

Cristiane Cabral de Melo

**Determinação da Estrutura Cristalográfica
da Miotoxina-II Isolada do Veneno da
Serpente *Bothrops nummifer***



1910001432



Cristiane Cabral de Melo

**Determinação da Estrutura Cristalográfica
da Miotoxina-II Isolada do Veneno da
Serpente *Bothrops nummifer***



T. 1432/05

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

Orientador: Prof. Dr. Raghuvir Krishnaswamy Arni

São José do Rio Preto – 2005

548.73

C117d

07/10/2005

Doação

R\$ 21,00

Autor(a)

Cabral de Melo, Cristiane.

Determinação da estrutura cristalográfica da miotoxina-II isolada do veneno da serpente *Bothrops nummifer* / Cristiane Cabral de Melo – São José do Rio Preto: [s.n.], 2005

66 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Raghuvir Krishnaswamy Arni

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Cristalografia de raio X. 2. Fosfolipase A2. 3. Serpente - Veneno. I. Arni, Raghuvir Krishnaswamy. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 548.73

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Raghuvir K. Arni pela oportunidade e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.
- À Capes pelo apoio financeiro fornecido.
- À Dra. Fernanda Canduri, pela participação em minha banca de qualificação e pelo auxílio na correção deste trabalho.
- Ao Sandro, pelas inúmeras brigas e discussões que tivemos no início, que mais tarde se transformaram em um auxílio indispensável não só no laboratório como nas disciplinas do curso.
- Ao meu amigo Renato, que sempre esteve presente nos meus momentos mais difíceis durante esses dois anos no IBILCE.
- Aos colegas, Henrique, Márcio e Nelson, pelos primeiros ensinamentos em cristalização de proteínas e em Linux.
- Ao Prof. Dr. Walter Figueira de Azevedo Júnior, o qual me auxiliou no início da minha aprendizagem aqui neste departamento.
- À todos os professores que diretamente e indiretamente me ajudaram na elaboração deste trabalho.
- À minha família, em especial a minha tia Olga.
- Enfim, a todos os meus colegas do departamento de Física, com os quais eu tive o prazer de conviver.

ÍNDICE DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE TABELAS	III
LISTA DE ABREVIACÕES	IV
RESUMO	V
ABSTRACT	VII
 CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO.....	 1
1.1 – AS FOSFOLIPASES A ₂	1
1.2 – CLASSIFICAÇÃO	2
1.3 – MECANISMO CATALÍTICO.....	4
1.4 – AS Lys49-FOSFOLIPASES A ₂	7
 CAPÍTULO 2 – OBJETIVO.....	 9
 CAPÍTULO 3 – CRISTALIZAÇÃO DA MIOTOXINA-II.....	 10
3.1 – EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO.....	10
3.2 – CRISTALIZAÇÃO	12
 CAPÍTULO 4 – PROCESSAMENTO DOS DADOS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X.....	 14
4.1 – COLETA.....	15
4.2 – PROCESSAMENTO DOS DADOS.....	16
 CAPÍTULO 5 – OBTENÇÃO DAS FASES E REFINAMENTO	 20
5.1 – ESCOLHA DOS MODELOS	22
5.2 – SUBSTITUIÇÃO MOLECULAR	24
5.3 – REFINAMENTO DA ESTRUTURA	25
 CAPÍTULO 6 – RESULTADOS E DISCUSSÕES	 31
6.1 – DESCRIÇÃO DO MODELO CRISTALOGRAFICO.....	31
6.2 – ANÁLISE DO MODELO	38
6.3 – ATIVIDADE CATALÍTICA X ATIVIDADE MIOTÓXICA	41
6.4 – DÍMERO X MONÔMERO	46
 CAPÍTULO 7 – CONCLUSÕES.....	 50
 APÊNDICE A	 51
APÊNDICE B	58
REFERÊNCIAS.....	59

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1.1.1 : Sítios de clivagem das fosfolipases	1
Fig. 1.3.1 : Análogo do estado de transição [$\text{diC}_8(2\text{Ph})\text{PE}$].....	5
Fig. 1.3.2 : Mecanismo catalítico das fosfolipases	6
Fig. 1.3.3 : Superfície catalítica na ausência e na presença do $\text{diC}_8(2\text{Ph})\text{PE}$	7
Fig. 1.4.1 : Enovelamento de uma Lys49-fosfolipase A_2	8
Fig. 1.4.2 : Região do sítio de ligação de cálcio.....	8
Fig. 3.1.1 : Exemplar da serpente <i>Bothrops nummifer</i>	11
Fig. 3.2.1 : Esquema do método de difusão de vapor com gota suspensa.....	12
Fig. 3.2.2 : Cristal da miotoxina-II da <i>Bothrops nummifer</i> (Anum-II).....	13
Fig. 3.2.3 : Cristal da miotoxina-II da <i>Bothrops nummifer</i> (Anum-II).....	13
Fig. 4.1.1 : Padrão de difração da Anum-II	15
Fig. 4.2.1 : Indexação do padrão de difração da Anum-II	18
Fig. 5.1.1 : Alinhamento seqüencial	23
Fig. 5.3.1 : Densidade eletrônica na região correspondente ao sítio de ligação de cálcio nas Asp49- PLA_2 s	26
Fig. 5.3.2 : Densidade eletrônica dos resíduos envolvidos na interface de dimerização	27
Fig. 5.3.3 : Densidade eletrônica na região do C-terminal	28
Fig. 5.3.4 : Densidade eletrônica na posição do íon sulfato.....	29
Fig. 6.1.1 : Representação da estrutura cristalográfica da Anum-II	32
Fig. 6.1.2 : Contatos entre o C-terminal e a região correspondente ao sítio de ligação de Ca^{2+}	33
Fig. 6.1.3 : Região correspondente ao sítio de ligação de Ca^{2+} nas Asp49- PLA_2 s ...	34
Fig. 6.1.4 : Rmsd entre a Anum-II e outras Lys49- PLA_2 s.....	35
Fig. 6.1.5 : Sobreposição da Anum-II com outras Lys49- PLA_2 s.....	35
Fig. 6.1.6 : Íon sulfato proveniente do meio de cristalização.....	36
Fig. 6.1.7 : Sobreposição da Anum-II com uma Asp49- PLA_2 em complexo com o análogo do estado de transição.....	37
Fig. 6.2.1 : Diagrama de Ramachandran da Anum-II.....	38
Fig. 6.2.2 : Estatísticas geradas pelo programa PROCHECK.....	40

Fig. 6.3.1 : Sítio ativo da piratoxina-II em complexo com o ácido graxo	41
Fig. 6.3.2 : Sítio Sobreposição da Anum-II com as estruturas da piratoxina-II e da miotoxina da miotoxina da <i>Agkistrodon contortrix laticinctus</i>	43
Fig. 6.3.3 : Exposição de resíduos hidrofóbicos mostrada através da superfície de van der Waals	43
Fig. 6.3.4 : Sobreposição da Anum-II com uma Asp49-PLA ₂ em complexo com o análogo do estado de transição.....	44
Fig. 6.4.1 : Interface dimérica da miotoxina-II da <i>Bothrops asper</i>	47
Fig. 6.4.2 : Sobreposição da estrutura da Anum-II com os dois monômeros da miotoxina-II da <i>Bothrops asper</i>	48
Fig. 6.4.3 : Novo modelo de interface dimérica proposto em nosso laboratório para a miotoxina-II da <i>Bothrops asper</i>	49

CONTÍNUO DO TÍTULO DO CAPÍTULO

36

LISTA DE TABELAS

Tab. 1.2.1 : Classificação das enzimas fosfolipases A_2	3
Tab. 4.2.1 : Parâmetros e valores finais do processamento dos dados	19
Tab. 5.1.1 : Lista das fosfolipases usadas na substituição molecular	22
Tab. 5.2.1 : Melhores soluções para as funções de rotação e translação para as cinco fosfolipases utilizadas como modelo	24
Tab. 5.2.2 : Melhores soluções para as funções de rotação e translação obtidas a partir do modelo da <i>Agkistrodon acutus</i> para os dois grupos espaciais enantiomorfos $P4_32_12$ e $P4_12_12$	25
Tab. 5.3.1 : Valores dos coeficientes de confiabilidade e parâmetros estereoquímicos para a estrutura final da Anum-II	30

LISTA DE ABREVIações

Anum-II: miotoxina-II do veneno da serpente *Bothrops nummifer*

Asp49-PLA₂: fosfolipase A₂ com um aspartato na posição 49

BaspMT-II: miotoxina-II do veneno da serpente *Bothrops asper*

BPB: bromofenilacil brometo

BthTX-I: bothropstoxina-I do veneno da serpente *Bothrops jararacussu*

diC₈(2Ph)PE: L-1-O-octil-2-heptilfosfonil-*sn*-glicerol-3-fosfoetanolamina

DLS: espalhamento dinâmico de luz

Lys49-PLA₂: fosfolipase A₂ com uma lisina na posição 49

MAD: dispersão anômala múltipla

NumMT-I: miotoxina-I do veneno da serpente *Bothrops nummifer*

PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida

PEG: polietilenoglicol

PDB: banco de dados de proteínas

PLA₂: fosfolipase A₂

RMSD: desvio médio quadrático

RP-HPLC: cromatografia líquida de alta performance em fase reversa

SDS: dodecil sulfato de sódio

sn: número seqüencial

RESUMO

Fosfolipases A_2 (PLA₂ EC 3.1.1.4) são proteínas abundantes em sucos pancreáticos de mamíferos e em venenos de serpentes e insetos. Elas hidrolisam especificamente as ligações éster na posição *sn*-2 de fosfolipídios, desempenhando um papel central em diversas e importantes funções biológicas.

