalytic network in PLA₂-like toxins has been attributed to the maintenance of the hydrophobic channel [10,53] for entrance of a fatty acid that would lead to an oligomeric change for PLA₂-like proteins, a fundamental step in exerting myotoxicity [10,15]. Supporting this idea, different ligands have been shown to interact with H48, such as the BPB inhibitor, fatty acids and PEG molecules (Supplementary Fig. 2). Although the dimer orientation of the BthTX-I/Zn and dimeric BthTX-I/BPB structures are different, the zinc and C atoms of BPB share almost same position interacting to toxin's H48 Nπ atom (Supplementary Fig. 2); thus, their inhibitory mechanisms may be related. It is also interesting observed that the asymmetrical configuration of the monomers for the BthTX-I/Zn structure led to the non-accessibility of zinc ions by the hydrophobic channel of the non-canonical monomer (tunnels 1 and 2 are not observed in the non-canonical monomer - section 3.2.2); thus, only the zinc ion (Zn1) of the **canonical monomer** bond to H48.

Zn2 and Zn3 interact with the H120 Nπ atom from both monomers (Figs. 3B/C and 5) in the vicinity of the MDIs region. Similarly, the PrTX-I/aristolochic acid/PEG4k and MjTX-II/suramin/PEG4k crystallographic structures show inhibitors bound to the MDIs region, whose interactions were related to their inhibitory abilities [21,22]. The superposition of the BthTX-I/Zn monomers with the latter structures reveals that zinc is located close to aristolochic acid and shares the same position as the suramin urea group (Supplementary Fig. 2 B). Therefore, the binding of Zn ions to H120 may prevent the interaction between the MDIs residues (particularly L121) and the membrane. In addition, the interaction of Zn ions with the H120 in the **non-canonical monomer** may interfere with the oligomeric change of the toxin to its **active state**, as a position inversion between Y119 and H120 is necessary. Although H120 is conserved for many bothropic PLA₂-like proteins, a natural variant of tyrosine is found in a few bothropic snake venoms [48,51,67–72], with which zinc would probably not interact, reducing its inhibitory capability.

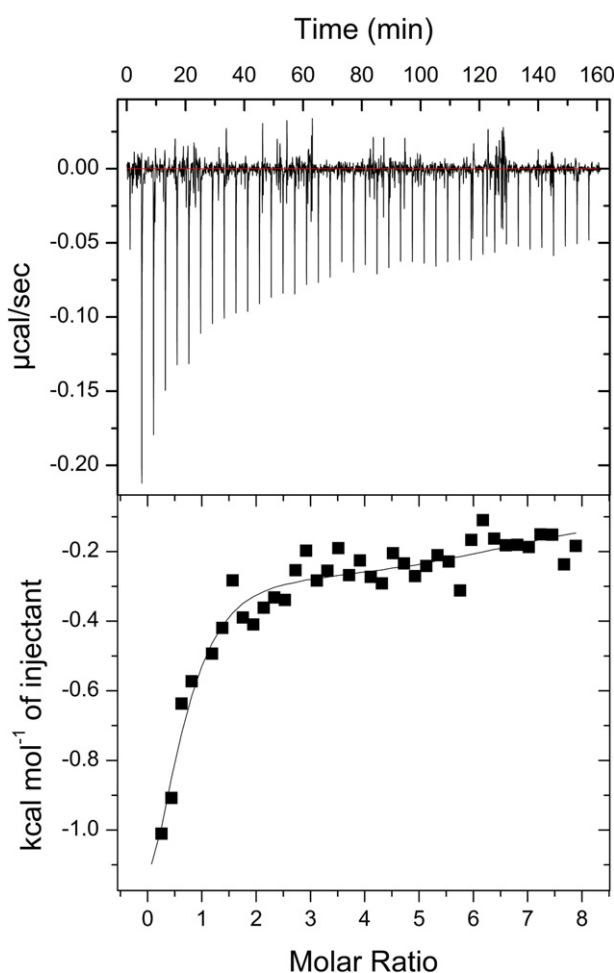


Fig. 6. Calorimetric titration of zinc ions into BthTX-I toxin. The upper panel shows the raw data thermogram (thermal power as a function of time) of the titration of BthTX-I (53 μM) with 2 mM zinc chloride. The lower panel shows the binding isotherm (ligand-normalized integrated heat as a function of the molar ratio). The best fitted binding isotherm with stoichiometry of 3 zinc ions for each BthTX-I molecule is shown as a solid line.

Finally, it is interesting to highlight that H48 is a strictly conserved residue for all PLA₂-like proteins, and H120 is conserved for many bothropic PLA₂-like proteins. Thus, the inhibitory mechanism proposed here would be similar for several bothropic PLA₂-like toxins, and zinc could be a potential inhibitory agent for *anti*-bothropic snake venom therapy.

4.3. Canonical and non-canonical monomers and hydrophobic channel accessibility

Bothropic PLA₂-like proteins (compact dimer conformation, also known as the alternative dimer) have a cavity surrounded by positive and hydrophobic residues that are related to the entrance of hydrophobic or negative molecules in the hydrophobic channel [10]. All residues in this cavity are thought to be fundamentally required for the myotoxic activity of PLA₂-like proteins (*i.e.*, MDoS, MDiS, and H48) (Supplementary Table 1), supporting the importance of the hydrophobic channel and C-terminal regions for toxin activity. The entry of hydrophobic molecules into this channel is important to induce dimer reorientation from the **inactive** to **active state**, an essential step of the myotoxic mechanism of action [15,16]. In this context, *apo* PLA₂-like toxins (empty hydrophobic channel) are in the **inactive state**, and their dimers exhibit an asymmetrical conformation (one monomer is canonical and the other is non-canonical). BthTX-I/Zn presents a structure similar to *apo* PLA₂-like structures for both monomers, as can be observed by the low RMSD values (≤ 0.7 Å) of the superposition of correspondent monomers (Table 2). In contrast, the crystallographic structures of the PLA₂-like proteins with ligands bound in the hydrophobic channel have their monomers in a symmetric conformation (canonical), as observed by superposition of the BthTX-I/Zn **canonical** and **non-canonical monomers** (Table 2). **Canonical monomers** are very similar, but the comparison between the non-canonical monomer of the BthTX-I/Zn and **canonical** monomers of the complexed structures present higher RMSD values (≥ 1.1 Å) (Table 2). MjTX-II structures are

Table 2
Root mean square deviation (RMSD, Å) of superpositions between monomers of available bothropic PLA₂-like crystallographic dimeric structures and BthTX-I/Zn canonical and non-canonical monomers. It was included only the lower RMSD value of each superposition. RMSD below 0.7 Å are shown in bold.

PDB code	BthTX-I/Zn Canonical monomer (chain letter)	BthTX-I/Zn Non-canonical monomer (chain letter)	Toxin	Ligand
3HZD	0.3 (B)	0.6 (A)	BthTX-I	–
2Q2J	0.3 (B)	0.6 (A)	PrTX-I	–
4K09	0.3 (B)	0.3 (A)	BbTX-II	–
1PA0	0.2 (A)	0.4 (B)	BnSP7	–
1PC9	0.3 (A)	0.4 (B)	BnSP6	–
3I3H	0.4 (B)	0.7 (A)	BthTX-I	–
2H8I	0.5 (B)	0.5 (A)	BthTX-I	PEG400
3MLM	0.5 (A)	1.1 (B)	BnIV	Myristic acid
2OK9	0.6 (A)	1.2 (B)	PrTX-I	BPB
3CYL	0.6 (A)	1.2 (B)	PrTX-I	Vitamin E and PEG4k
3IQ3	0.7 (A)	1.2 (B)	BthTX-I	PEG4k
1QLL	0.6 (A)	1.2 (B)	PrTX-II	N-tridecanoic acid
3QNL	0.6 (A)	1.1 (B)	PrTX-I	Rosmarinic acid and PEG330
3CXI	0.7 (A)	1.2 (B)	BthTX-I	Vitamin E and PEG4k
4K06	0.5 (A)	1.2 (B)	MTX-II	PEG4k
4YU7	0.6 (A)	1.1 (B)	PrTX-I	Caffeic acid and PEG4k
1Y4L	0.6 (A)	1.1 (B)	BaspTX-II	Suramin and PEG330
4YZ7	0.5 (A)	1.2 (B)	PrTX-I	Aristolochic acid and PEG4k
1CLP	0.6 (A)	1.2 (B)	BaspTX-II	–
3HZW	0.8 (B)	1.1 (A)	BthTX-I	BPB
4YV5	1.3 (A)	1.5 (B)	MjTX-II	Suramin and PEG4k
1XXS	1.2 (A)	1.4 (B)	MjTX-II	Stearic acid
4KF3	1.3 (A)	1.5 (B)	MjTX-II	PEG4k

Table 3

Distances (Å) between MDiS C β residues (121 and 124) for monomers (A and B) of **inactive** (asymmetric monomers) and **active states** (symmetric monomers) of bothropic PLA₂-like crystallographic dimeric structures. Structures are sorted by higher distance.

PDB code	Canonical monomer (chain letter)	Non-canonical monomer (chain letter)	Toxin	Ligand
3HZD	4.8 (B)	11.2 (A)	BthTX-I	–
2Q2J	4.9 (B)	10.9 (A)	PrTX-I	–
4K09	4.5 (B)	10.9 (A)	BbTX-II	–
1PA0	4.8 (A)	10.8* (B)	Bnsp7	–
1PC9	4.7 (A)	10.3* (B)	Bnsp6	–
4WTB	4.7 (A)	10.3 (B)	BthTX-I	Zn ²⁺
3HZW	6.2 (B)	9.7 (A)	BthTX-I	BPB
3I3H	4.6 (B)	9.3 (A)	BthTX-I	–
2H8I	4.9 (B)	8.5 (A)	BthTX-I	PEG400
3MLM	4.6 (A)	5.4 (B)	BnIV	Myristic acid
2OK9	4.5 (A)	5.3 (B)	PrTX-I	BPB
3CYL	4.5 (A)	5.3 (B)	PrTX-I	Vitamin E and PEG4k
3IQ3	4.7 (A)	5.2 (B)	BthTX-I	PEG4k
1QLL	5.2 (A)	5.2 (B)	PrTX-II	N-tridecanoic acid
3QNL	4.8 (A)	5.2 (B)	PrTX-I	Rosmarinic acid and PEG330
3CXI	4.7 (A)	5.1 (B)	BthTX-I	Vitamin E and PEG4k
4K06	5.1 (A)	4.9 (B)	MTX-II	PEG4k
4YU7	5.0 (A)	4.7 (B)	PrTX-I	Caffeic acid and PEG4k
4YV5	4.9 (A)	5.0 (B)	MjTX-II	Suramin and PEG4k
1Y4L	4.6 (A)	4.8 (B)	BaspTX-II	Suramin and PEG330
4YZ7	4.7 (A)	4.7 (B)	PrTX-I	Aristolochic acid and PEG4k
1XXS	4.4 (A)	4.7 (B)	MjTX-II	Stearic acid
4KF3	4.4 (A)	4.4 (B)	MjTX-II	PEG4k
1CLP	4.2 (A)	3.5* (B)	BaspTX-II	–

* C β was added, since this atom was omitted in the crystallographic structure.

exceptions because they present specific structural characteristics [15], resulting in higher RMSD compared to other toxins (Table 2).

In this work, we observed that the MDiS is stabilized by one hydrogen bond between the main chain oxygen of L121 and the main chain nitrogen of F125, two hydrophobic and exposed residues, and by the rigid P123 that, together with K122, form a short 3₁₀ helix (Fig. 4B, orange cartoon). Furthermore, the distances between the C β atoms from L121 and F125 from all **canonical monomers** are <5.5 Å, whereas the distances for the residues from all **non-canonical monomers** are larger than 10 Å (Table 3). The BthTX-I/PEG400 structure is the only exception, as it is a complex in **inactive state** with a **non-canonical monomer**, with a measured distance that is reduced from the usual 10 Å to 7.5 Å (Table 3). The reduced distance between the MDiS C β atoms is probably a consequence of the presence of a short PEG molecule in the **canonical monomer** because that is the main difference compared to *apo* BthTX-I and we observed that the electron density for the other PEG400 molecule in the **non-canonical monomer** is ambiguous. Therefore, BthTX-I/PEG400 structure may represent an intermediate state between the **inactive** and **active states**. Whereas, presence of longer PEG molecules (PEG4k) induces toxin to be in **active state** with symmetrical monomers.

Canonical monomers of bothropic PLA₂-like proteins contain **tunnel 1**, as described in Section 3.2.2, which structurally connects the N-terminal region and H48 with the C-terminal region of the other monomer. As a matter of fact, the N-terminal region has been suggested to be an important region with its hydrophobic residues [73,74], and it may be associated with the membrane interaction, similar to the MDiS. PLA₂-like structures in the **active state** display symmetrical and **canonical monomers**, and **tunnel 1** is occupied by ligands, such as fatty acids or PEG molecules. Interestingly, a rosmarinic acid inhibitor is observed at the entrance of one of the PrTX-I/RA **tunnel 1** regions and interacts with the N-terminal residues of one monomer and the hydrophobic residues of the C-terminal region of the other monomer (gray sticks in the zoom of Fig. 5B₁), preventing PEG4k entrance.