A atividade catalítica dessas enzimas depende da ligação de um cofator, o íon cálcio, além dos resíduos altamente conservados His48, Asp49 e Asp99. Um grupo de PLA₂s em que o resíduo Asp49 é substituído por uma lisina, tem sido isolado do veneno de serpentes da família *Viperidae*. Embora os trabalhos iniciais indicassem baixos níveis de atividade catalítica para essas enzimas, subseqüentes estudos têm falhado em detectar a hidrólise de substratos fosfolipídios. Apesar da ausência de atividade catalítica detectável, estas Lys49-PLA₂s ainda retêm a capacidade de causar danos a membranas (por um mecanismo independente da atividade hidrolítica) exibindo efeitos farmacológicos comparáveis aos apresentados pelas fosfolipases Asp49. Com o intuito de determinar as bases para tal mecanismo, nos últimos anos, muita atenção tem sido dedicada na identificação e caracterização dessas enzimas.

Nesta dissertação é apresentada a estrutura cristalográfica da miotoxina-II, uma Lys49-PLA₂, isolada do veneno da serpente *Artropoides (Bothrops) nummifer*. A estrutura foi determinada a 2.1 Å pelo método de substituição molecular e refinada até um residual cristalográfico de 22% ($R_{\text{free}} = 27\%$).

Os resultados de difração de raios X mostraram que a miotoxina-II se empacota no cristal como um monômero, contudo, uma forma dimérica da proteína foi identificada em solução, indicando que a forma monomérica é na

realidade, uma consequência das condições de cristalização.

Além disso, foi proposto que a miotoxina-II, assim como todas as Lys49-PLA₂s não são enzimas e que os baixos níveis de atividade catalítica são devidos à contaminação por Asp49-PLA₂s presentes no mesmo veneno. Sugeriu-se também que a densidade eletrônica encontrada no interior do canal hidrofóbico dessas proteínas poderia ser atribuída a uma molécula de PEG e não a uma molécula de ácido graxo (produto de uma catálise interrompida) como descrito por alguns autores.

In this work, we have presented the crystal structure of a myotoxin II, a Lys49-PLA₂, isolated from the venom of *A. L. spinosa* (Polychaeta). The structure has been solved at 2.1 Å by molecular replacement and refined to a final crystallographic residual (R_{free}) of 2.6% ($R_{\text{int}} = 2.0\%$).

Results of X-ray diffraction demonstrated that the myotoxin II exists in the crystal as a monomer. However, a dimeric form in the protein has been identified in solution, indicating that the myotoxin II is a dimeric protein under the crystallization conditions.

In addition, we have proposed that the myotoxin II, like all Lys49-PLA₂s, are non-enzymatic and the low levels of catalytic activity is due to the contamination by

ABSTRACT

Phospholipases A₂ (PLA₂ EC 3.1.1.4) are abundant enzymes in the pancreatic juice of mammals and in the venoms of snakes and insects. These enzymes catalyse the hydrolysis of the *sn*-2 ester bonds of phospholipids, and play key roles in diverse and important physiological functions.

The catalytic activity of secreted PLA₂s depends on the binding of Ca²⁺ and the highly conserved residues His48, Asp49 and Asp99. A group of PLA₂s in which the Asp49 is substituted by lysine have been identified in the venom of Viperid snakes. Initial reports suggested that these Lys49-PLA₂s retained low levels of catalytic activity; however, subsequent studies have failed to detect hydrolysis of phospholipid substrates. Despite the absence of detectable catalytic activity, these Lys49-PLA₂s retain the ability to disrupt membranes by a non-hydrolytic mechanism. With the aim of determining the structural basis for this mechanism, in recent years, much attention has been directed toward the identification and characterization of these enzymes.

In this work, we have presented the crystal structure of a myotoxin-II, a Lys49-PLA₂ isolated from the venom of *Artropoides (Bothrops) nummifer*. The structure has been solved at 2.1 Å by molecular replacement and refined to a final crystallographic residual (R_{factor}) of 22% ($R_{\text{free}} = 27\%$).

Results of X-ray diffraction demonstrated that the myotoxin-II packs in the crystal as a monomer. However, a dimeric form of the protein has been identified in solution, indicating that the monomeric form could be a consequence of the crystallization conditions.

In addition, we have proposed that the myotoxin-II like all Lys49-PLA₂s, are non-enzymes and the low levels of catalytic activity is due to the contamination by

Asp49-PLA₂s present in the same venom. We also have suggested that the electronic density observed within the substrate channel and described by some authors as a fatty acid, product of the interrupted catalysis, is a PEG molecule.

INTRODUÇÃO

1.1 ASPLA₂ ENZIMAS

As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise de ésteres, sendo encontradas em todos os organismos vivos. Elas são encontradas em todos os tecidos e orgãos, sendo a maior concentração encontrada no pâncreas e no intestino. As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise de ésteres, sendo encontradas em todos os organismos vivos. Elas são encontradas em todos os tecidos e orgãos, sendo a maior concentração encontrada no pâncreas e no intestino. As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise de ésteres, sendo encontradas em todos os organismos vivos. Elas são encontradas em todos os tecidos e orgãos, sendo a maior concentração encontrada no pâncreas e no intestino.



Figura 1.1.1: Diagrama da estrutura da lipase. A lipase é uma enzima que catalisa a hidrólise de ésteres, sendo encontrada em todos os organismos vivos. Ela é encontrada em todos os tecidos e orgãos, sendo a maior concentração encontrada no pâncreas e no intestino.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1 AS FOSFOLIPASES A₂

As fosfolipases são enzimas que catalisam a hidrólise de fosfolipídios, sendo separadas em várias classes: A₁, A₂, B, C e D, de acordo com o local de hidrólise (figura 1.1.1). As fosfolipases A₂ (PLA₂, EC 3.1.1.4), catalisam especificamente a hidrólise de grupos 2-acil (posição *sn*-2) dos fosfolipídios de membrana, liberando ácidos graxos e lisofosfolipídios (van Deenen e de Haas, 1963). Entre os produtos formados, podemos destacar o ácido araquidônico, um precursor de eicosanóides (potentes mediadores de processos inflamatórios, cancerígenos e

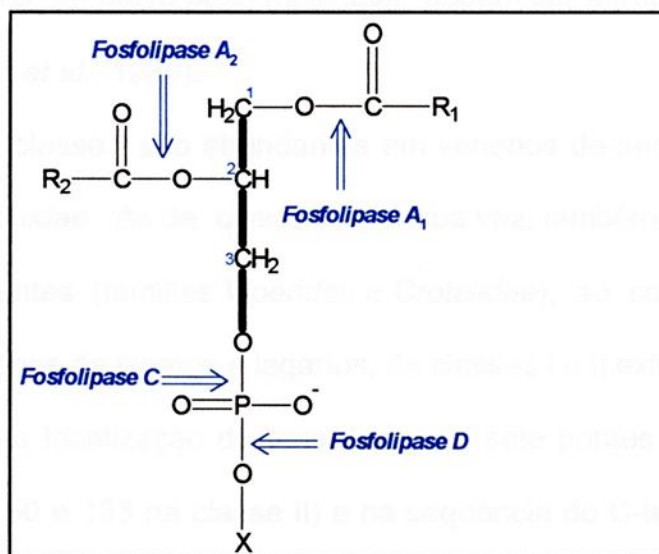


Figura 1.1.1 - Sítios de clivagem das fosfolipases. X corresponde a um grupo polar associado ao fosfato (ex: colina) e R₁ e R₂ representam as cadeias dos ácidos graxos

alérgicos (Bezzine *et al.*, 2000).

As PLA₂s podem ser classificadas como intracelulares ou extracelulares. Ao contrário das PLA₂s intracelulares, que são produzidas em pequenas quantidades e se encontram ligadas à membrana, as extracelulares são abundantes na natureza e podem ser encontradas no suco pancreático de mamíferos, no fluido sinovial e no veneno de serpentes e insetos. Devido aos potentes efeitos farmacológicos (além da sua característica atividade catalítica), tais como, miotoxidade, neurotoxidade, atividades hemolíticas e anticoagulantes, atividades convulsivas e indução de edemas, as PLA₂s presentes no veneno de serpentes e insetos, têm se destacado como alvo de estudos químicos e estruturais (Wang *et al.*, 1996).

1.2 CLASSIFICAÇÃO DAS PLA₂s

Baseado na similaridade seqüencial e na posição das pontes dissulfeto, as PLA₂s extracelulares, de baixo peso molecular, podem ser agrupadas em 3 classes: I, II, III (Renetseder *et al.*, 1985).

As PLA₂ da classe I são abundantes em venenos de serpentes das famílias *Elapidae* e *Hydrophidae*. As da classe II, por sua vez, também se encontram em venenos de serpentes (famílias *Viperidae* e *Crotalidae*), ao contrário da classe III, presentes em venenos de insetos e lagartos. As classes I e II exibem alta homologia, diferindo apenas na localização de uma das suas sete pontes dissulfeto (formada entre as cisteínas 50 e 133 na classe II) e na seqüência do C-terminal (Renetseder *et al.*, 1985).

Nos últimos anos, com a descoberta de novas enzimas, tornou-se necessária uma nova classificação. Em 1991, PLA₂s intracelulares de alto peso molecular (85 KDa) sem nenhuma ponte dissulfeto e contendo uma serina catalítica ao invés de uma histidina foram clonadas e seqüenciadas a partir de neutrófilos e plaquetas. Classificadas no grupo IV, estas enzimas não foram as únicas, pois subsequente, mais enzimas foram descobertas e classificadas, totalizando até o presente momento 11 grupos distintos (tabela 1.2.1) (Six e Dennis, 2000).

Tabela 1.2.1- Classificação das enzimas PLA₂

Classes	Fontes comuns	P.M. (KDa)	Número de pontes S-S	Pontes S-S únicas	Extensão do C-terminal
I A	Veneno de serpente	13-15	7	11-77	—
B	Pâncreas mamífero	13-15	7	11-77	—
II A	Fluido sinovial humano e veneno de serpente	13-15	7	50-137	7 res.
B	Veneno de serpente	13-15	6	50-137	6 res.
C	Testículo de rato	15	8	50-137 e 86-92	7 res.
D	Baço/pâncreas de humano/rato	14-15	7	50-137	7 res.
E	Cérebro/coração/útero de humano/rato	14-15	7	50-137	7 res.
F	Testículo/embrião de rato	16-17	7	50-137	30 res.
III	Abelha/lagarto/escorpião/humano	15-18	6	11-77 e 50-137	8 res.
V	Coração/pulmão humano	14	5	—	—
X	Baço/timo humano	14	8	N/D	N/D
IX	Venenos de serpente	14	6	N/D	N/D
XI A	Broto de arroz (PLA ₂ -I)	12,4	6	N/D	N/D
B	Broto de arroz (PLA ₂ -II)	12,9	6	N/D	N/D

* N/D = não disponível

1.3 MECANISMO CATALÍTICO

Estudos bioquímicos e cristalográficos envolvendo estruturas complexadas com o análogo do estado de transição L-1-O-octil-2-heptilfosfonil-*sn*-glicerol-3-fosfoetanolamina [$\text{diC}_8(2\text{Ph})\text{PE}$] (figura 1.3.1) têm proporcionado uma base para a compreensão do mecanismo catalítico das PLA_2 s. Esse mecanismo é similar ao proposto para as serinoproteases e envolve os resíduos Asp99 e His48, além de uma molécula de água ligada ao N δ 1 da His48 (triade catalítica) (Verheij *et al.*, 1980; Scott *et al.*, 1990).

Na figura 1.3.2 (A) é mostrado o início da reação. O grupo fosfato da molécula de fosfolípido e o oxigênio da molécula do ácido graxo (posição *sn*-2) se prendem ao íon cálcio, causando o deslocamento de duas moléculas de água (figura 1.3.3). O ataque nucleofílico da molécula de água ligada ao N δ 1 da His48 com a carbonila do substrato, ocorre quase que concomitantemente com a remoção de um próton dessa molécula pela His48. A carga positiva adquirida pela enzima com a retirada desse próton é presumivelmente estabilizada por uma rede de ligações de hidrogênio envolvendo os resíduos His48 e Asp99 (figura 1.3.2 (B)) (Scott *et al.*, 1990).

Como pode ser visto na figura 1.3.2 (B) o oxiânion do intermediário tetraédrico (formado pelo ataque nucleofílico da “água catalítica” com o carbono da carbonila do substrato), é estabilizado eletrostaticamente pelo íon cálcio e pelo NH da Gly30. Na realidade, a carga positiva desse íon já havia sido neutralizada pelas cargas negativas do resíduo Asp49 e do fosfato *sn*-3, antes mesmo da carga do oxiânion ser considerada. Contudo, nas estruturas utilizadas para a descrição desse

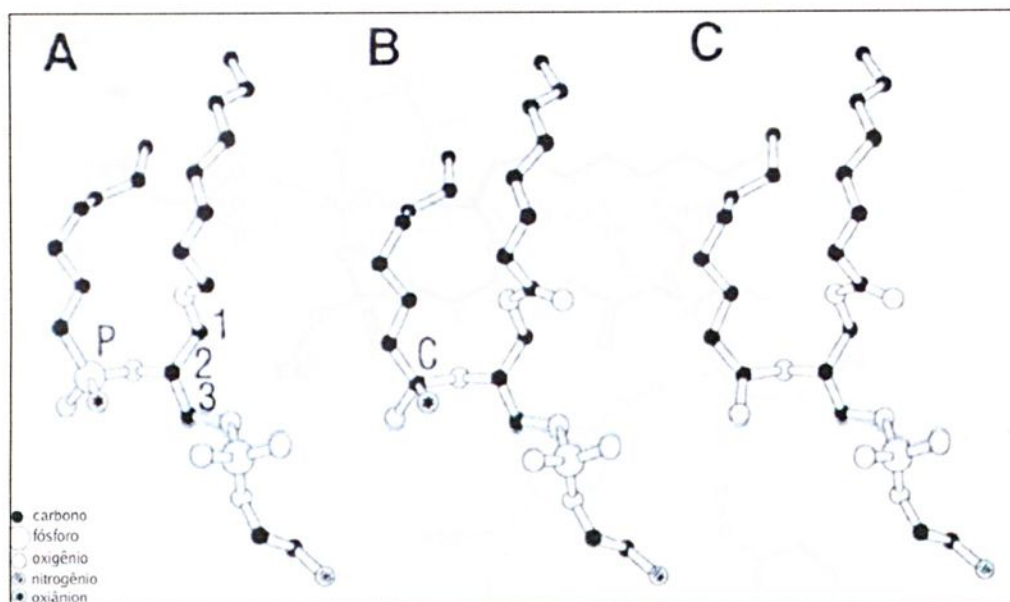


Figura 1.3.1 - O análogo do estado de transição $[diC_8(2Ph)PE]$ (A) é um membro da classe de inibidores de PLA_2 s estudado por Gelb e colaboradores com um segundo grupo fosfato na posição *sn*-2 (Yuan e Gelb, 1988). Por ter geometria tetraédrica e possuir carga negativa, este imita o estado de transição (B) formado na hidrólise do 1,2-diocetanol-*sn*-3-fosfoetanolamina (C).

modelo, observa-se a presença de um segundo íon cálcio, coordenado pelo oxigênio da carbonila do resíduo Cys29. Esse segundo íon é descrito como o responsável pela polarização da ligação peptídica entre os resíduos Cys29 e Gly30 e conseqüentemente pela neutralização de maneira indireta da carga negativa que aparece no oxianion durante a catálise (Scott *et al.*, 1990).

O colapso do intermediário é seguido pela desprotonação da His48 pelo oxigênio da posição *sn*-2 do lisofosfolípido. Realizada a hidrólise da ligação éster *sn*-2, os produtos são liberados, com o retorno de outras três moléculas de água, duas coordenando o primeiro íon cálcio e a outra restaurando a tríade catalítica (figura 1.3.2 (C)) (Scott *et al.*, 1990).

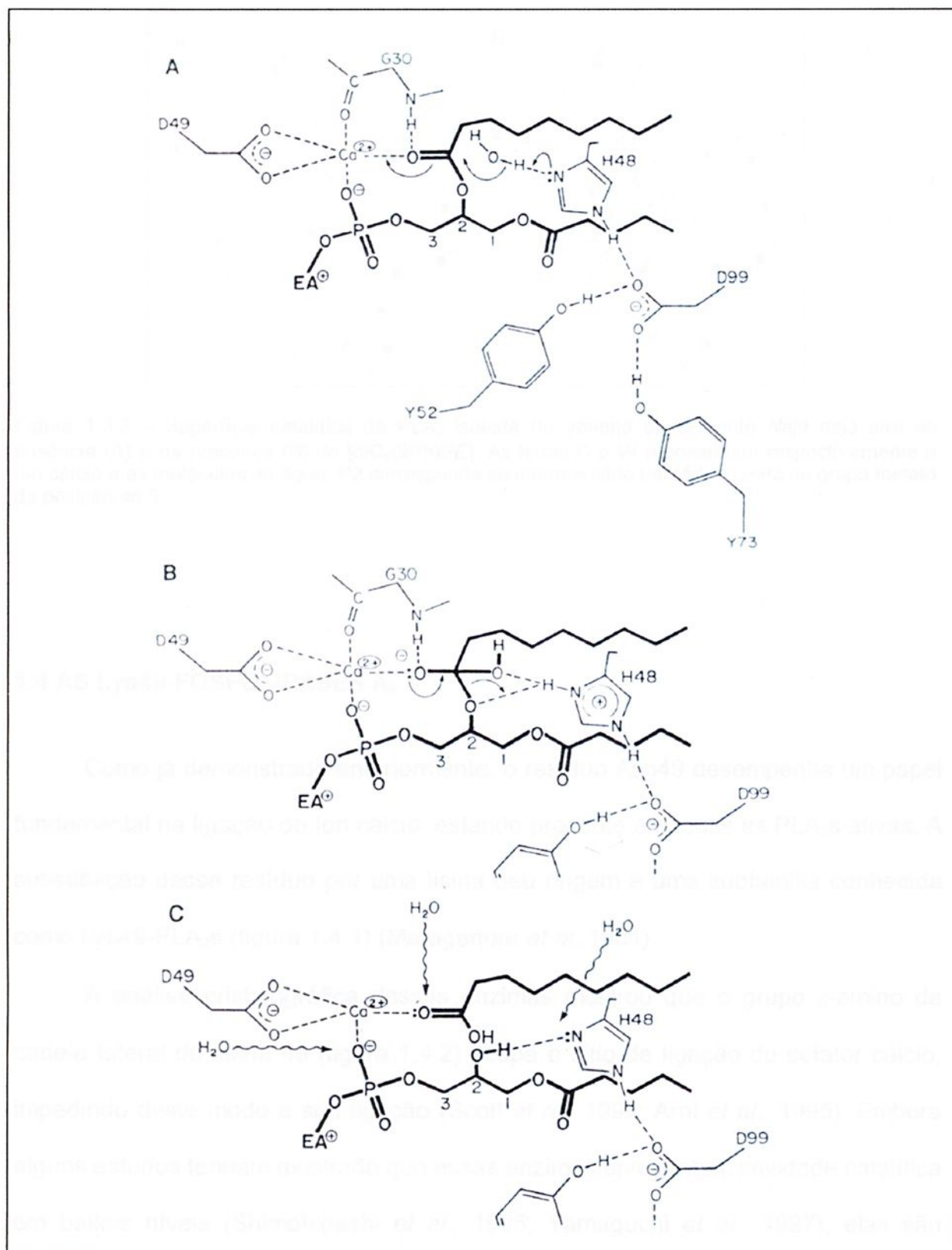


Figura 1.3.2 - Mecanismo catalítico das PLA₂s baseado no complexo da *Naja naja atra* com o inibidor [diC₈(2Ph)PE] (Scott et al., 1990).