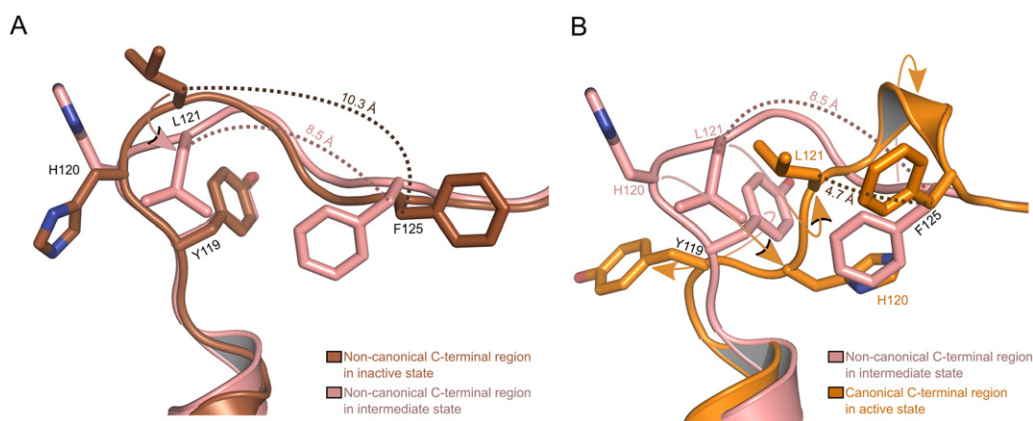


Fig. 7. Structural transitions of the C-termini from the BthTX-I that occurs during hydrophobic molecule entrance. The first state is represented by BthTX-I/Zn **non-canonical monomer** showed as a brown cartoon (A). An intermediate second state is found only in the **non-canonical monomer** of the BthTX-I/PEG400 (PDB id: 2H8I) showed as a pink cartoon (A and B). Finally, a third state is represented by **canonical monomer** of the BthTX-I/PEG4k (PDB id: 2H8I) showed as orange cartoon (B). (A) The transition from first to second state is characterized by a reduction of 10.3 Å to 8.5 Å from L121-F125 C β distance resulted from the structural change of L121 caused by hydrophobic molecule entrance in the **canonical monomer** channel. (B) The transition from second to third state is characterized by change of **non-canonical monomer** to **canonical** because Y119 and H120 residues invert their direction (180° rotation), leading to the approximation of the L121 and F125 residues (4.7 Å) and to the formation of a short 3₁₀ helix. Side chains of Y119, H120, L121 and F125 residues are shown in sticks. Meaningful conformation changes are pointed in arrows.

PLA₂-like structures in the **inactive state** only exhibit **tunnel 1** for one monomer (**canonical monomer**). The comparison between **tunnels 1** of the structures in the **active** and **inactive states** shows that their cores are identical; however, their entrances are different due to the different dimeric orientations and differences in the C-termini (refer to Section 3.2.1). By comparing the hydrophobic channels of **inactive state** structures, differences in the side chain positions of the H120, K122 and F125 residues can be observed. Such variability is probably related to their flexibility, which is essential for the conformational change from the **non-canonical** to **canonical monomer**, in which Y119 and H120 invert their positions with a 180° rotation (Fig. 7). Curiously, the **hydrophobic tunnels** of BthTX-I/PEG400 and *apo* BthTX-I (3HZD) are closed by the position of the H120 side chain, whereas they are open in the available models of the other bothropic PLA₂-like proteins.

4.4. New steps in the myotoxic mechanism of PLA₂-like toxins

The results presented here identified interesting new structural features related to the oligomeric changes between the **inactive** and **active states** of PLA₂-like proteins. From the detailed structural analysis of the MDiS region, it was possible to identify totally different MDiS conformations in the **inactive** and **active states**, which may be measured by the distance between the L121 and F125 residues (Figs. 5 and 7). Furthermore, from the comprehensive structural bioinformatics study of the protein tunnels, we could identified the relevant tunnels for the PLA₂-like proteins and their relationships to the transition between both states, which is represented by the entrance of hydrophobic molecules in **tunnel 1** of **canonical monomer**, leading to dimer reorientation and a structural change from asymmetrical to symmetrical monomers.

Thus, based on the results presented here, we suggest the following myotoxic mechanism for PLA₂-like proteins, in which item ii was added and additional details were added to items i, iii and iv of the previously proposed myotoxic mechanism [15]:

- i) The activation starts with the entrance of **one** hydrophobic molecule/fatty acid through **tunnel 1** of the **canonical monomer**.
- ii) Approximation of L121 to F125 residues from the **non-canonical monomer**.
- iii) The dimer is reoriented, and the **non-canonical monomer** adopts its canonical conformation by inverting the Y119 and

H120 positions and further approximating the L121 and F125 positions.

- iv) The inaccessible and vacant hydrophobic channel is opened by dimer reorientation and a hydrophobic molecule/fatty acid is bound, stabilizing the toxin **active state**.
- v) Protein-membrane docking through the MDoS.
- vi) Membrane destabilization by its interaction with the MDiS.
- vii) Uncontrolled influx of ions and, consequently, cell death.

Steps i to iv of the proposed myotoxic mechanism are represented by two morphing videos based on the different identified states of the BthTX-I crystallographic structures (Supplementary Videos 1 and 2).

4.5. Concluding remarks

The structural study presented here and its comparison to other PLA₂-like structures added important elements to the comprehension of the allosteric transition that PLA₂-like proteins undergo to exert their function. The transition between the **inactive state**, which is present as asymmetrical monomers, to the **active states** with symmetrical monomers was observed, and a key tunnel (**Tunnel 1**) was identified for the first time, in which all fundamental residues for the myotoxicity of PLA₂-like proteins are located (MDoS, MDiS and H48). Furthermore, we showed that zinc ions inhibited BthTX-I myotoxicity *in vivo* by interacting to H48 of the accessible hydrophobic channel (**canonical monomer**) and to both H120 residues, as determined in the crystallographic studies. Based on these observations, we can hypothesize that the Zn ions simultaneously inhibit BthTX-I through two different mechanisms: i) preventing fatty acid binding to H48 and thus avoiding the state transition from the **inactive** to **active state**, and ii) by binding directly to the MDiS region, preventing the membrane disruption process. Thus, zinc ions could be a new candidate to aid *anti-venom* treatment against the myonecrotic effects induced by the most abundant toxin in some bothropic snake venoms. Finally, all of the information presented here, regarding the expression of myonecrosis by PLA₂-like proteins and its inhibition, can promote the design of new and even more accurate structure-based inhibitors that can completely inhibit these proteins and provide new insights to complement the conventional serum therapy.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.08.003>.

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found, in online version.

Acknowledgments

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - 2015/17286-0 and 2013/00873-4), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - 300596/2013-8) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - 1592/2011) Brazil). The authors acknowledge Gildo Bernardo Leite for his technical assistance in mouse PND experiments and the Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Brazil) for the use and support of the MX beamlines.

References

- [1] A. Kasturiratne, A.R. Wickremasinghe, N. de Silva, N.K. Gunawardena, A. Pathmeswaran, R. Premaratna, L. Savioli, D.G. Lalloo, H.J. de Silva, The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths, *PLoS Med.* 5 (2008) e218, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.0050218>.
- [2] J.M. Gutiérrez, B. Lomonte, G. León, A. Alape-Girón, M. Flores-Díaz, L. Sanz, Y. Angulo, J.J. Calvete, Snake venomomics and antivenomics: proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming, *J. Proteome Res.* 8 (2009) 165–182, <http://dx.doi.org/10.1021/jpr0901008>.
- [3] D.A. Warrell, Snake bite, *Lancet* 375 (2010) 77–88, [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61754-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61754-2).
- [4] J.M. Gutiérrez, R.D.G. Theakston, D.A. Warrell, Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership, *PLoS Med.* 3 (2006) <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.0030150>.
- [5] World Health Organization, Rabies and Envenomings: A Neglected Public Health Issue, W.H.O., Geneva, 2007 (<http://apps.who.int/iris/handle/10665/43858>).
- [6] J.J. Calvete, P. Juárez, L. Sanz, Snake venomomics. Strategy and applications, *J. Mass Spectrom.* 42 (2007) 1405–1414, <http://dx.doi.org/10.1002/jms.1242>.
- [7] J.J. Calvete, L. Sanz, P. Cid, P. de la Torre, M. Flores-Díaz, M.C. Dos Santos, A. Borges, A. Bremó, Y. Angulo, B. Lomonte, A. Alape-Girón, J.M. Gutiérrez, Snake venomomics of the Central American rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* complex points to neurotoxicity as an adaptive paedomorphic trend along *Crotalus* dispersal in South America, *J. Proteome Res.* 9 (2010) 528–544, <http://dx.doi.org/10.1021/pr9008749>.
- [8] R.H. Schaloske, E.A. Dennis, The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system, *Biochim. Biophys. Acta* 1761 (2006) 1246–1259, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.07.011>.
- [9] B. Lomonte, J.M. Gutiérrez, Phospholipases A2 from Viperidae snake venoms: how do they induce skeletal muscle damage? *Acta Chim. Slov.* 58 (2011) 647–658.
- [10] C.A.H. Fernandes, R.J. Borges, B. Lomonte, M.R.M. Fontes, A structure-based proposal for a comprehensive myotoxic mechanism of phospholipase A2-like proteins from viperid snake venoms, *Biochim. Biophys. Acta* 1844 (12) (2014) 2265–2276.
- [11] A.H. de Oliveira, J.R. Giglio, S.H. Andrião-Escarso, A.S. Ito, R.J. Ward, A pH-induced dissociation of the dimeric form of a lysine 49-phospholipase A2 abolishes Ca²⁺-independent membrane damaging activity, *Biochemistry (Mosc)* 40 (2001) 6912–6920.
- [12] A.H.C. de Oliveira, T.L. Ferreira, R.J. Ward, Reduced pH induces an inactive non-native conformation of the monomeric bothropstoxin-I (Lys49-PLA2), *Toxicon* 54 (2009) 373–378, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.04.022>.
- [13] L. Chioato, E.A. Aragão, T. Lopes Ferreira, A.I. de Medeiros, L.H. Faccioli, R.J. Ward, Mapping of the structural determinants of artificial and biological membrane damaging activities of a Lys49 phospholipase A2 by scanning alanine mutagenesis, *Biochim. Biophys. Acta* 1768 (2007) 1247–1257, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbame.2007.01.023>.
- [14] B. Lomonte, Y. Angulo, L. Calderón, An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action, *Toxicon* 42 (2003) 885–901, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.11.008>.
- [15] C.A.H. Fernandes, E.J. Comparetti, R.J. Borges, S. Huancahuire-Vega, L.A. Ponce-Soto, S. Marangoni, A.M. Soares, M.R.M. Fontes, Structural bases for a complete myotoxic mechanism: crystal structures of two non-catalytic phospholipases A2-like from *Bothrops* brazilian venom, *Biochim. Biophys. Acta* 1834 (2013) 2772–2781, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalap.2013.10.009>.
- [16] J.I. dos Santos, A.M. Soares, M.R.M. Fontes, Comparative structural studies on Lys49-phospholipase A(2) from *Bothrops* genus reveal their myotoxic site, *J. Struct. Biol.* 167 (2009) 106–116, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2009.04.003>.
- [17] C. Montecucco, J.M. Gutiérrez, B. Lomonte, Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action, *Cell. Mol. Life Sci.* 65 (2008) 2897–2912, <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-008-8113-3>.
- [18] E.E. Sánchez, A. Rodríguez-Acosta, Inhibitors of snake venoms and development of new therapeutics, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 30 (2008) 647–678, <http://dx.doi.org/10.1080/08923970802279019>.
- [19] A.M. Soares, F.K. Tici, S. Marcussi, M.V. Lourenço, A.H. Januário, S.V. Sampaio, J.R. Giglio, B. Lomonte, P.S. Pereira, Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms, *Curr. Med. Chem.* 12 (2005) 2625–2641.
- [20] J.I. dos Santos, F.F. Cardoso, A.M. Soares, M. Dal Pai Silva, M. Gallacci, M.R.M. Fontes, Structural and functional studies of a bothropic myotoxin complexed to rosmarinic acid: new insights into Lys49-PLA₂ inhibition, *PLoS One* 6 (2011) e28521, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0028521>.
- [21] C.A.H. Fernandes, F.F. Cardoso, W.G.L. Cavalcante, A.M. Soares, M. Dal-Pai, M. Gallacci, M.R.M. Fontes, Structural basis for the inhibition of a phospholipase A2-like toxin by caffeic and aristolochic acids, *PLoS One* 10 (2015) e0133370, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0133370>.
- [22] G.H.M. Salvador, T.R. Dreyer, W.L.G. Cavalcante, F.F. Matioli, J.I. dos Santos, A. Velazquez-Campoy, M. Gallacci, M.R.M. Fontes, Structural and functional evidence for membrane docking and disruption sites on phospholipase A2-like proteins revealed by complexation with the inhibitor suramin, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 71 (2015) 2066–2078, <http://dx.doi.org/10.1107/S1399004715014443>.
- [23] L. Rodrigues-Simioni, J. Prado-Franceschi, A.C. Cintra, J.R. Giglio, M.S. Jiang, J.E. Fletcher, No role for enzymatic activity or dantrolene-sensitive Ca²⁺ stores in the muscular effects of bothropstoxin, a Lys49 phospholipase A2 myotoxin, *Toxicon* 33 (1995) 1479–1489.
- [24] A.M. Soares, Y. Oshima-Franco, C.A. Vieira, G.B. Leite, J.E. Fletcher, M.-S. Jiang, A.C.O. Cintra, J.R. Giglio, L. Rodrigues-Simioni, Mn(2+) ions reduce the enzymatic and pharmacological activities of bothropstoxin-I, a myotoxic Lys49 phospholipase A(2) homologue from *Bothrops jararacussu* snake venom, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34 (2002) 668–677.
- [25] N.F. Heluany, M.I. Homs-Brandeburgo, J.R. Giglio, J. Prado-Franceschi, L. Rodrigues-Simioni, Effects induced by bothropstoxin, a component from *Bothrops jararacussu* snake venom, on mouse and chick muscle preparations, *Toxicon* 30 (1992) 1203–1210.
- [26] A.S. Prasad, Discovery of human zinc deficiency: 50 years later, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 26 (2012) 66–69, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2012.04.004>.
- [27] A.S. Prasad, F.W.J. Beck, D.C. Snell, O. Kucuk, Zinc in cancer prevention, *Nutr. Cancer* 61 (2009) 879–887, <http://dx.doi.org/10.1080/01635580903285122>.
- [28] P.J. Little, R. Bhattacharya, A.E. Moreyra, L.L. Korichneva, Zinc and cardiovascular disease, *Nutrition* 26 (2010) 1050–1057, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2010.03.007>.
- [29] D.K. Dhawan, V.D. Chadha, Zinc: a promising agent in dietary chemoprevention of cancer, *Indian J. Med. Res.* 132 (2010) 676–682.
- [30] B.J. Grattan, H.C. Freake, Zinc and cancer: implications for LIV-1 in breast cancer, *Nutrients* 4 (2012) 648–675, <http://dx.doi.org/10.3390/nu4070648>.
- [31] M.I. Homs-Brandeburgo, L.S. Queiroz, H. Santo-Neto, L. Rodrigues-Simioni, J.R. Giglio, Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin, *Toxicon* 26 (1988) 615–627.
- [32] R.S. Floriano, V.C. Carregari, V.A. de Abreu, B. Kenzo-Kagawa, L.A. Ponce-Soto, M.A. da Cruz-Höfling, S. Hyslop, S. Marangoni, L. Rodrigues-Simioni, Pharmacological study of a new Asp49 phospholipase A(2) (Bbil-TX) isolated from *Bothriopsis bilineata* smaragdina (forest viper) venom in vertebrate neuromuscular preparations, *Toxicon* 69 (2013) 191–199, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.03.006>.
- [33] Y. Oshima-Franco, G.B. Leite, C.A.D. Belo, S. Hyslop, J. Prado-Franceschi, A.C.O. Cintra, J.R. Giglio, M.A. da Cruz-Höfling, L. Rodrigues-Simioni, The presynaptic activity of bothropstoxin-I, a myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venom, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 95 (2004) 175–182, http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-7843.2004.pto_950405.x.
- [34] P. Rey-Suárez, R.S. Floriano, S. Rostelato-Ferreira, M. Saldarriaga-Córdoba, V. Núñez, L. Rodrigues-Simioni, B. Lomonte, Mipartoxin-I, a novel three-finger toxin, is the major neurotoxic component in the venom of the redtail coral snake *Micrurus mipartitus* (Elapidae), *Toxicon* 60 (2012) 851–863, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.05.023>.
- [35] A. McPherson, Introduction to Macromolecular Crystallography, 2nd ed. Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ, 2009.
- [36] W. Kabsch, XDS, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66 (2010) 125–132, <http://dx.doi.org/10.1107/S0907444909047337>.
- [37] A.J. McCoy, R.W. Grosse-Kunstleve, P.D. Adams, M.D. Winn, L.C. Storoni, R.J. Read, Phaser crystallographic software, *J. Appl. Crystallogr.* 40 (2007) 658–674, <http://dx.doi.org/10.1107/S0021889807021206>.
- [38] P.D. Adams, P.V. Afonine, G. Bunkóczi, V.B. Chen, I.W. Davis, N. Echols, J.J. Headd, L.-W. Hung, G.J. Kapral, R.W. Grosse-Kunstleve, A.J. McCoy, N.W. Moriarty, R. Oeffner, R.J. Read, D.C. Richardson, J.S. Richardson, T.C. Terwilliger, P.H. Zwart, PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66 (2010) 213–221, <http://dx.doi.org/10.1107/S0907444909052925>.
- [39] P. Emsley, B. Lohkamp, W.G. Scott, K. Cowtan, Features and development of Coot, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66 (2010) 486–501, <http://dx.doi.org/10.1107/S0907444910007493>.
- [40] I.W. Davis, A. Leaver-Fay, V.B. Chen, J.N. Block, G.J. Kapral, X. Wang, L.W. Murray, W.B. Arendall 3rd, J. Snoeyink, J.S. Richardson, D.C. Richardson, MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) W375–W383, <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkm216>.
- [41] E. Krissinel, K. Henrick, Inference of macromolecular assemblies from crystalline state, *J. Mol. Biol.* 372 (2007) 774–797, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2007.05.022>.
- [42] D. Sehnal, R. Svoboda, V. Vařeková, K. Berka, L. Pravda, V. Navrátilová, P. Banáš, C.-M. Ionescu, M. Otyepka, J. Koča, MOLE 2.0: advanced approach for analysis of biomacromolecular channels, *J. Cheminform.* 5 (2013) 39, <http://dx.doi.org/10.1186/1758-2946-5-39>.