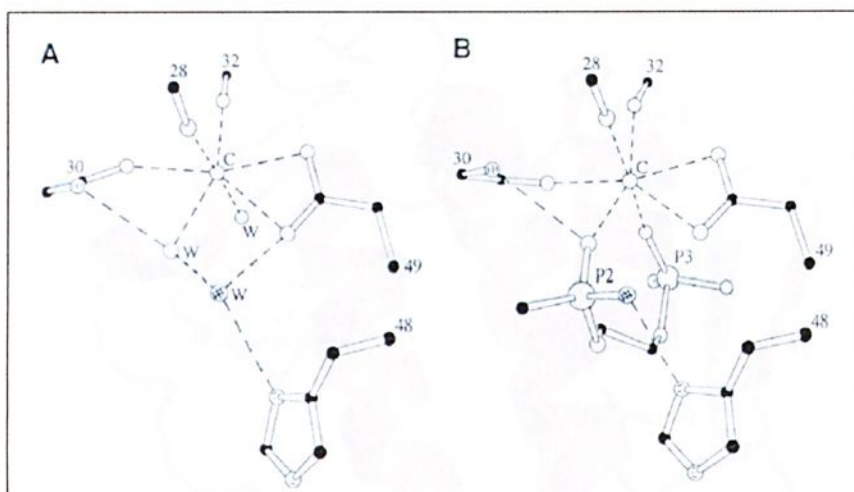


Figura 1.3.3 – Superfície catalítica da PLA_2 isolada do veneno da serpente *Naja naja atra* na ausência (A) e na presença (B) do $[diC_8(2Ph)PE]$. As letras C e W representam respectivamente o íon cálcio e as moléculas de água. P2 corresponde ao intermediário tetraédrico e P3 ao grupo fosfato da posição *sn*-3.

1.4 AS Lys49-FOSFOLIPASES A_2

Como já demonstrado anteriormente, o resíduo Asp49 desempenha um papel fundamental na ligação do íon cálcio, estando presente em todas as PLA_2 s ativas. A substituição desse resíduo por uma lisina deu origem a uma subfamília conhecida como Lys49- PLA_2 s (figura 1.4.1) (Maraganore *et al.*, 1984).

A análise cristalográfica dessas enzimas mostrou que o grupo ϵ -amino da cadeia lateral da lisina 49 (figura 1.4.2) ocupa o sítio de ligação do cofator cálcio, impedindo deste modo a sua ligação (Scott *et al.*, 1992; Arni *et al.*, 1995). Embora alguns estudos tenham mostrado que essas enzimas apresentam atividade catalítica em baixos níveis (Shimohigashi *et al.*, 1995; Yamaguchi *et al.*, 1997), elas são consideradas inativas (van den Bergh *et al.*, 1989), já que sem a presença do íon cálcio o intermediário tetraédrico não pode ser estabilizado durante o ciclo catalítico.

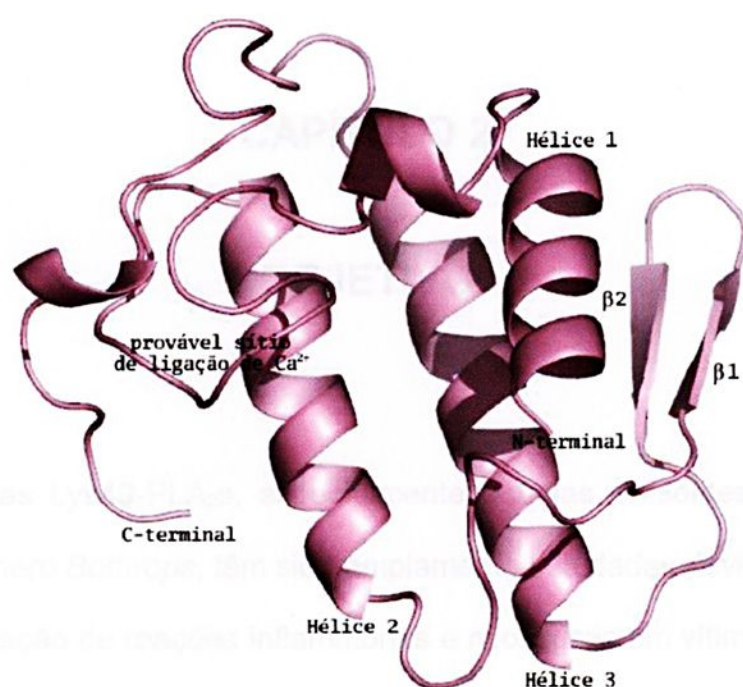


Figura 1.4.1 – Enovelamento de uma Lys49-PLA₂ ilustrando as características gerais presentes nas classes I e II.

Mesmo assim, elas ainda são capazes de danificar membranas, por um mecanismo independente de cálcio, apresentando atividades farmacológicas como, por exemplo, a formação de edemas e miotoxidade (Gutiérrez e Lomonte, 1995).

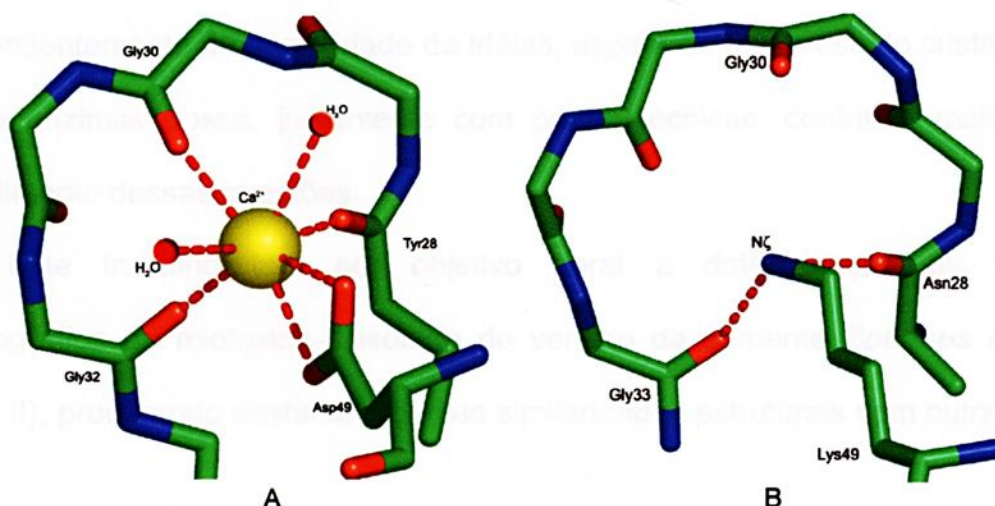


Figura 1.4.2 – Região do sítio de ligação de cálcio. (A) Ilustração do íon Ca^{2+} presente na PLA₂ pancreática bovina (Dijkstra *et al.*, 1981). Este geralmente se encontra heptacoordenado por resíduos do sítio de ligação de cálcio (resíduos 25-33). (B) Ilustração da mesma região na Lys49-PLA₂ isolada do veneno da serpente *Bothrops asper* (cadeia A - Arni *et al.*, 1995).

CAPÍTULO 2

OBJETIVO

As enzimas Lys49-PLA₂s, especialmente aquelas presentes no veneno de serpentes do gênero *Bothrops*, têm sido amplamente estudadas devido ao seu papel central na modulação de reações inflamatórias e miotóxicas em vítimas de acidentes ofídicos. Todavia, algumas questões sobre esse aspecto ainda não foram totalmente esclarecidas. Uma delas seria a correlação ou não entre a manifestação desses efeitos farmacológicos e a atividade catalítica residual dessas enzimas (consequência de uma catálise interrompida), a outra seria uma explicação mais detalhada sobre tal atividade residual, se é que esta exista, uma vez que a literatura sobre esse assunto apresenta-se bastante divergente. De qualquer maneira, independentemente da diversidade de idéias, espera-se que o estudo cristalográfico dessas enzimas possa, juntamente com outras técnicas, contribuir mais para o entendimento dessas questões.

Este trabalho tem por objetivo geral a determinação da estrutura cristalográfica da miotoxina-II isolada do veneno da serpente *Bothrops nummifer* (Anum-II), procurando destacar algumas similaridades estruturais com outras Lys49-PLA₂s.



CAPÍTULO 3

CRISTALIZAÇÃO DA MIOTOXINA-II

A obtenção de cristais de macromoléculas, com qualidade e tamanho suficiente para permitir a análise estrutural, constitui uma das etapas críticas na cristalografia por raios X (McPherson *et al.*, 1995). Embora avanços tenham ocorrido, a cristalização de proteínas ainda é um procedimento de tentativas e erros devido ao grande número de fatores envolvidos (pH, temperatura, agente precipitante, pureza da proteína e etc.) (Ducruix & Giegé, 1999).

É importante ressaltar que vários métodos podem ser utilizados na cristalização de proteínas, entretanto o mais comum e utilizado neste trabalho é o método de difusão de vapor (McPherson, 1982).

Neste capítulo faremos uma breve descrição sobre os métodos utilizados para isolar, purificar e cristalizar a miotoxina-II.

3.1 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO

A miotoxina-II, uma Lys49-PLA₂, representa uma segunda isoforma isolada do veneno da serpente *Bothrops nummifer*. Essa espécie (figura 3.1.1), conhecida popularmente como “mano-de-piedra” ou “jumping viper” habita as florestas tropicais

da Costa Rica (Solórzano, 1989) e seu veneno é responsável pela indução de uma série de danos aos tecidos musculares, tais como, hemorragia, edema e mionecrose (Gutiérrez e Chaves, 1980).



Figura 3.1.1 - Exemplar da serpente *Bothrops nummifer*

A miotoxina-II foi purificada e liofilizada na Costa Rica e gentilmente cedida ao nosso laboratório para testes de cristalização. O veneno foi extraído de mais de 15 serpentes coletadas na Costa Rica. A miotoxina-II foi purificada através de cromatografia de troca catiônica utilizando uma coluna CM-Sephadex C-25 (Pharmacia). Sua pureza foi verificada por eletroforese em gel de poliacrilamida tanto na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) como na presença de uréia (uréia-PAGE) e por cromatografia líquida de alta performance em fase reversa (RP-HPLC), utilizando uma coluna C4 (Vydac) eluída a 1,0 ml/min com um gradiente de 0 a 60% de acetonitrila em 0,1% de ácido trifluoroacético (Angulo *et al.*, 2000).

3.2 CRISTALIZAÇÃO

A proteína liofilizada foi ressuspensa em água deionizada na concentração de 10 mg/ml. Como mencionado anteriormente, foi adotado o método de difusão de vapor com gota suspensa conhecido como *hanging drop* (figura 3.2.1). Com o intuito de se obter uma condição de cristalização para a miotoxina-II, testes iniciais, utilizando o kit de matriz esparsa com 50 soluções do fatorial I (Hampton Research; Jancarick e Kim, 1991), foram realizados. Os melhores cristais (figura 3.2.2) foram obtidos numa solução contendo acetado de sódio 0,1M a pH 4,6, 20% de PEG 3350 e sulfato de amônio 0,2 M (solução 20) (Watanabe *et al.*, 2004).

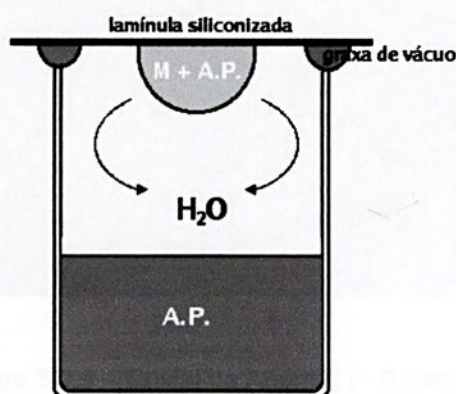


Figura 3.2.1 - Esquema do método de difusão de vapor com gota suspensa. A gota contém uma mistura de volumes iguais (1 μ l) de solução de proteína (M) e solução precipitante (A.P.). Como a concentração do agente precipitante (A.P.) na gota é menor que no reservatório, as espécies voláteis (água e solventes orgânicos) irão se difundir da gota para a solução precipitante do reservatório até que as pressões de vapor de ambas se igualem. Isto acarretará uma diminuição do volume da gota e no aumento das concentrações de todos os seus constituintes, podendo conduzir a proteína ao estado de supersaturação e a sua conseqüente cristalização.



Figura 3.2.2 – Cristal da Anum-II (~ 0,4 mm)

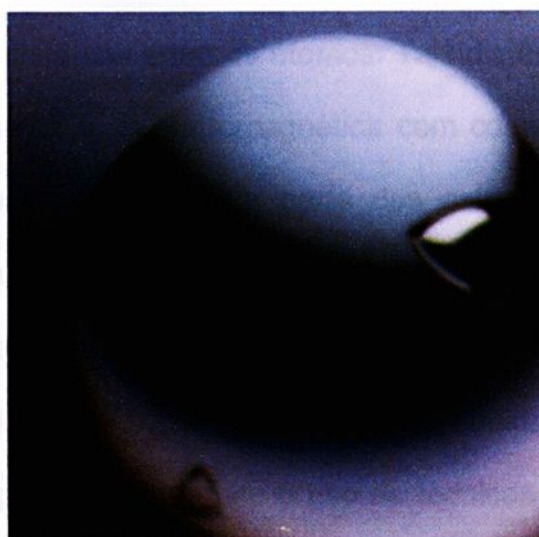


Figura 3.2.3 – Cristal da Anum-II (~ 0,3 mm)

CAPÍTULO 4

PROCESSAMENTO DOS DADOS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X

4.1 COLETA

A cristalografia é o estudo da estrutura interna de um cristal. Para distinguir átomos individuais o comprimento de onda da radiação utilizada deve ser no mínimo igual ou menor que a distância entre os átomos. Tais distâncias atingem em média alguns angstroms e a radiação eletromagnética com comprimento de onda nessa faixa é o raio X. Atualmente, a maior parte das estruturas de macromoléculas biológicas é resolvida utilizando radiação síncroton. As vantagens derivam do fato de que o acelerador de elétrons síncroton produz raios X de alta intensidade (alto fluxo - um termo que descreve o número de fótons por unidade de tempo), sob uma extensa faixa de energia (o que permite o uso de técnicas que requerem múltiplos comprimentos de onda, como por exemplo MAD, Dispersão Anômala Múltipla) e altamente polarizados e colimados. Além disso, a radiação apresenta baixo background (ruído), favorecendo não só a coleta de dados a uma maior resolução, mas também de cristais que difratam fracamente (Blundell, 1976; Drenth, 1999).

Quando um cristal é irradiado, cada um dos seus átomos espalha ondas de raios X de amplitude muito pequena, que se propagam em todas as direções. Devido ao arranjo regular e periódico dos átomos no cristal, essas ondas interferem entre si, anulando algumas (interferência destrutiva) e amplificando outras

(interferência construtiva), produzindo desta maneira, um padrão de difração característico da molécula de proteína em estudo. Hoje, essas reflexões são coletadas através de uma placa de imagem digitalizada, sendo possível medir diretamente à intensidade de difração (Drenth, 1999).

4.1 COLETA

Através do método de rotação, 78 imagens foram coletadas de um cristal crioprotetido na linha PCr do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS/Campinas, Polikarpov *et al.*, 1998). As intensidades de difração foram medidas utilizando uma placa de imagem MAR345 (MAR RESEARCH). O ângulo de rotação entre cada imagem ($\Delta\phi/\text{foto}$) foi de 1° e a resolução nominal obtida de 2,08 Å.

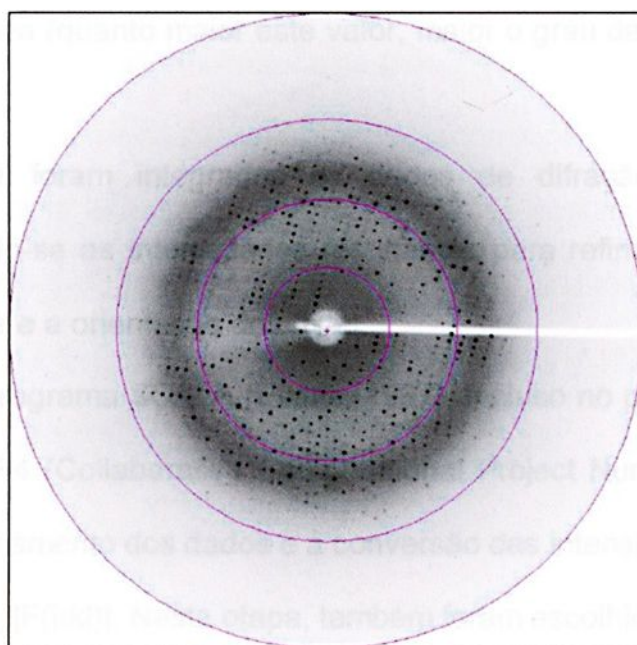


Figura 4.1.1 - Padrão de difração da Anum-II. Os círculos correspondem às resoluções de 2,1, 2,8, 4,1 e 8,3 Å.

4.2 PROCESSAMENTO DOS DADOS

A primeira imagem foi autoindexada utilizando o programa MOSFLM (Leslie, 1992), onde valores aproximados dos parâmetros de cela (a , b , c , α , β , γ) e a orientação do cristal foram encontrados. Uma lista de possíveis soluções com diferentes simetrias é produzida. Para cada solução é atribuído um valor de penalidade que avalia a distorção sofrida pela cela para que esta cumpra com as restrições inerentes aquele grupo espacial. A seleção se baseia na escolha de uma solução que apresente maior simetria e mais baixa penalidade (menor distorção) (figura 4.2.1). No caso da Anum-II, a rede de Bravais que apresentou maior simetria e menor penalidade foi a primitiva tetragonal. Imposta esta simetria, uma estimativa da mosaicidade foi realizada, de modo que nenhuma reflexão ficasse fora das predições. O valor obtido para esta primeira imagem foi de $0,6^\circ$. A mosaicidade para cristais de proteínas geralmente varia entre $0,25^\circ$ e $0,5^\circ$, de acordo com a desordem da estrutura cristalina (quanto maior este valor, maior o grau de desordem) (Drenth, 1999).