- [43] C.A.H. Fernandes, D.P. Marchi-Salvador, G.M. Salvador, M.C.O. Silva, T.R. Costa, A.M. Soares, M.R.M. Fontes, Comparison between apo and complexed structures of bothropstoxin-I reveals the role of Lys122 and Ca(2+)-binding loop region for the catalytically inactive Lys49-PLA(2)s, *J. Struct. Biol.* 171 (2010) 31–43, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2010.03.019>.
- [44] M.T. Murakami, M.M. Viçoti, J.R.B. Abrego, M.R. Lourenzoni, A.C.O. Cintra, E.Z. Arruda, M.A. Tomaz, P.A. Melo, R.K. Arni, Interfacial surface charge and free accessibility to the PLA2-active site-like region are essential requirements for the activity of Lys49 PLA2 homologues, *Toxicon* 49 (2007) 378–387, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.10.011>.
- [45] D.P. Marchi-Salvador, C.A.H. Fernandes, L.B. Silveira, A.M. Soares, M.R.M. Fontes, Crystal structure of a phospholipase A(2) homolog complexed with p-bromophenacyl bromide reveals important structural changes associated with the inhibition of myotoxic activity, *Biochim. Biophys. Acta* 1794 (2009) 1583–1590, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.07.005>.
- [46] W.H. Lee, M.T. da Silva Giotto, S. Marangoni, M.H. Toyama, I. Polikarpov, R.C. Garratt, Structural basis for low catalytic activity in Lys49 phospholipases A2—a hypothesis: the crystal structure of piratoxin II complexed to fatty acid, *Biochemistry (Mosc)* 40 (2001) 28–36.
- [47] A.J. Magro, A.M. Soares, J.R. Giglio, M.R.M. Fontes, Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A(2): quaternary structure and inhibition mechanism insights, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311 (2003) 713–720.
- [48] R.K. Arni, R.J. Ward, J.M. Gutierrez, A. Tulinsky, Structure of a calcium-independent phospholipase-like myotoxic protein from *Bothrops asper* venom, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 51 (1995) 311–317, <http://dx.doi.org/10.1107/S0907444994011455>.
- [49] M.T. Murakami, E.Z. Arruda, P.A. Melo, A.B. Martinez, S. Calil-Eliás, M.A. Tomaz, B. Lomonte, J.M. Gutiérrez, R.K. Arni, Inhibition of myotoxic activity of *Bothrops asper* myotoxin II by the anti-trypanosomal drug suramin, *J. Mol. Biol.* 350 (2005) 416–426, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2005.04.072>.
- [50] P. Delatorre, B.A.M. Rocha, T. Santi-Gadelha, C.A.A. Gadelha, M.H. Toyama, B.S. Cavada, Crystal structure of Bn IV in complex with myristic acid: a Lys49 myotoxic phospholipase A₂ from *Bothrops neuwiedi* venom, *Biochimie* 93 (2011) 513–518, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2010.11.003>.
- [51] L. Watanabe, A.M. Soares, R.J. Ward, M.R.M. Fontes, R.K. Arni, Structural insights for fatty acid binding in a Lys49-phospholipase A2: crystal structure of myotoxin II from *Bothrops moojeni* complexed with stearic acid, *Biochimie* 87 (2005) 161–167, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2004.11.005>.
- [52] G.H.M. Salvador, W.L.G. Cavalcante, J.I. Dos Santos, M. Gallacci, A.M. Soares, M.R.M. Fontes, Structural and functional studies with myotoxin II from *Bothrops moojeni* reveal remarkable similarities and differences compared to other catalytically inactive phospholipases A₂-like, *Toxicon* 72 (2013) 52–63, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.06.013>.
- [53] A.L.B. Ambrosio, M.C. Nonato, H.S.S. de Araújo, R. Arni, R.J. Ward, C.L. Ownby, D.H.F. de Souza, R.C. Garratt, A molecular mechanism for Lys49-phospholipase A2 activity based on ligand-induced conformational change, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 7326–7335, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M410588200>.
- [54] H. Zheng, M.D. Chordia, D.R. Cooper, M. Chruszcz, P. Müller, G.M. Sheldrick, W. Minor, Validation of metal-binding sites in macromolecular structures with the CheckMyMetal web server, *Nat. Protoc.* 9 (2014) 156–170, <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2013.172>.
- [55] T. Biswas, O.V. Tsodikov, An easy-to-use for planning and modeling a calorimetric titration, *Anal. Biochem.* 406 (2010) 91–93, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2010.06.050>.
- [56] T. Crépin, A. Dias, A. Palencia, C. Swale, S. Cusack, R.W.H. Ruigrok, Mutational and metal binding analysis of the endonuclease domain of the influenza virus polymerase PA subunit, *J. Virol.* 84 (2010) 9096–9104, <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00995-10>.
- [57] J.M. Berg, Y. Shi, The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc, *Science* 271 (1996) 1081–1085.
- [58] B.L. Vallee, K.H. Falchuk, The biochemical basis of zinc physiology, *Physiol. Rev.* 73 (1993) 79–118.
- [59] R.A. Bozym, F. Chimienti, L.J. Giblin, G.W. Gross, I. Korichneva, Y. Li, S. Libert, W. Maret, M. Parviz, C.J. Frederickson, R.B. Thompson, Free zinc ions outside a narrow concentration range are toxic to a variety of cells in vitro, *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 235 (2010) 741–750, <http://dx.doi.org/10.1258/ebm.2010.009258>.
- [60] S.Y. Lin-Shiau, W.M. Fu, Effects of divalent cations on neuromuscular transmission in the chick, *Eur. J. Pharmacol.* 64 (1980) 259–269.
- [61] F.R. Ciofalo, L.J. Thomas, The effects of zinc on contractility, membrane potentials, and cation content of rat atria, *J. Gen. Physiol.* 48 (1965) 825–839.
- [62] A. Gölgeli, N. Dursun, C. Süer, C. Ozesmi, S. Aydoğan, Zinc-induced alterations in contractile properties of rat diaphragm muscle in vitro, *Biol. Trace Elem. Res.* 60 (1997) 251–260, <http://dx.doi.org/10.1007/BF02784445>.
- [63] E.K. Silbergeld, J.T. Fales, A.M. Goldberg, The effects of inorganic lead on the neuromuscular junction, *Neuropharmacology* 13 (1974) 795–801.
- [64] A.M. Soares, J.R. Giglio, Chemical modifications of phospholipases A2 from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties, *Toxicon* 42 (2003) 855–868, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.11.004>.
- [65] F.K. Ticli, L.L.S. Hage, R.S. Cambraia, P.S. Pereira, A.J. Magro, M.R.M. Fontes, R.G. Stábéli, J.R. Giglio, S.C. França, A.M. Soares, S.V. Sampaio, Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A2 inhibitor from Cordia verbenacea (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction, *Toxicon* 46 (2005) 318–327, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.04.023>.
- [66] M. de Oliveira, W.L.G. Cavalcante, E.Z. Arruda, P.A. Melo, M. Dal-Pai Silva, M. Gallacci, Antagonism of myotoxic and paralyzing activities of bothropstoxin-I by suramin, *Toxicon* 42 (2003) 373–379.
- [67] P.J. Yunes Quartino, J.L. Barra, G.D. Fidelio, Cloning and functional expression of secreted phospholipases A(2) from *Bothrops diporus* (Yarará Chica), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 427 (2012) 321–325, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.09.051>.
- [68] S. Lizano, G. Lambeau, M. Lazdunski, Cloning and cDNA sequence analysis of Lys(49) and Asp(49) basic phospholipase A(2) myotoxin isoforms from *Bothrops asper*, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33 (2001) 127–132.
- [69] V. Núñez, V. Arce, J.M. Gutiérrez, B. Lomonte, Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A2 homologue from the venom of the snake *Bothrops atrox*, *Toxicon* 44 (2004) 91–101, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.04.013>.
- [70] L.A. Ponce-Soto, B. Lomonte, J.M. Gutiérrez, L. Rodrigues-Simioni, J.C. Novello, S. Marangoni, Structural and functional properties of BaTX, a new Lys49 phospholipase A2 homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus*, *Biochim. Biophys. Acta* 1770 (2007) 585–593, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.11.015>.
- [71] G.H.M. Salvador, C.A.H. Fernandes, A.J. Magro, D.P. Marchi-Salvador, W.L.G. Cavalcante, R.M. Fernandez, M. Gallacci, A.M. Soares, C.L.P. Oliveira, M.R.M. Fontes, Structural and phylogenetic studies with MjTX-I reveal a multi-oligomeric toxin—a novel feature in Lys49-PLA2s protein class, *PLoS One* 8 (2013) e60610, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0060610>.
- [72] P.J. Yunes Quartino, J.L. Barra, G.D. Fidelio, Cloning and functional expression of secreted phospholipases A(2) from *Bothrops diporus* (Yarará Chica), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 427 (2012) 321–325, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.09.051>.
- [73] C. Díaz, A. Alape, B. Lomonte, T. Olamendi, J.M. Gutiérrez, Cleavage of the NH₂-terminal octapeptide of *Bothrops asper* myotoxic lysine-49 phospholipase A2 reduces its membrane-destabilizing effect, *Arch. Biochem. Biophys.* 312 (1994) 336–339, <http://dx.doi.org/10.1006/abbi.1994.1317>.
- [74] A.M. Soares, R. Guerra-Sá, C.R. Borja-Oliveira, V.M. Rodrigues, L. Rodrigues-Simioni, V. Rodrigues, M.R. Fontes, B. Lomonte, J.M. Gutiérrez, J.R. Giglio, Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A(2) homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom, *Arch. Biochem. Biophys.* 378 (2000) 201–209, <http://dx.doi.org/10.1006/abbi.2000.1790>.