Em seguida foram integrados os dados de difração das 72 imagens coletadas, utilizando-se as intensidades resultantes para refinar os parâmetros de cela, a mosaicidade e a orientação do cristal.

Através do programa SCALA (Evans, 1997), incluso no pacote de programas cristalográficos CCP4 (Collaborative Computational Project Number 4, 1994) foram realizados o escalonamento dos dados e a conversão das intensidades reduzidas em fatores de estrutura, $|F(hkl)|$. Nesta etapa, também foram escolhidas (aleatoriamente)

e separadas 5% das reflexões, que mais tarde serão utilizadas no controle do processo de refinamento (R_{free} - apêndice A).

Embora o processamento tenha sido concluído, ainda não é possível afirmar que o grupo espacial esteja correto, uma vez que, para uma rede primitiva tetragonal, há várias possibilidades de grupos espaciais, sendo necessária uma análise das reflexões. Através dessa análise, verificou-se, que somente as reflexões do tipo $(00l)$ para $l=4n$ e $(0k0)$ para $k=2n$ estavam presentes. De acordo com a *International Tables for Crystallography* Vol. A (Kluwer Academic, 1996), essas extinções sistemáticas são próprias dos grupos $P4_32_12$ e $P4_12_12$, sendo impossível a distinção entre eles. Baseado nisto, um novo processamento, seguindo os mesmos passos já descritos, foi realizado. Desta vez, o grupo espacial escolhido foi o de maior simetria, ou seja, $P4_32_12$. É claro que também poderia ser o grupo espacial $P4_12_12$, já que ambos são enantiomorfos, entretanto, veremos adiante, através da substituição molecular, que o grupo $P4_32_12$ é o correto. As principais estatísticas e os valores finais deste processamento são mostrados na tabela 4.2.1

A estimativa do número de moléculas presentes na unidade assimétrica foi realizada pelo programa Mathews_coeff (CCP4, 1994). Assumindo-se que a massa molecular do monômero da miotoxina-II seja de 14KDa, estima-se que haja apenas um monômero com volume de Matthews equivalente a $2,7\text{\AA}^3/\text{Da}$ e conteúdo de solvente no cristal de 54,4%.

List of possible Laue groups, sorted on penalty index.
The lower the PENALTY, the better
Only solutions with PENALTY less than 200 are listed, a complete list is given in the terminal window

No	PENALTY	LATT	a	b	c	alpha	beta	gamma	Possible spacegroups
17	34	cP	64.97	68.83	68.91	90.1	89.9	90.4	P23, P213, P432, P4232, P4332, P4132
16	33	hR	95.01	94.63	116.76	92.9	87.4	118.1	H3, H32 (hexagonal settings of R3 and R32)
15	33	tP	64.97	68.83	68.91	90.1	89.9	90.4	P4, P41, P42, P43, P422, P4212, P4122, P41212, P4222, P42212, P4322, P43212
14	32	hR	94.28	94.63	117.51	92.6	87.3	118.0	H3, H32 (hexagonal settings of R3 and R32)
13	31	oC	94.28	95.01	68.91	90.1	90.0	86.7	C222, C2221
12	31	mC	94.28	95.01	68.91	90.1	90.0	86.7	C2
11	30	mC	95.01	94.28	68.91	90.0	90.1	93.3	C2
10	4	tP	68.83	68.91	64.97	89.9	90.4	90.1	P4, P41, P42, P43, P422, P4212, P4122, P41212, P4222, P42212, P4322, P43212
9	3	mP	68.83	64.97	68.91	89.9	90.1	90.4	P2, P21
8	3	mC	97.49	97.29	64.97	89.7	90.4	89.9	C2
7	3	oC	97.29	97.49	64.97	89.6	90.3	89.9	C222, C2221
6	3	oP	64.97	68.83	68.91	90.1	89.9	90.4	P222, P2221, P21212, P212121
5	2	mC	97.49	97.29	64.97	90.3	90.4	90.1	C2
4	2	mP	64.97	68.91	68.83	90.1	90.4	89.9	P2, P21
3	1	mP	64.97	68.91	68.83	90.1	90.4	89.9	P2, P21
2	0	aP	64.97	68.83	68.91	89.9	89.9	89.6	P1
1	0	aP	64.97	68.83	68.91	90.1	89.9	90.4	P1

Figura 4.2.1 – Indexação realizada com o programa MOSFLM. A escolha do sistema cristalino correto se baseia na seleção da solução com menor penalidade e maior simetria.

Tabela 4.2.1 – Parâmetros e valores finais do processamento dos dados

Parâmetros	Resultados
Grupo espacial	P4 ₃ 2 ₁ 2
Dimensões da cela unitária (Å)	a = 68,9
	b = 68,9
	c = 64,1
	α = β = γ = 90,0°
Resolução (Å)	2,04 – 2,08 (2,19-2,08)
Reflexões totais	119638
Reflexões únicas	9730
Completeza dos dados (%) ^e	99,1 (94,1)
R _{sym} ^a (%)	8,9 (52,0)
R _{meas} ^b (%)	9,8 (57,1)
Redundância ^d	5,8 (5,7)
⟨I/σ(I)⟩ ^c	5,4 (1,0)

^a R_{sym} (F) : $R_{sym}(F) = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |F_i(hkl) - \overline{F(hkl)}|}{\sum_{hkl} \sum_i F(hkl)}$: discrepância entre os fatores de estrutura simetricamente relacionados

^b R_{meas} (F) : $R_{meas}(F) = \frac{\sum_{hkl} \sum_i \sqrt{\frac{N}{N-1}} |F_i(hkl) - \overline{F(hkl)}|}{\sum_{hkl} \sum_i F_i(hkl)}$: discrepância corrigida pela multiplicidade do conjunto

^c ⟨I/σ(I)⟩ : intensidade média dividido pelo erro médio associado a cada medida

^d Redundância = média das reflexões ponderadas pelo nº de observações

^e Completeza = (nº reflexões observadas/ nº reflexões possíveis)

CAPÍTULO 5

OBTENÇÃO DAS FASES E REFINAMENTO

Para determinar a estrutura de uma proteína é necessário conhecer do padrão de difração: os fatores de estrutura e os ângulos de fase relacionados. Os fatores de estrutura podem ser obtidos a partir das intensidades de difração (apêndice A), já as informações de fase são perdidas durante o experimento, impossibilitando a determinação direta da estrutura. Com o intuito de resolver esse problema vários métodos foram desenvolvidos: substituição molecular, substituição isomórfica múltipla, dispersão anômala a múltiplos comprimentos de onda e métodos diretos. O primeiro e mais fácil, exige o conhecimento prévio da estrutura tridimensional de uma proteína (o modelo), com pelo menos 30% a 50% de sua sequência de aminoácidos idêntica à que está em análise. Tais modelos se encontram disponíveis no banco de dados PDB (Brookhaven Protein Data Bank) (<http://www.rcsb.org/pdb/>). O modelo prévio permite atribuir aos dados de difração já coletados valores iniciais para as fases. Neste trabalho o método escolhido foi o de substituição molecular, devido ao grande número de estruturas (modelos) de Lys49-PLA₂ depositadas no PDB (Drenth, 1999).

Após a determinação das fases, a etapa seguinte consiste na construção do modelo que representará a estrutura da proteína em estudo. Como mencionado no apêndice A, os raios X são espalhados pelos elétrons dos átomos presentes

nos aminoácidos. Portanto, o que é visto, é a chamada densidade eletrônica, ou seja, a área onde se encontram os elétrons associados ao seu respectivo átomo. A densidade eletrônica é aprimorada por refinamento. O refinamento é um processo de ajuste do modelo para tentar encontrar uma melhor concordância entre os fatores de estrutura observados (F_{obs}) e os fatores de estrutura calculados (F_{calc}) (apêndice A). Esse ajuste consiste na modificação dos parâmetros posicionais (x, y e z) e no fator de temperatura para todos os átomos da estrutura, exceto os hidrogênios, os quais possuem apenas um elétron e portanto, espalham pouca radiação (apêndice A). No caso da estrutura da Anum-II que possui 1880 átomos (apêndice B), o número de parâmetros a serem refinados é de aproximadamente 7520. Considerando-se para isso somente as informações das 9730 reflexões medidas, a relação entre os parâmetros conhecidos e as variáveis a serem refinadas é muito pequena, em torno de 1,3. Mas, como o refinamento necessita em média de um número de parâmetros no mínimo 10 vezes superior ao número de variáveis, “observações” adicionais são incluídas (Giacovazzo, 1992). Neste caso, são incorporadas no processo de refinamento simetrias não-cristalográficas (a exceção de estruturas monoméricas), informações sobre o conteúdo de solvente e restrições estereoquímicas (provenientes de pequenos peptídeos e aminoácidos determinados à alta resolução) (Drenth, 1999).



5.1 A ESCOLHA DOS MODELOS

A escolha dos modelos para a substituição molecular foi feita através do programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) (Altschul *et al.*, 1997). A partir da sequência primária da Anum-II, o programa realiza uma busca no PDB por seqüências similares. Havendo dados que possam ser comparados, é feita uma classificação por afinidade residual na forma de “score”. A seleção se baseia na escolha das seqüências que apresentam maior score, ou seja, maior homologia. A tabela 5.1.1 mostra as cinco proteínas selecionadas. Nesta classificação são fornecidas a seqüência de aminoácidos da proteína e a sua identificação no PDB. O alinhamento entre essas seqüências foi realizado com o programa CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) (Thompson *et al.*, 1994) e é mostrado na figura 5.1.1.

Tabela 5.1.1- Lista das fosfolipases usadas como modelo na substituição molecular

	Serpente	PDB ID	Resolução (Å)
Lys49-PLA ₂ s	<i>Bothrops godmani</i>	1GOD	2,8
	<i>Bothrops asper</i>	1CLP	2,8
	<i>Bothrops pirajai</i>	1QLL	2,04
	<i>Agkistrodon piscivorus piscivorus</i>	1PPA	2,0
	<i>Agkistrodon acutus</i>	1MC2	0,85

Pelo alinhamento é possível constatar que a proteína que apresentou maior identidade seqüencial em relação a Anum-II foi a Lys49-PLA₂ isolada da serpente *Bothrops godmani* (1GOD), onde dos 121 resíduos, apenas 11 eram diferentes.

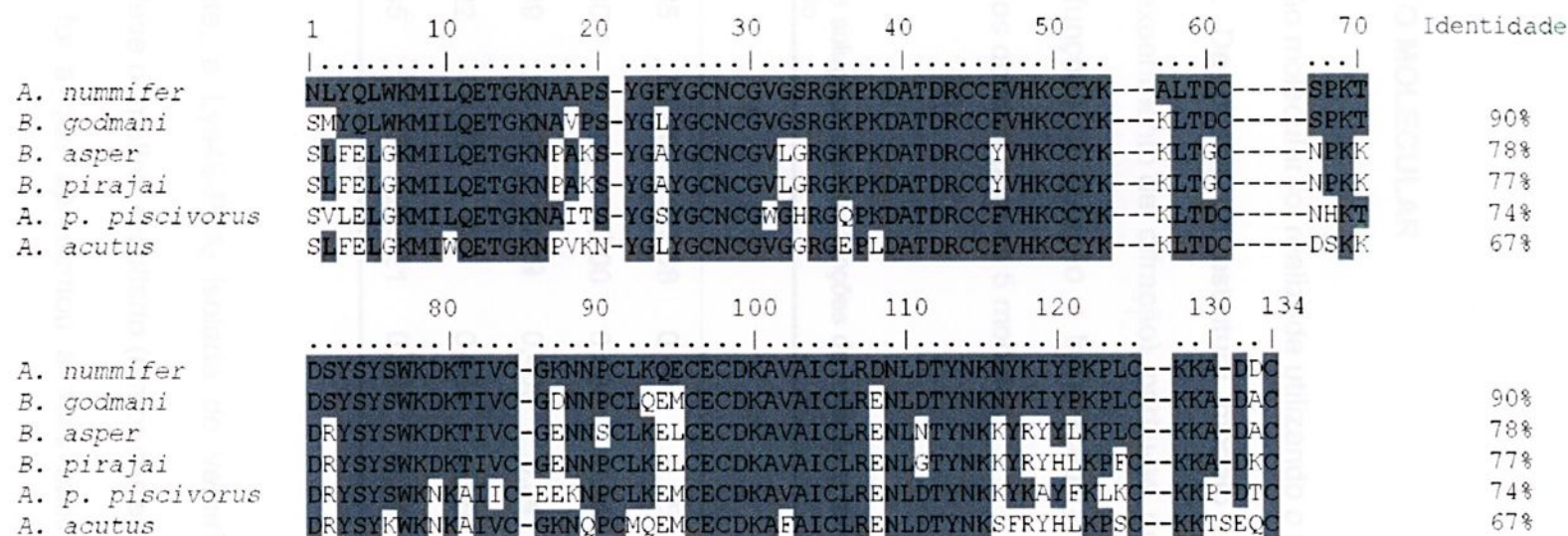


Figura 5.1.1 - Alinhamento sequencial. A porcentagem de similaridade é referente à comparação das seqüências dos cinco modelos em relação a miotoxina-II da *Bothrops nummifer* (Anum-II)

Entretanto, durante a substituição molecular, os monômeros de todas as cinco fosfolipases foram testados como modelo de busca para a obtenção das fases.

5.2 SUBSTITUIÇÃO MOLECULAR

A substituição molecular foi realizada utilizando o programa MOLREP (Vagin e Teplyakov, 1997). De posse da estrutura modelo e do arquivo de reflexões (proveniente do experimento de difração) partiu-se então para a busca de uma solução para as funções de rotação e translação (apêndice A). A tabela 5.2.1 mostra os resultados obtidos para os 5 modelos.

Tabela 5.2.1-Melhores soluções para as funções de rotação e translação para as cinco fosfolipases utilizadas como modelo

Modelo PDB ID	α	β	γ	x	y	z	R _{factor} (%)	CC (%)
1GOD	43,85	51,49	197,68	0,409	0,253	0,308	0,536	0,440
1PPA	39,30	56,30	345,00	0,590	0,245	0,442	0,516	0,485
1CLP	46,89	64,22	10,29	0,409	0,247	0,307	0,535	0,451
1QLL	31,22	78,53	0,0	0,089	0,252	0,0306	0,505	0,504
1MC2	27,45	27,57	225,21	0,584	0,244	0,441	0,488	0,539

Curiosamente, a Lys49-PLA₂ isolada do veneno da serpente *Agkistrodon acutus* (1MC2) obteve o melhor resultado (maior correlação e menor R_{factor}). Porém, dentre todas, ela foi a que apresentou a mais baixa identidade sequencial em relação a Anum-II.

Pela substituição molecular também foi possível confirmar que o grupo espacial é sem dúvida $P4_32_12$. A escolha se baseia na análise do coeficiente de correlação e do R_{factor} das soluções da função de translação dos dois grupos, uma vez que a função de rotação é independente das relações de simetria dos grupos espaciais. Como mostra a tabela 5.2.2, o grupo espacial $P4_32_12$ é realmente o correto, devido a maior correlação com os dados e ao menor valor do R_{factor} .

Tabela 5.2.2 – Melhores soluções para as funções de rotação e translação obtidas a partir do modelo da *Agkistrodon acutus* para os dois grupos espaciais enantiomorfos $P4_32_12$ e $P4_12_12$

Grupo Espacial	α	β	γ	x	y	z	R_{factor} (%)	CC (%)
$P4_32_12$	27,45	27,57	225,21	0,584	0,244	0,441	0,488	0,539
$P4_12_12$	27,45	27,57	225,21	0,080	0,242	0,187	0,533	0,359

5.3 REFINAMENTO

O modelo da miotoxina-II, obtido por substituição molecular, foi submetido inicialmente a um refinamento de corpo rígido pelo programa REFMAC5 (CCP4, 1994; Murshudov *et al.*, 1997). Após 10 ciclos de refinamento o valor de R_{factor} convergiu para 43%. A visualização dessa estrutura, assim como também dos mapas de densidade eletrônica gerados, foi feita pelo programa gráfico TURBO-FRODO (Roussel e Cambillau, 1991).

Através da análise dos mapas de densidade eletrônica ($2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ e $F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$) foram realizados a substituição dos resíduos e alguns ajustes posicionais das cadeias laterais. A cada ajuste manual, a estrutura foi submetida a ciclos de

refinamento, utilizando o algoritmo de máxima verossimilhança (Maximum Likelihood) (Adams *et al.*, 1997), também implementado no programa REFMAC5.

A figura 5.3.1 mostra os resíduos importantes do sítio de ligação de cálcio modelados dentro do mapa de densidade eletrônica do tipo $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ (nível de contorno 1σ).