Structural and thermodynamic studies of the tobacco calmodulin-like rgs-CaM protein



Rodrigo K. Makiyama^{a,1}, Carlos A.H. Fernandes^{b,1}, Thiago R. Dreyer^b, Bruno S. Moda^a, Fabio F. Matioli^b, Marcos R.M. Fontes^b, Ivan G. Maia^{a,*}

^a Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Departamento de Genética, Botucatu, SP, Brazil

^b Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Departamento de Física e Biofísica, Botucatu, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 January 2016

Received in revised form 8 July 2016

Accepted 7 August 2016

Available online 8 August 2016

Keywords:

Ca²⁺-binding protein

Calmodulin-like protein

rgs-CaM

ABSTRACT

The tobacco calmodulin-like protein rgs-CaM is involved in host defense against virus and is reported to possess an associated RNA silencing suppressor activity. Rgs-CaM is also believed to act as an antiviral factor by interacting and targeting viral silencing suppressors for autophagic degradation. Despite these functional data, calcium interplay in the modulation of rgs-CaM is still poorly understood. Here we show that rgs-CaM displays a prevalent alpha-helical conformation and possesses three functional Ca²⁺-binding sites. Using computational modeling and molecular dynamics simulation, we demonstrate that Ca²⁺ binding to rgs-CaM triggers expansion of its tertiary structure with reorientation of alpha-helices within the EF-hands. This conformational change leads to the exposure of a large negatively charged region that may be implicated in the electrostatic interactions between rgs-CaM and viral suppressors. Moreover, the k_d values obtained for Ca²⁺ binding to the three functional sites are not within the affinity range of a typical Ca²⁺ sensor.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

RNA silencing is a potent host defense mechanism against plant viruses that is counteracted by viral proteins possessing RNA silencing suppression activities [1]. Host proteins acting as suppressors of RNA silencing have also been identified and a *Nicotiana tabacum* calmodulin-like protein called rgs-CaM (for regulator of gene silencing camodulin-like) was the first whose suppression activity was demonstrated [2]. The tobacco rgs-CaM was shown to interact with the helper-component proteinase (HC-Pro), a viral RNA silencing suppressor, and was postulated to be required for HC-Pro-mediated silencing suppression. Consistent with this, Li et al. [3] demonstrated that an rgs-CaM homolog of *N. benthamiana* is required for the RNA silencing suppression activity of β C1, a suppressor encoded by the satellite DNA of *Tomato yellow leaf curl China virus*. Contradictory findings, however, have shown that the interaction of rgs-CaM with different viral suppressors has an antiviral function [4]. In this case, rgs-CaM is supposed to counteract viral suppressors by binding to their double-stranded RNA (dsRNA)-

binding domains and targeting them for autophagic degradation. Moreover, the proposed mechanism requires self-sacrifice of the rgs-CaM protein. Evolving knowledge indicates that rgs-CaM is an early-inducible gene implicated in the initial steps of viral infection [5].

Despite sharing similarity with calmodulins (CaM) and Calmodulin-like proteins (CML), little is known about the structural features of rgs-CaM. Such structural studies are important to shed light on the function of rgs-CaM and also to elucidate its interaction with target viral suppressors. As mentioned above, rgs-CaM was shown to interact with viral suppressors via their positively charged dsRNA-binding domains [4]. This interaction was reported to be mediated by electrostatic interactions [4], a distinctive feature compared to classical CaMs that usually bind to their target proteins through hydrophobic interactions [6,7]. In this regard, the crucial roles of electrostatic interactions in the cooperativity of calcium binding and in protein aggregation have been highlighted by several studies [8–11].

This peculiar characteristic of rgs-CaM in comparison to other CaMs suggests that rgs-CaM may exhibit unique structural proprieties. In addition, as highlighted by Tadamura et al. [5], rgs-CaM is the only known CML protein able to bind to exogenous targets. In contrast, classical CaMs interact with endogenous targets using canonical helix-loop-helix EF-hand motifs for Ca²⁺ binding [12].

* Corresponding author.

E-mail addresses: igmaia@ibb.unesp.br, igmaia1@gmail.com (I.G. Maia).

¹ These authors contributed equally to this work

These EF-hands frequently occur in pairs and most CaMs possess two, four or six EF-hands [12].

The structure of CaMs is generally well conserved and presents N- and C-terminal globular lobes linked by a central alpha helix [13]. Each lobe possesses two EF-hand motifs containing a Ca^{2+} -binding loop composed of a cluster of 12 amino acid residues that usually starts with an Asp and ends with a Glu. Residues essential for Ca^{2+} binding coordination within this cluster are in positions 1, 3, 5, 7, 9 and 12, respectively [12,14].

In this study, we examined the Ca^{2+} binding properties of rgs-CaM in order to learn more about its functionality. For this, the tobacco rgs-CaM was expressed in *Escherichia coli* and purified. Subsequently, the binding affinities and possible conformational changes associated with Ca^{2+} binding to recombinant rgs-CaM were investigated using different biophysical and computational approaches (circular dichroism, isothermal titration calorimetry, molecular modeling and molecular dynamics simulations).

2. Materials and methods

2.1. Construction of the rgs-CaM expression vector

The cDNA encompassing the open reading frame of tobacco rgs-CaM (accession number AF329729) was amplified by RT-PCR using total RNA extracted from leaves of *N. tabacum* SR1 and gene-specific primers supplemented with the restriction sites for *Nde*I and *Xho*I (5'-GGCCATATGTGCATGGAATCAGTTTC-3' and 5'-CTACTCGAGACTTGTCATCATAGCTTTGAAC-3'; sites underlined). The amplified fragment was gel-purified and cloned into the *Nde*I- and *Xho*I-digested expression vector pET-28a (Novagen). The resulting construct was sequenced and subsequently inserted into *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-pRIL cells (Stratagene) for expression.

2.2. Expression and purification of recombinant his-tagged rgs-CaM

Transformed *E. coli* cells were grown overnight at 37°C in Luria-Bertani medium supplemented with 100 mg/l kanamycin and 50 mg/l chloramphenicol. The culture was diluted (1:100) in the same medium and grown at 37°C to an OD_{600} of 0.7, followed by addition of 1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) and induction for 4 h at 28°C. The harvested cells were resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.25% Tween 20, 1 mM EDTA and 1 mM PMSF) supplemented with lysozyme (1 mg/ml), RNase A (1 μ g/ml) and DNase I (10 u/ml). After breaking the genomic DNA by sonication (6 $\times$ 30 s), the suspension was centrifuged (20,000 $\times$ g for 30 min at 4°C). The pellets of inclusion bodies were washed twice in buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, and 100 mM NaCl), and solubilized (30 min at 4°C) by addition of buffer A containing 1% sodium dodecyl sulfate (SDS). The recombinant protein was then refolded in the presence of 2 M 2-methyl-2,4-pentandiol (MPD) [15,16]. For this, the samples were incubated at 4°C for 24 h under gentle agitation. Subsequent purification of recombinant His-tagged rgs-CaM (rgs-CaM:His) was performed by affinity chromatography using Ni-NTA columns pre-equilibrated with buffer A (plus 1% SDS and 2 M MPD) as recommended by the manufacturer (Qiagen), followed by size exclusion chromatography using Superdex 75 10/300 GL columns (GE Healthcare) that were equilibrated with buffer A containing 2 M MPD. All columns were linked to a high-performance liquid chromatography system (AKTA Purifier 900; GE Healthcare) and a flow rate of 0.5 ml/min was used. Fractions containing recombinant rgs-CaM:His were checked by standard SDS-PAGE (0.1% SDS, 12% polyacrylamide), stained with Coomassie blue, and also by western blot using a monoclonal anti-polyHistidine antibody (Sigma) and the ECL Western Blot-

ting Analysis System as recommended by the manufacturer (GE Healthcare). Protein concentration was determined by absorbance at 280 nm in a NanoDrop 2000C spectrophotometer (Thermo Scientific), using theoretical molecular weights and extinction coefficients provided by the *in silico* ProtParam tool available on the Expasy web server (<http://web.expasy.org/protparam>) [17].

2.3. Semi-denaturing mobility-shift assays

The semi-denaturing mobility-shift assay was performed essentially as described [18] using 3 μ g of recombinant rgs-CaM in buffer A (containing 2 M MPD) supplemented with either 5 mM CaCl_2 or 5 mM ethylene glycol bis(beta-aminoethyl ether)-N,N'-tetraacetic acid (EGTA). The samples were incubated at 4°C for 30 min and suspended without boiling in sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS, 10% glycerol) devoid of β -mercaptoethanol. Each protein sample was subsequently electrophoresed on a precast 16% polyacrylamide gel containing no SDS (ECL Precast Gel; GE Healthcare). The gel was stained with Coomassie blue.

2.4. Circular dichroism (CD) spectroscopy

CD measurements were obtained over the spectral range of 200–260 nm using a JASCO J-815 spectropolarimeter (JASCO Spectroscopic Co. Ltd., Japan) equipped with a Peltier thermo-controller. The assays were carried out at 293 K using an optical path length of 0.5 nm, a scanning speed of 100 nm/min, response time of 1 s, band width of 2 nm and data pitch of 0.5 nm. Twenty spectra were acquired, averaged and corrected for the buffer solution (baseline) and then normalized to residual molar ellipticity [θ]. Previously to CD measurements, rgs-CaM was treated with excess of EGTA to remove possible residual Ca^{2+} bound to its structure, and the solution was subsequently dialyzed against buffer A (containing 2 M MPD). The effect of Ca^{2+} in CD spectra was also evaluated by the addition of 5 mM CaCl_2 to the protein sample, in the absence or presence of 5 mM EGTA. Buffer A plus MPD, CaCl_2 and EGTA gave negligible signals at the concentrations tested and were included in baseline measurements.

2.5. Isothermal titration calorimetry (ITC)

The thermodynamic parameters of the interaction between rgs-CaM and calcium ions were determined at 25°C in buffer A, using an isothermal titration calorimeter (MicroCal ITC₂₀₀, GE Healthcare). Prior to the ITC assays, rgs-CaM was treated with excess EGTA to remove possible residual Ca^{2+} bound to its structure, and the solution was subsequently dialyzed against the buffer used in the titration to remove EGTA from the final solution. For a typical Ca^{2+} titration, 0.2 mM of recombinant rgs-CaM was placed in the reaction cell (200 μ l) and a 10 mM Ca^{2+} solution was loaded into the ITC syringe. Each 2.5 min, 2 μ l of Ca^{2+} solution was injected into the reaction cell. Ca^{2+} heat of dilution/mixing were determined in separate control assays and were subtracted from the corresponding titrations. For the stoichiometry (*N*), dissociation constants (K_d), enthalpy (ΔH), and binding-type input parameters were adjusted to obtain the best fitting model. The values of K_d and ΔH were used to calculate the change in free energy (ΔG) and entropy (ΔS) of Ca^{2+} binding.

2.6. Modeling and molecular dynamics (MD) simulations

According to the data obtained from the based-threading method program HHPred (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>) [19] (score: 169.12; e-value: 2.1e-32; identity: 33%), the crystal structure at 1.0 Å resolution of a CaM from *Paramecium tetraurelia* [Protein Data Bank (PDB) ID: 1EXR] was selected as

the best template for initial *in silico* rgs-CaM structural modeling. Besides, the crystallographic structures of CaMs from *Saccharomyces cerevisiae*, *Physarum polycephalum*, *Entamoeba histolytica*, *Kluyveromyces lactis*, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Homo sapiens* (PDB IDs, respectively, 3FWD, 2B10, 4OCI, 4DS7, 3QRX and 2OBH) were also identified as putative templates. However, their crystal structures presented lower resolution values and shared limited sequence identity with the rgs-CaM primary sequence (lower than 28%).

The initial *in silico* model of the rgs-CaM structure was generated using the program MODELLER v.9.10 [20]. Since the first 47 N-terminal residues of rgs-CaM possess no homology with any CaM structure deposited in PDB, they were not included in the model. Calcium ions were modeled at the four putative Ca^{2+} -binding loops of the rgs-CaM structure and the generated model (called rgs-CaM+Ca-A-B-C-D) was submitted to MD simulations using the program package GROMACS (Groningen Machine for Chemical Simulation) v.4.5.3 [21] in the presence of explicit water molecules. Protonation states of charged groups were set according to pH 7.0. Counter ions were added to neutralize the system and the GROMOS 96 53a6 force field [22] was chosen to perform the MD simulations. The minimum distance between any atom of the protein and the box wall was 1.0 nm.

In the next step, four additional models were generated removing one (rgs-CaM-Ca-A-B-D model), two (rgs-CaM+Ca-A-D), three (rgs-CaM+Ca-C) and four (apo-rgs-CaM) calcium ions from the four putative Ca^{2+} -binding loops as found in the CaM of *P. tetraurelia* used as model. The letters A, B, C and D denote the presence of calcium in the corresponding Ca^{2+} -binding loops. For all models, energy minimization (EM) using steepest descent algorithm was performed to generate the starting configuration of the system. After this step, 200 ps of MD simulation with position restraints applied to the protein (PRMD) was executed to gently relax the system. All the MD simulations were carried out in a periodic truncated dodecahedron box under constant temperature (298 K) and pressure (1.0 bar) maintained by the coupling to an external heat and an isotropic. Then, 200 ns for the rgs-CaM+Ca-A-B-D model and 100 ns for the remaining models of unrestrained MD simulations were calculated to evaluate the stability of all the structures generated. The overall quality of all *in silico* models obtained after MD simulation was checked using RAMPAGE [23] and ProSA-web (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>). The average root mean square fluctuations (RMSF) of the backbone atoms from the final models were calculated and converted to B-factor values using GROMACS v.4.5.3 [21] (Suppl. Fig. 1). The same program was used to calculate the radius of gyration (Rg) of each model during MD simulation. The electrostatic potential surfaces of the *in silico* models were generated by APBS (Adaptive Poisson-Boltzmann Solver) electrostatic calculations at 150 mM NaCl with a probe size of 1.4 Å on Chimera v.1.9 [24], after the conversion of the PDB file into a PQR file (pH 7.0) using the online server PDB2PQR with the PARSE force field [25]. All structural figures were generated using Chimera v.1.9 [24] and PyMOL v.1.3 [26].

3. Results

3.1. Expression and purification of soluble rgs-CaM

Expression of the His-tagged rgs-CaM in *E. coli* resulted in a polypeptide with an apparent molecular mass of 21 kDa (Fig. 1A), which was present in the insoluble inclusion body fraction (Fig. 1B). After several unsuccessful attempts of solubilization in non-denaturing conditions, the inclusion bodies were solubilized using SDS and the recombinant protein was refolded in the presence of the amphipathic solvent MPD. MPD has been successfully used

in the refolding of SDS-denatured proteins avoiding disruption of the protein structure [15,16]. After refolding, the recombinant rgs-CaM was further purified using a combination of metal affinity chromatography on a Ni-NTA column and size exclusion chromatography (Fig. 1C). Purification resulted in a single band of 22 kDa, visible on SDS-PAGE, which is close to the estimated molecular mass of native rgs-CaM (21 kDa). Purified rgs-CaM was further recognized by a His-tag monoclonal antibody in western blot analysis, thus confirming correct fusion. It should be noted that the His-tag was not removed from purified rgs-CaM for subsequent analyses.

3.2. Secondary structural predictions using CD spectroscopy

The structural integrity of the refolded rgs-CaM was checked using CD spectroscopy. The resulting CD spectrum displayed minimum values around 208 and 222 nm, indicating a structured conformation (Fig. 2A). These two minima are typically observed in proteins with significant alpha-helical content, which is the case of plant CaMs [27]. To characterize a possible conformational change of rgs-CaM upon Ca^{2+} binding, CD spectra were further recorded in the presence of 5 mM CaCl_2 and after the addition of 5 mM EGTA. As shown in Fig. 2B, the addition of Ca^{2+} to rgs-CaM promoted a slight increase in molar ellipticity at 222 nm. In contrast, no spectral changes were detected in the presence of EGTA as compared to purified rgs-CaM (apo-rgs-CaM). A modest effect on the CD spectrum after Ca^{2+} addition was also observed for two CMLs from *Arabidopsis thaliana* (designated CML42 and CML43) [28,29]. However, for both proteins, the observed effect was attributed to a helix reorientation rather than to an increase in alpha helix content after Ca^{2+} binding [28,29].

3.3. Calcium promotes a shift in rgs-CaM mobility

Calcium ions have been reported to alter the electrophoretic mobility of Ca^{2+} -binding proteins by promoting faster migration compared to proteins maintained in a Ca^{2+} -free state [30,31]. We therefore tested the effect of Ca^{2+} on the migration of recombinant rgs-CaM using a semi-denaturing mobility-shift assay. When CaCl_2 was added to rgs-CaM just before electrophoresis, a faster migration of CaCl_2 -treated rgs-CaM as compared to purified rgs-CaM was noted (Fig. 3). In contrast, no shift was observed when EGTA was added to the protein sample containing 5 mM CaCl_2 . In this case, the EGTA-treated rgs-CaM migrated similarly to purified rgs-CaM.

3.4. ITC results indicate the presence of three Ca^{2+} -binding sites in rgs-CaM

A typical set of ITC data for Ca^{2+} interaction with rgs-CaM is shown in Fig. 4. Higher and lower panels show the raw calorimetric data for the Ca^{2+} -into-rgs-CaM titration and the binding isotherm, respectively. Based on primary sequence analyses (Fig. 5), a sequential four-binding site model was used to fit ITC data as previously described [29,32,33]. In this regard, the resulting calorimetry data was best fitted by the three Ca^{2+} -binding site model (Table 1 and Fig. 4), which presented the lower chi-square value (128.8) compared to the two- and four-binding site models (162.0 and 198.8, respectively). This is in line with a previous assumption suggesting the existence of only three Ca^{2+} -binding sites in rgs-CaM [2]. It should also be emphasized that the interaction of rgs-CaM with Ca^{2+} displayed a negative enthalpy change, indicative of an exothermic binding event (Table 1).

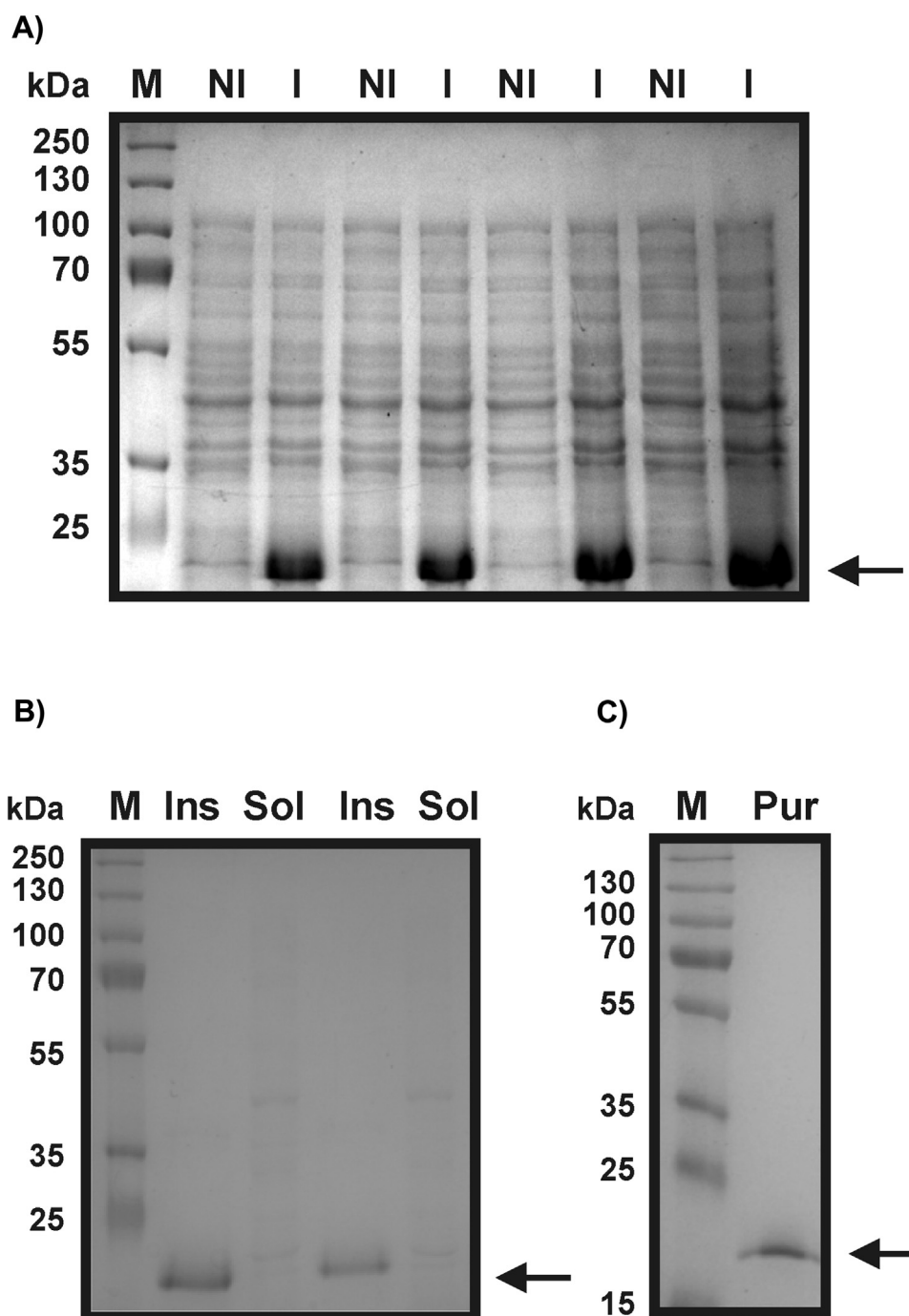


Fig. 1. Expression in *E. coli* and purification of recombinant tobacco rgs-CaM. A) Total cell extracts of non-induced (lanes NI) or IPTG-induced (lanes I) bacteria expressing rgs-CaM (different clones are shown). B) Analysis of the solubility of recombinant rgs-CaM. Ins and Sol denote insoluble and soluble fractions, respectively, resulting from centrifugation of sonicated cells. C) Purified His-tagged rgs-CaM after size exclusion chromatography. All samples were subjected to 12% SDS-PAGE. M- Molecular mass standard in kDa (PageRuler Plus Ladder 10–250 kDa; Fermentas). Gels were stained with Coomassie Brilliant Blue.

3.5. Primary sequence comparisons and homology modeling highlights the presence of three Ca^{2+} -binding sites in rgs-CaM

A search for proteins structurally related to rgs-CaM using the HHpred server revealed structural similarity to CaMs from *K. lactis* (PDB ID: 4DS7), *P. tetraurelia* (PDB ID: 1EXR) and *H. sapiens* (PDB ID: 3OX6). Inspection of the primary structure alignment (Fig. 5A) revealed that only three out of the four putative Ca^{2+} -binding loops of rgs-CaM (indicated as A, B and D) have a canonical 12-residue Ca^{2+} -binding loop sequence signature [D-X-Y-X-Y-G-X- Ψ -X-X-X-E, where Y indicates either D or N residues, and Ψ indicates a

hydrophobic residue] [12]. On the other hand, loop C showed no conservation of D/N residues at positions 1, 3 and 5, and of E at position 12, therefore suggesting possible non-functionality (Fig. 5A). Further comparative information about these loops is provided by the alignment (Fig. 5B) of rgs-CaM with CML42 and CML43 from *A. thaliana* that also possess only three Ca^{2+} -binding sites [28,29].

To obtain further structural insights into the Ca^{2+} coordination of rgs-CaM, we generated *in silico* models for apo-rgs-CaM and for rgs-CaM loaded with four (rgs-CaM+Ca-A-B-C-D), three (rgs-CaM+Ca-A-B-D model), two (rgs-CaM+Ca-A-D model) and one (rgs-CaM+Ca-C model) Ca^{2+} ions (Table 2; Fig. 6A and B). The *in sil-*

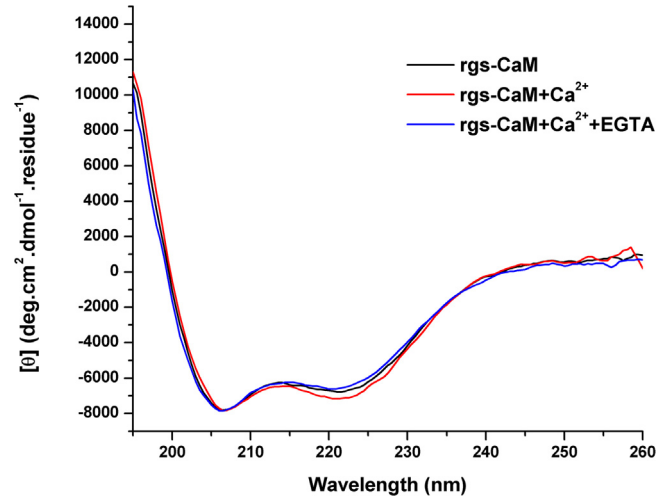


Fig. 2. Far-UV circular dichroism spectra of recombinant rgs-CaM in apo state (black), in the presence of 5 mM CaCl₂ (red) and after subsequent addition of 5 mM EGTA (blue). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

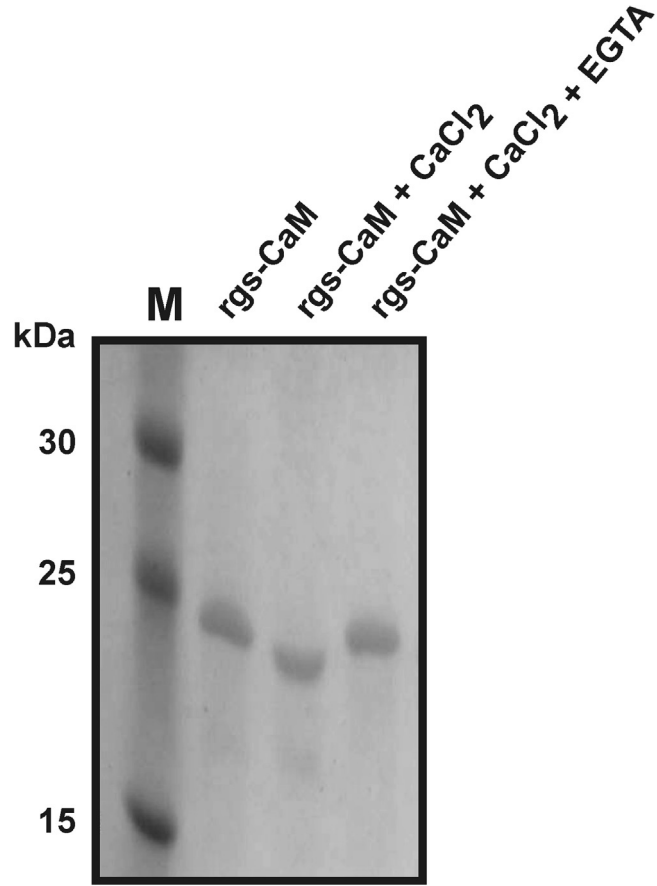


Fig. 3. Effects of Ca²⁺ on the electrophoretic mobility of recombinant rgs-CaM. The protein samples analyzed by CD (as described in the legend of Fig. 2) were subjected to PAGE (16%) under semi-denaturing conditions. A faster migration of rgs-CaM in the presence of CaCl₂ (5 mM) was observed. M: Molecular mass standard in kDa (PageRuler Plus Ladder 10–250 kDa; Fermentas). The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue.

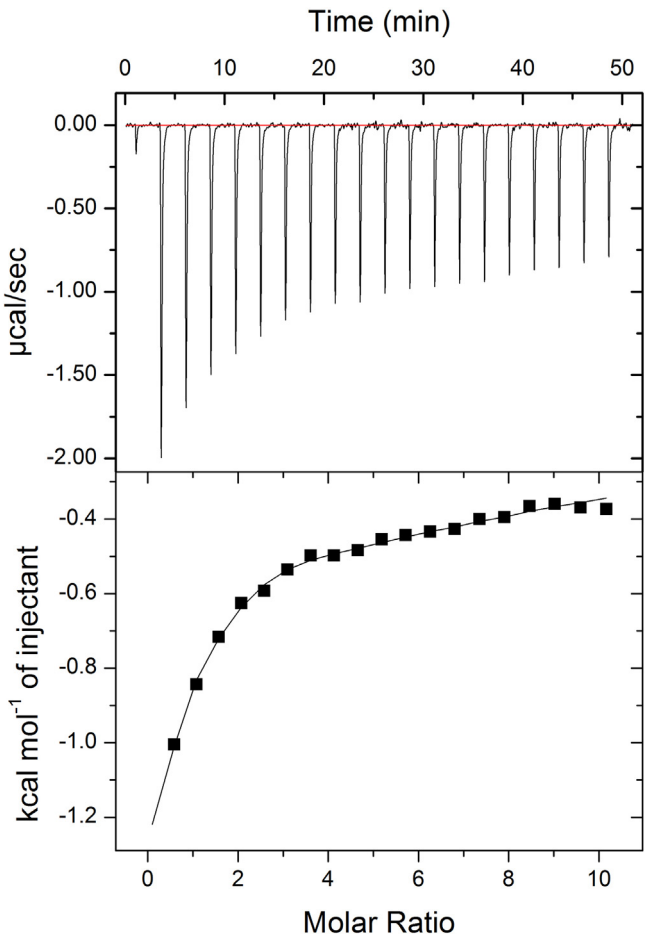


Fig. 4. Isothermal calorimetric data of Ca²⁺ binding to rgs-CaM. The top panel shows the raw power output (μcal/s) per unit time (min). Bottom panel shows the integrated data (kcal/mol of injectant versus molar ratio of Ca²⁺ to rgs-CaM). These data were obtained from the raw power output as the area underneath each peak, which is then corrected for baseline heat injections and Ca²⁺ dilution heat and mixing. The solid line represents the best fit of the data to the sequential 3 binding site model.

Table 1
Thermodynamic parameters of Ca²⁺-binding to rgs-CaM obtained from ITC analysis.

Binding Site	K _d (M)	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol/deg)
1	(1.27 ± 0.07) × 10 ^{−4}	−2.10 ± 0.07	10.8
2	(7.87 ± 0.42) × 10 ^{−5}	0.32 ± 0.09	19.8
3	(1.02 ± 0.05) × 10 ^{−2}	−31.61 ± 1.31	−96.9

ico models confirmed that rgs-CaM, as classical CaMs, has N- and C-terminal globular lobes (with two putative Ca²⁺-binding loops each) separated by a central helix of 26 residues (Fig. 6). Moreover, all models showed an overall good quality, as evaluated by the distribution of residues in favored and allowed regions of the Ramachandran plot and by Z-score of ProSA-web [34] (Table 2). These models were deposited in the ModelArchive public database [35], and their Digital Object Identifier (DOI) are available in Table 2. Interestingly, along the MD simulations of the rgs-CaM+Ca-A-B-C-D model, all Ca²⁺ ions remained coordinated in their loops, with the exception of the one present in loop C (Fig. 6A). The same feature was observed when Ca²⁺ was loaded only on loop C (rgs-CaM+Ca-C model), suggesting that this loop is unable to coordinate Ca²⁺. These results are consistent with the aforementioned sequence alignment predictions and ITC data, thus indicating that rgs-CaM, unlike classical CaMs, has only three sites of Ca²⁺ coordination, namely loops A, B and D.

Table 2Overall quality, radius of gyration (Rg) and Digital Object Identifiers of rgs-CaM *in silico* models deposited on ModelArchive public database.

Model	Z-score ^a	Residues in allowed and favored regions (%) ^b	Rg (nm) ^c	DOI ^d
apo-rgs-CaM	−7.4	100	1.7	ma-asrjx
rgs-CaM+Ca-A-B-C-D	−5.6	98.6	2.3	ma-a9cbt
rgs-CaM+Ca-A-B-D	−5.4	96.4	2.3	ma-awfwa
rgs-CaM+Ca-A-D	−6.1	98.9	2.2	ma-a2nix
rgs-CaM+Ca-C	−4.7	99.3	1.8	ma-aborg

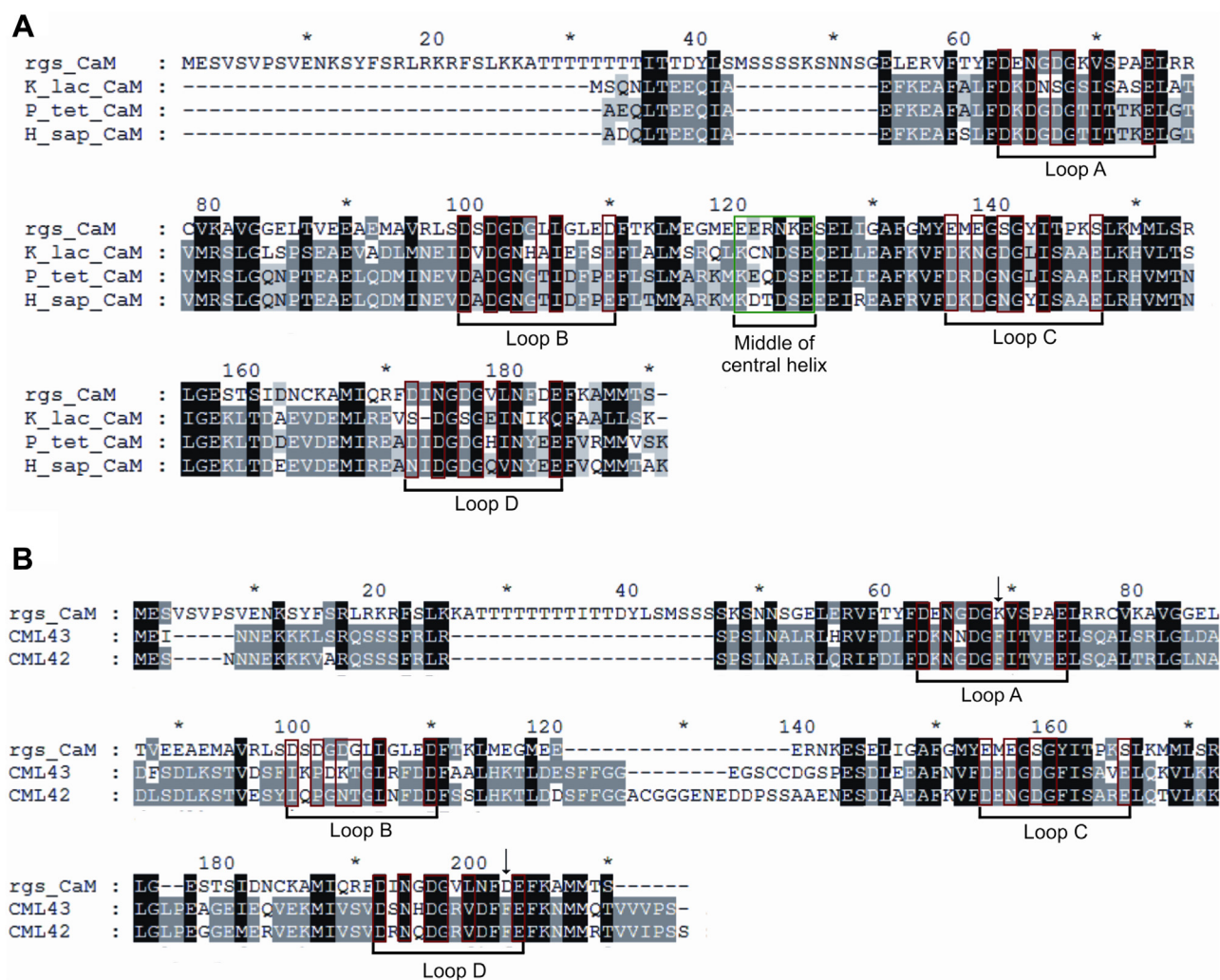
^a Calculated by ProSa-web [27].^b According to Ramachandra plot calculated by RAMPAGE [17].^c Calculated by GROMACS v.4.5.3 [15].^d Digital object identifier (DOI) of the *in silico* structure deposited on ModelArchive [33] public database.

Fig. 5. Multiple amino acid sequence alignments. (A) Alignment of rgs-CaM with homologous structures identified by the HHpred server. K.lac.CaM: Calmodulin from *K. lactis* NRRL Y-1140 (PDB ID 4DS7); P.tet.CaM: Calmodulin from *P. tetraurelia* (PDB ID 1EXR) and H.sap.CaM: Human calmodulin (PDB ID 3OX6); (B) Alignment of rgs-CaM with CML42 (GI: 75337714) and CML43 (GI: 75333888) from *A. thaliana*. The putative Ca²⁺ binding-loops are designated A, B, C and D. Red boxes highlight the amino acids of the canonical 12-residue Ca²⁺-binding loops seen in CaM [D-X-Y-X-Y-G-X-Ψ-X-X-X-E, where Y indicates D/N residues, and Ψ indicates a hydrophobic residue]. The green box highlights the flexible region of the central helix observed in Ca²⁺-bound structures. Superior arrows in panel B indicate the hydrophobic amino acid substitutions observed in loops A and D of rgs-CaM in relation to the CML sequences. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

3.6. *In silico* models of Ca²⁺-bound rgs-CaM detected an expansion on its tertiary structure with exposition of a large negatively charged surface

It has been previously reported that Ca²⁺-bound CaMs have a more expanded tertiary structure than their apo counterparts [13,36]. In this regard, we found that the removal of all Ca²⁺ resulted in a more compact rgs-CaM model compared to the one loaded

with three Ca²⁺. This observation was well correlated with the Rg values of both apo and four calcium-containing rgs-CaM models (1.7 nm versus 2.3 nm; Table 2). Thus, the loading of Ca²⁺ into loops A, B and D promoted an expansion of the tertiary structure of rgs-CaM, as already reported for CaMs [37]. α superposition of the central helix of the rgs-CaM+Ca-A-B-C model over the central helix of the apo-rgs-CaM model clearly illustrates this expansion. In this case, a different reorientation of the EF-hand helices

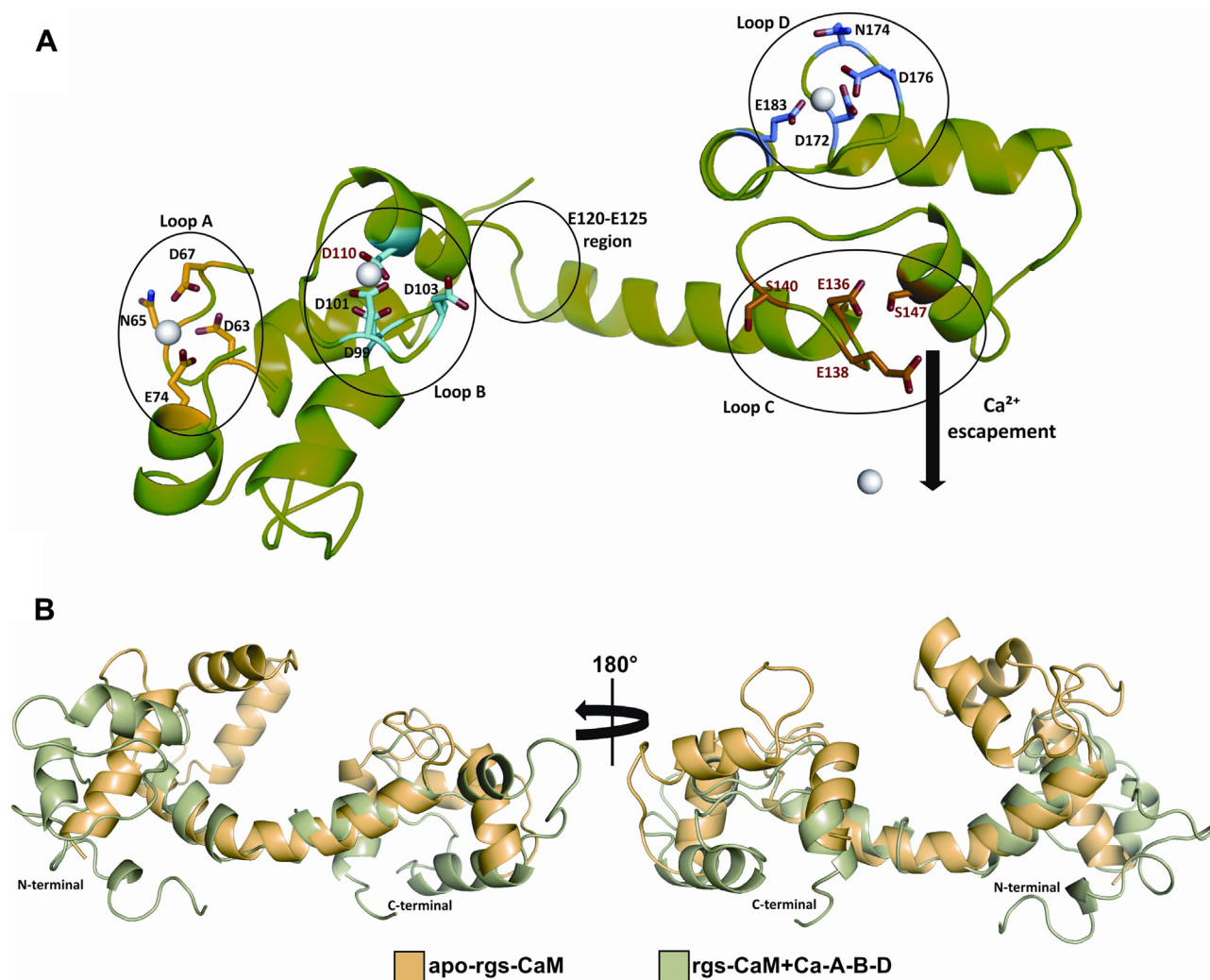


Fig. 6. *In silico* modeling of rgs-CaM. (A) Cartoon representation of the final rgs-CaM model with Ca²⁺ modeled in the four predicted Ca²⁺-binding loops (rgs-CaM+Ca-A-B-C-D model). The residues predicted to coordinate Ca²⁺ in rgs-CaM are represented by sticks. Along the MD simulations, the Ca²⁺ in loop C escaped from the loop whereas the other ions remained coordinated in the other loops. The flexible region near the middle of the central helix (E120-E125) is also highlighted. (B) Cartoon representation of C α superposition of the central helix of rgs-CaM+Ca-A-B-D (green) over apo-rgs-CaM (yellow) showing the expansion of rgs-CaM tertiary structure and the different reorientations of the helices within the EF-hands upon Ca²⁺ binding. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

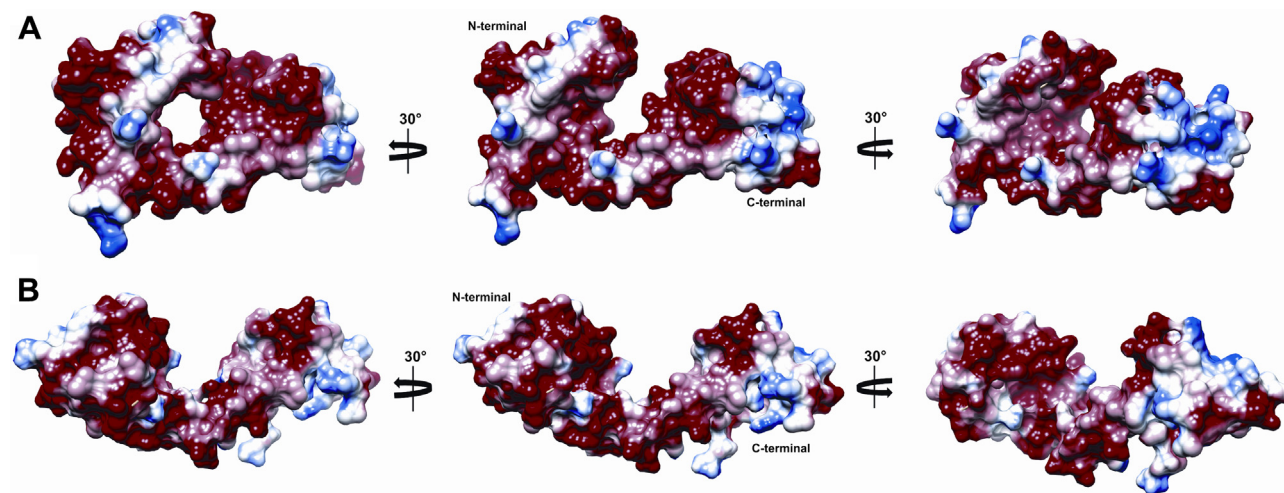


Fig. 7. Electrostatic potential surfaces of the *in silico* models. (A) apo-rgs-CaM and (B) rgs-CaM+Ca-A-B-D. Both structures are shown in the same orientation after C α superposition. The electrostatic potential surfaces were generated by APBS (Adaptive Poisson-Boltzmann Solver). Red and blue colored regions denote negative and positive charges, respectively. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

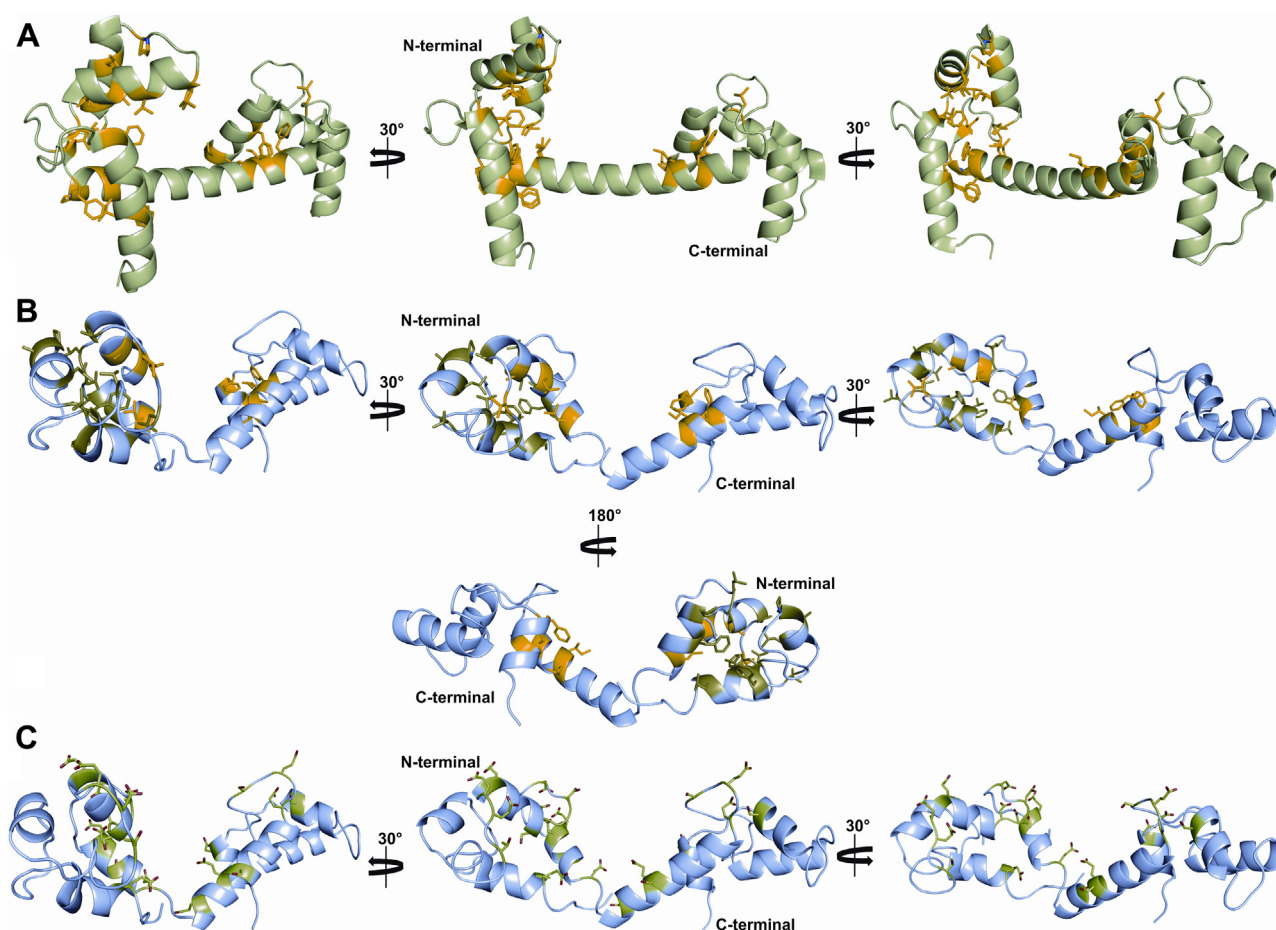


Fig. 8. Structural comparisons between the *P. tetraurelia* CaM (PDB ID 1EXR) and the rgs-CaM + Ca-A-B-D model. (A) Cartoon representation of crystallographic structure of *P. tetraurelia* CaM with hydrophobic residues (Ala, Ile, Leu, Phe, Pro and Val) exposed to the solvent after Ca^{2+} -binding (highlighted as yellow sticks). (B) Cartoon representation of the rgs-CaM+Ca-A-B-D model with hydrophobic residues exposed to solvent after Ca^{2+} -binding (highlighted as yellow sticks). The hydrophobic residues buried into the N-terminal globular lobe are highlighted as green olive sticks. (C) Cartoon representation of the rgs-CaM+Ca-A-B-D model with negatively charged residues (Asp, Glu, Ser and Thr) exposed to the solvent after Ca^{2+} -binding (highlighted as light green sticks). The figure was generated using PyMOL v.1.3 [22]. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

between apo- and calcium-containing models could be observed (Fig. 6B). Interestingly, when Ca^{2+} was loaded into loops A and D but not B (rgs-CaM-A-D model), rgs-CaM adopted an expanded tertiary structure conformation showing an Rg value around 2.3 nm (Table 2).

Along the MD simulations of the rgs-CaM models with Ca^{2+} loaded into, at least, loops A and D (rgs-CaM+Ca-A-B-D and rgs-CaM+Ca-A-D models), a region near the middle of the central helix (E120 through E125 as denoted in Fig. 5A) presented great mobility, adopting even a disordered secondary structure at the end of the majority of the simulations (Fig. 6A). This flexibility confers to the central helix a bendable joint on its center that probably contributes to the reorientation of the EF-hands to become more solvent-exposed in the Ca^{2+} -bound models (Fig. 6B). In contrast, in MD simulations of apo-rgs-CaM, this region remained stable during all 100 ns simulations. The deduced amino acid sequence alignments revealed that the E120–E125 region of rgs-CaM is analogous to the K77–S81 region of classical CaMs (Fig. 5A), which is also located in the middle of the central helix and has a high degree of mobility as previously shown by NMR assays [37].

Another typical feature of classical CaM is the exposure of a significant amount of non-polar surface area upon expansion of its tertiary structure [37,38]. This solvent-exposed area results in a hydrophobic pocket that serves as a target interaction site [32]. In this context, Nakahara et al. [4] reported previously that rgs-

CaM can interact with the 2b suppressor of *Tomato aspermy virus* by electrostatic interactions, thus contrasting with classical CaMs that usually use hydrophobic patches to interact with their targets [6,7]. In fact, a comparative analysis of the electrostatic potential surfaces of the apo-rgs-CaM and rgs-CaM+Ca-A-B-D models in the same orientation revealed that the Ca^{2+} -induced conformational expansion leads to the exposure of a negatively charged region (Fig. 7). This anionic area is located mainly on the N-terminal globular lobe and is complemented by some portions of the central helix and C-terminal lobe, thus forming a large and negatively charged pocket. A careful comparison between the crystallographic structure of the Ca^{2+} -bound CaM from *P. tetraurelia* (PDB ID: 1EXR) and the rgs-CaM+Ca-A-B-D model reveals a different distribution of the conserved hydrophobic residues on these structures (Fig. 8). In the CaM from *P. tetraurelia*, the surface-exposed hydrophobic residues are located mainly on the N-terminal globular lobe and in some portions of the central helix and C-terminal lobe (Fig. 8A). In contrast, the corresponding regions of the rgs-CaM+Ca-A-B-D model have fewer solvent-exposed hydrophobic residues and contain several negatively charged residues (Fig. 8C). This is especially true for the N-terminal lobe in which the majority of the residues are buried into the EF-hand structure (Fig. 8B). These negative residues comprise the anionic pocket that could be responsible for the interaction of rgs-CaM with the dsRNA-binding domains of viral suppressors.

4. Discussion

Rgs-CaM is a CaM-related protein involved in the dynamic interplay between viruses and plants. Conflicting results from different groups suggest that rgs-CaM could target viral suppressors for autophagic degradation [4] or interact with them having a positive effect on suppressor activity [3]. Earlier homology modeling studies demonstrated that rgs-CaM possesses two predicted EF-hand motifs separated by a negatively charged cleft [4]. Despite the presence of these predicted EF-hands, the ability of rgs-CaM to bind Ca^{2+} and its effective role as a Ca^{2+} sensor remain elusive.

In this regard, our CD spectral data revealed that rgs-CaM is sensitive to Ca^{2+} binding, but only modest effects on its overall secondary structure are detected upon binding (Fig. 2). Our results using EGTA in CD measurements and mobility shift assays showed that Ca^{2+} binding to rgs-CaM is a reversible process. Moreover, by generating structural *in silico* models for calcium-free and calcium-bound rgs-CaM (Fig. 6B; Table 2), we found that rgs-CaM structure undergoes a calcium-induced expansion and reorientation of the alpha-helices within the EF-hands (Fig. 6B; Table 2). This conformational change is commonly observed in classical CaMs [37]. The reorientation of the helices leads to exposure to the solvent of a large EF-hand area that could be responsible for the slight increase in molar ellipticity at 222 nm detected upon Ca^{2+} addition to rgs-CaM (Fig. 2), as previously observed for CML43 [28]. Additionally, in our Ca^{2+} -bound rgs-CaM models, a higher flexibility near the middle of the central helix along the MD simulations was noted, a feature that probably contributes to the EF-hand rearrangements.

Our ITC data indicate that rgs-CaM has only three functional Ca^{2+} -binding sites. This was further supported by the information gleaned from amino acid sequence predictions and by inspection of the rgs-CaM models generated *in silico*. Collectively, our results indicate that loop C in the C-terminal EF-hand of rgs-CaM is unable to bind calcium. Remarkably, this loop shows no conservation of the residues typically found in canonical Ca^{2+} -binding loops of classical CaMs (Fig. 5A). Bender et al. [28] reported that *A. thaliana* CML43, which acts as a Ca^{2+} sensor, also possesses only three functional Ca^{2+} -binding loops. One of them has high Ca^{2+} affinity [dissociation constants (K_d) of 8.16 nM] and is supposed to play a structural role, whereas the two remaining loops have moderate Ca^{2+} affinity ($K_d = 4.85 \mu\text{M}$) and are supposed to be regulatory. In contrast to rgs-CaM, the non-functional loop of CML43 (loop B) is located in the N-terminal EF-hand and shows no conservation of the residues involved in Ca^{2+} coordination (Fig. 5B).

According to the ITC results, rgs-CaM has two Ca^{2+} -binding sites (sites A and D) with moderate Ca^{2+} affinity ($K_d = 78.7 \mu\text{M}$ and $127 \mu\text{M}$, sites 1 and 2 in Table 1), and a third one (B) with low Ca^{2+} affinity ($K_d = 10.2 \text{ mM}$; site 3 in Table 1). This moderate/low Ca^{2+} affinity may be attributed to the substitution of conserved hydrophobic residues within the EF-hands, especially in loops A and D (Fig. 5B). Surprisingly, despite the fact that rgs-CaM possesses several features of a Ca^{2+} sensor, as indicated by our structural data, the K_d values determined by ITC are not within the affinity range of a typical Ca^{2+} sensor ($1\text{--}0.1 \mu\text{M}$) [12]. This fact, however, does not preclude the role of rgs-CaM as a sensor since its Ca^{2+} affinity may be increased in the presence of its target viral suppressor. This phenomenon has already been reported for other known CaMs [12]. In mammals, for example, the affinity of CaM for Ca^{2+} was increased 25-fold in the presence of its interacting protein [38]. Interestingly, basal cytosolic levels of Ca^{2+} (about 100 nM) [12,39] were insufficient to induce important structural changes in rgs-CaM. It seems therefore likely that the observed expansion in rgs-CaM structure could be triggered by transitory increases in cytosolic Ca^{2+} levels as would be expected during pathogen attack. Consistent with this, previous studies have shown that rgs-CaM is widely expressed immediately after wounding [5], a stress that occurs simultane-

ously to virus invasion and is also reported to alter Ca^{2+} homeostasis [40].

Of note, the thermodynamic results relative to sites A and D (sites 1 and 2 in Table 1), revealing small enthalpy and large positive entropy changes, corroborate the observed Ca^{2+} -dependent conformational modification [12]. Concerning site B (site 3 in Table 1), despite its low Ca^{2+} affinity, this site showed a large and exothermic enthalpy and an unfavorable binding entropy in calorimetric studies. This is consistent with the large and exothermic enthalpy observed for Ca^{2+} -binding of calbindin D_{9k} due to the dehydration of the EF-hands [11]. Most noteworthy is the fact that the absence of Ca^{2+} in site B has no impact on the expansion of the rgs-CaM tertiary structure. Accordingly, rgs-CaM adopted the same expanded conformation when Ca^{2+} was loaded into sites A and D or into the three predicted Ca^{2+} -binding sites.

Despite corroborating previous findings suggesting that rgs-CaM interacts with its targets by electrostatic interactions [4], our results provide additional information about peculiar aspects of this protein. Most importantly, we observed that the binding of two Ca^{2+} to rgs-CaM is sufficient to promote surface exposure of a large negatively charged pocket, which might be responsible for its interaction with the dsRNA-binding domains of viral suppressors.

5. Conclusions

The results obtained indicate that rgs-CaM has three putative Ca^{2+} -binding sites. However, Ca^{2+} binding to the two sites possessing higher Ca^{2+} affinity is sufficient to trigger a conformational change in an expanded structure with reorientation of the helices within the EF-hands. In addition, our structural data support the idea that rgs-CaM interacts with its targets through electrostatic interactions, thus contrasting classical CaMs that usually use hydrophobic patches [6,7]. It seems plausible that these negatively charged residues comprised within an anionic pocket might be responsible for the interaction of rgs-CaM with the dsRNA-binding domains of viral suppressors.

Author contributions

Conceived and designed the work: RKM, CAHF, MRMF and IGM. Performed the experiments: RKM, CAHF, TRD, BSM and FFM. Wrote the manuscript: MRMF and IGM with feedback from CAHF.

Acknowledgments

R. K. Makiyama was recipient of a PhD fellowship from FAPESP (2010/03001-0). C. A. H. Fernandes is recipient of a post-doctoral fellowship from FAPESP (2013/17864-8). I. G. Maia and M. R. M. Fontes are recipients of research fellowships from CNPq. Computational resources were supplied by the Center for Scientific Computing (NCC/GridUNESP) of the São Paulo State University (UNESP).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.08.016>.

References

- [1] S.W. Ding, O. Voinnet, Antiviral immunity directed by small RNA, *Cell* 130 (2007) 413–426.
- [2] R. Anandalakshmi, R. Marathe, X. Ge, J.M. Herr, C. Mau, A. Mallory, G. Pruss, L. Bowman, V.B. Vance, A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants, *Science* 290 (2000) 142–144.

- [3] F. Li, C. Huang, Z. Li, X. Zhou, Suppression of RNA silencing by a plant DNA virus satellite requires a host calmodulin-like protein to repress RDR6 expression, *PLoS Pathog.* 10 (2014) e1003921.
- [4] K.S. Nakahara, C. Masuta, S. Yamada, H. Shimura, Y. Kashiwara, T.S. Wada, A. Meguro, K. Goto, K. Tadamura, K. Sueda, T. Sekiguchi, J. Shao, N. Itchoda, T. Matsumura, M. Igarashi, K. Ito, R.W. Carthew, I. Uyeda, Tobacco calmodulin-like protein provides secondary defense by binding to and directing degradation of virus RNA silencing suppressors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 10113–10118.
- [5] K. Tadamura, K.S. Nakahara, C. Masuta, I. Uyeda, Wound-induced rgs-CaM gets ready for counterresponse to an early stage of viral infection, *Plant Signal. Behav.* 7 (2012) 1548–1551.
- [6] W.A. Snedden, H. Fromm, Calmodulin, calmodulin-related proteins and plant responses to the environment, *Trends Plant Sci.* 3 (1998) 299–304.
- [7] C. Yang, G.S. Jas, K. Kuczer, Structure, dynamics and interaction with kinase targets: computer simulations of calmodulin, *Biochim. Biophys. Acta* 1697 (2004) 289–300.
- [8] J.M. Khan, A. Qadeer, S.K. Chaturvedi, E. Ahmad, S.A. Rehman, S. Gourinath, R.H. Khan, SDS can be utilized as an amyloid inducer: a case study on diverse proteins, *PLoS One* 7 (2012) e29694.
- [9] J.M. Khan, S.A. Abdulrehman, F.K. Zaidi, S. Gourinath, R.H. Khan, Hydrophobicity alone can not trigger aggregation in protonated mammalian serum albumins, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16 (2014) 5150–5161.
- [10] J.M. Khan, S.K. Chaturvedi, S.K. Rahman, M. Ishtikhar, A. Qadeer, E. Ahmad, R.H. Khan, Protonation favors aggregation of lysozyme with SDS, *Soft Matter* 10 (2014) 2591–2599.
- [11] D. Dell'Orco, W.F. Xue, E. Thulin, S. Linse, Electrostatic contributions to the kinetics and thermodynamics of protein assembly, *Biophys. J.* 88 (2005) 1991–2002.
- [12] J.L. Gifford, M.P. Walsh, H.J. Vogel, Structures and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺-binding helix-loop-helix EF-hand motifs, *Biochem. J.* 405 (2007) 199–221.
- [13] M.A. Wilson, A.T. Brunger, The 1.0 Å crystal structure of Ca²⁺-bound calmodulin: an analysis of disorder and implications for functionally relevant plasticity, *J. Mol. Biol.* 301 (2000) 1237–1256.
- [14] Z. Grabarek, Structural basis for diversity of the EF-hand calcium-binding proteins, *J. Mol. Biol.* 359 (2006) 509–525.
- [15] C. Michaux, N.C. Pomroy, G.G. Privé, Refolding SDS-denatured proteins by the addition of amphipathic cosolvents, *J. Mol. Biol.* 375 (2008) 1477–1488.
- [16] C. Michaux, J. Pouyez, J. Wouters, G.G. Privé, Protecting role of cosolvents in protein denaturation by SDS: a structural study, *BMC Struct. Biol.* 8 (2008) 29.
- [17] E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M.R. Wilkins, R.D. Appel, A. Bairoch, Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server, in: J.M. Walker (Ed.), *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press, 2005, pp. 571–607.
- [18] D. Chiasson, S.K. Ekengren, G.B. Martin, S.L. Dobney, W.A. Snedden, Calmodulin-like proteins from Arabidopsis and tomato are involved in host defense against *Pseudomonas syringae* pv. tomato, *Plant Mol. Biol.* 58 (2005) 887–897.
- [19] J. Söding, A. Biegert, A.N. Lupas, The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction, *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) 244–248.
- [20] M.A. Martin-Renom, A.C. Stuart, A. Fiser, R. Sánchez, F. Melo, A. Salí, Comparative protein structure modelling of genes and genomes, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29 (2000) 291–325.
- [21] D. Van Der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A.E. Mark, H.J. Berendsen, GROMACS: fast, flexible, and free, *J. Comput. Chem.* 26 (2005) 1701–1718.
- [22] M. Christen, P.H. Hünenberger, D. Bakowies, R. Baron, R. Bürgi, D.P. Geerke, T.N. Heinz, M.A. Kastholz, V. Kräutler, C. Oostenbrink, C. Peter, D. Trzesniak, W.F. van Gunsteren, The GROMOS software for biomolecular simulation: GROMOS05, *J. Comput. Chem.* 26 (2005) 1719–1751.
- [23] S.C. Lovell, I.W. Davis, W.B. Arendall 3rd, P.I. de Bakker, J.M. Word, M.G. Prisant, J.S. Richardson, D.C. Richardson, Structure validation by Calpha geometry: phi, psi and Cbeta deviation, *Proteins* 50 (2003) 437–450.
- [24] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin, UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis, *J. Comput. Chem.* 25 (2004) 1605–1612.
- [25] T.J. Dolinsky, J.E. Nielsen, J.A. McCammon, N.A. Baker, PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) W665–W667.
- [26] W.S. Delano, The PyMOL molecular graphics system. Palo Alto, DeLano Scientific (2002).
- [27] S. Dash, W. Niemaczura, H.M. Harrington, Characterization of the basic amphiphilic α -helix calmodulin-binding domain of a 61.5 kDa tobacco calmodulin-binding protein, *Biochemistry* 36 (1997) 2025–2029.
- [28] K.W. Bender, S. Dobney, A. Ogunrinde, D. Chiasson, R.T. Mullen, H.J. Teresinski, P. Singh, K. Munro, S.P. Smith, W.A. Snedden, The calmodulin-like protein CML43 functions as a salicylic-acid-inducible root-specific Ca²⁺ sensor in Arabidopsis, *Biochem. J.* 457 (2014) 127–136.
- [29] S. Dobney, D. Chiasson, P. Lam, S.P. Smith, W.A. Snedden, The calmodulin-related calcium sensor CML42 plays a role in trichome branching, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 31647–31657.
- [30] M. Garrigos, S. Deschamps, A. Viel, S. Lund, P. Champeil, J.V. Moller, M. le Maire, Detection of Ca²⁺-binding proteins by electrophoretic migration in the presence of Ca²⁺ combined with 45Ca²⁺ overlay of protein blots, *Anal. Biochem.* 194 (1991) 82–88.
- [31] B. Vanderbeld, W.A. Snedden, Developmental and stimulus-induced expression patterns of Arabidopsis calmodulin-like genes CML37, CML38 and CML39, *Plant Mol. Biol.* 64 (2007) 683–697.
- [32] R. Gilli, D. Lafitte, C. Lopez, M.-C. Kilhoffer, A. Makarov, C. Briand, J. Haiech, Thermodynamic analysis of calcium and magnesium binding to calmodulin, *Biochemistry* 37 (1998) 5450–5456.
- [33] G. Wu, Z. Gao, A. Dong, S. Yu, Calcium-induced changes in calmodulin structural dynamics and thermodynamics, *Int. J. Biol. Macromol.* 50 (2012) 1011–1017.
- [34] M. Wiederstein, M.J. Sippl, Prosa-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) W407–W410.
- [35] J. Haas, S. Roth, K. Arnold, F. Kiefer, T. Schmidt, L. Bordoli, T. Schwede, The Protein Model Portal – a comprehensive resource for protein structure and model information, *Database* 2013 (2013), bat031.
- [36] M. Zhang, T. Tanaka, M. Ikura, Calcium induced conformational transition revealed by the solution structure of apo calmodulin, *Nat. Struct. Biol.* 2 (1995) 758–767.
- [37] G. Barbato, M. Ikura, L.E. Kay, R.W. Pastor, A. Bax, Backbone dynamics of calmodulin studied by N-15 relaxation using inverse detected 2-dimensional NMR-spectroscopy – The central helix is flexible, *Biochemistry* 31 (1992) 5269–5278.
- [38] B.B. Olwin, D.R. Storm, Calcium binding to complexes of calmodulin and calmodulin binding proteins, *Biochemistry* 24 (1985) 8081–8086.
- [39] S.J. Swanson, W.-G. Choi, A. Chanoca, S. Gilroy, In vivo imaging of Ca²⁺, pH, and reactive oxygen species using fluorescent probes in plants, *Annu. Rev. Plant Biol.* 62 (2011) 273–297.
- [40] T. Suntio, K. Mäkinen, Abiotic stress responses promote Potato virus A infection in *Nicotiana benthamiana*, *Mol. Plant Pathol.* 13 (2012) 775–784.