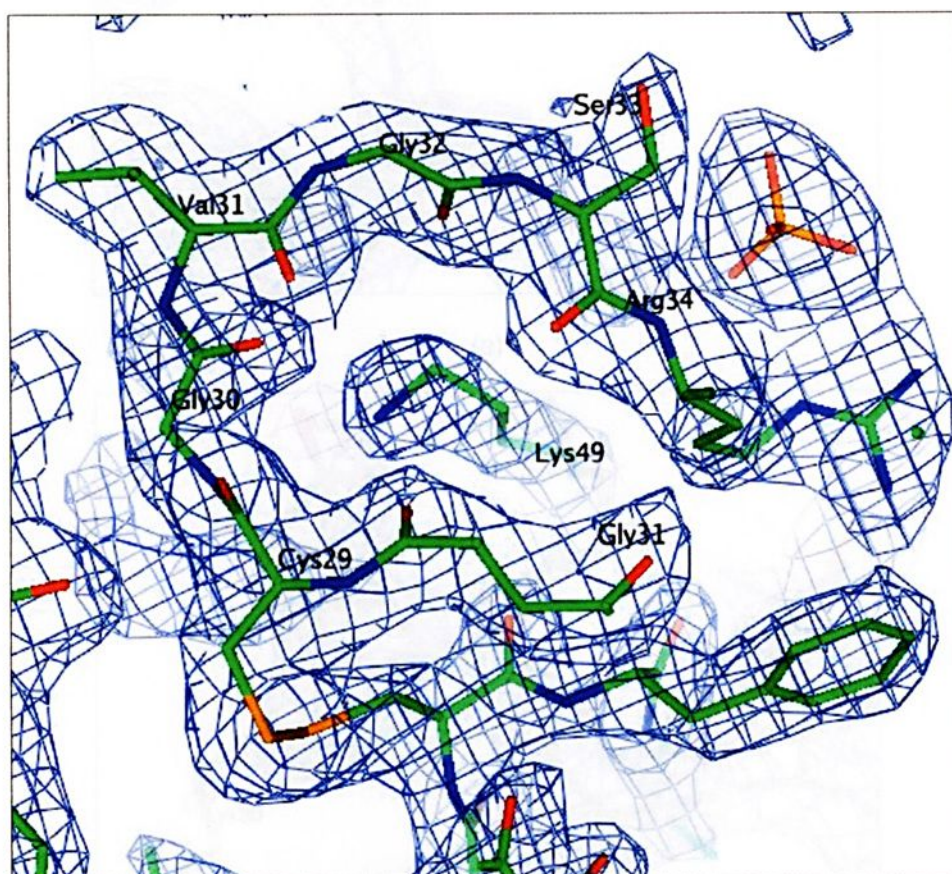
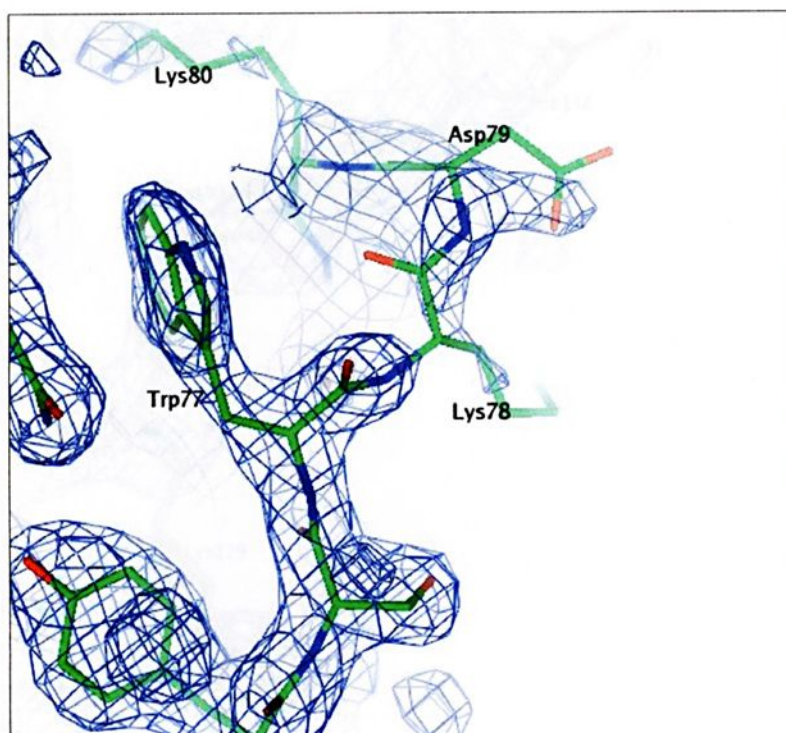
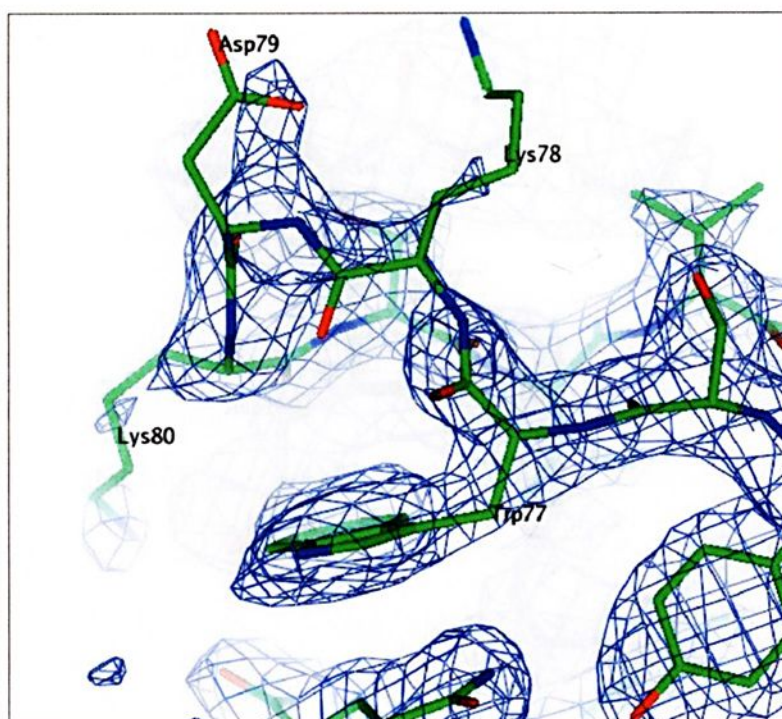


Figura 5.3.1 – Mapa de densidade eletrônica na região correspondente ao sítio de ligação de cálcio nas Asp49-PLA₂s

Cadeias laterais pertencentes a resíduos que estão expostos ao solvente e que, portanto, apresentam uma grande mobilidade conformacional (como é o caso das lisinas), não puderam ser localizadas (Figura 5.3.2). Outra região que também apresentou falhas na densidade eletrônica foi o C-terminal (Figura 5.3.3).

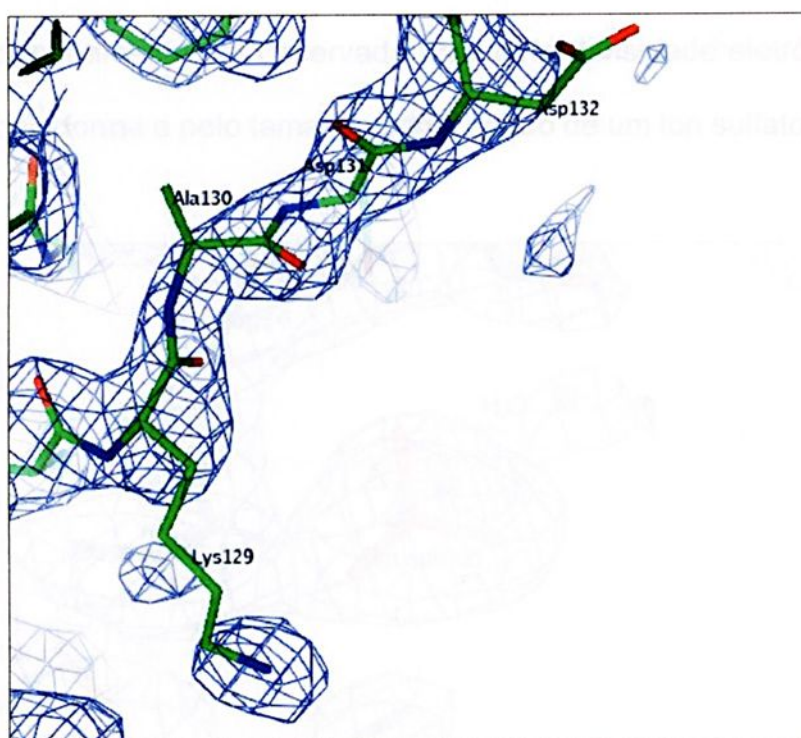


(a)

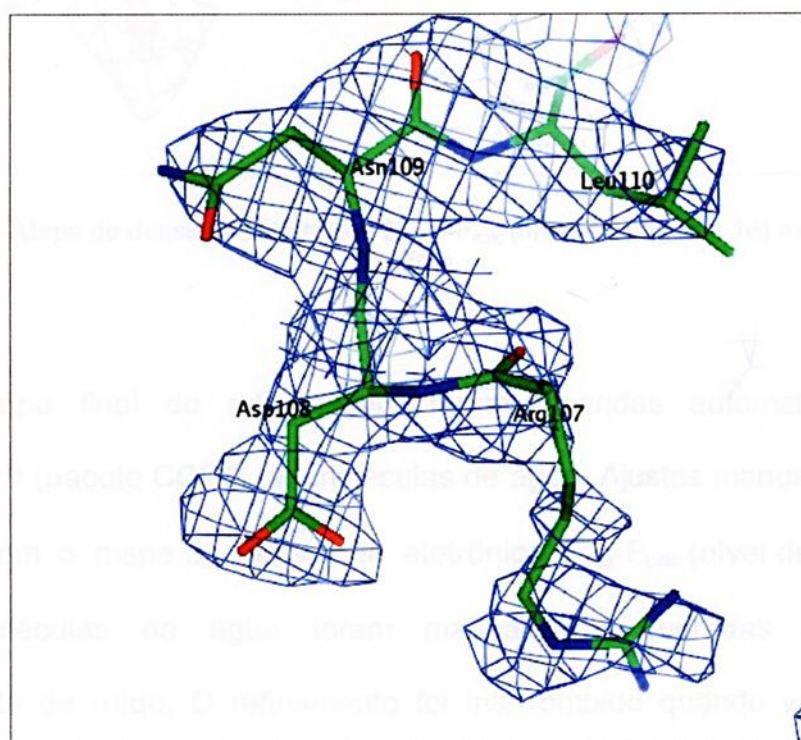


(b)

Figura 5.3.2 – Mapa de densidade eletrônica $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ (nível de contorno 1σ). As figuras (a) e (b) correspondem a mesma região. Os resíduos presentes nesta região (Lys80 e Trp77) estão envolvidos na formação da interface de dimerização.



(a)



(b)

Figura 5.3.3 – As figuras acima representam a densidade eletrônica na região do C-terminal ($2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$, nível de contorno 1σ).

Durante o refinamento, foi observada uma forte densidade eletrônica a qual foi interpretada pela forma e pelo tamanho como sendo de um íon sulfato (Figura 5.3.4).

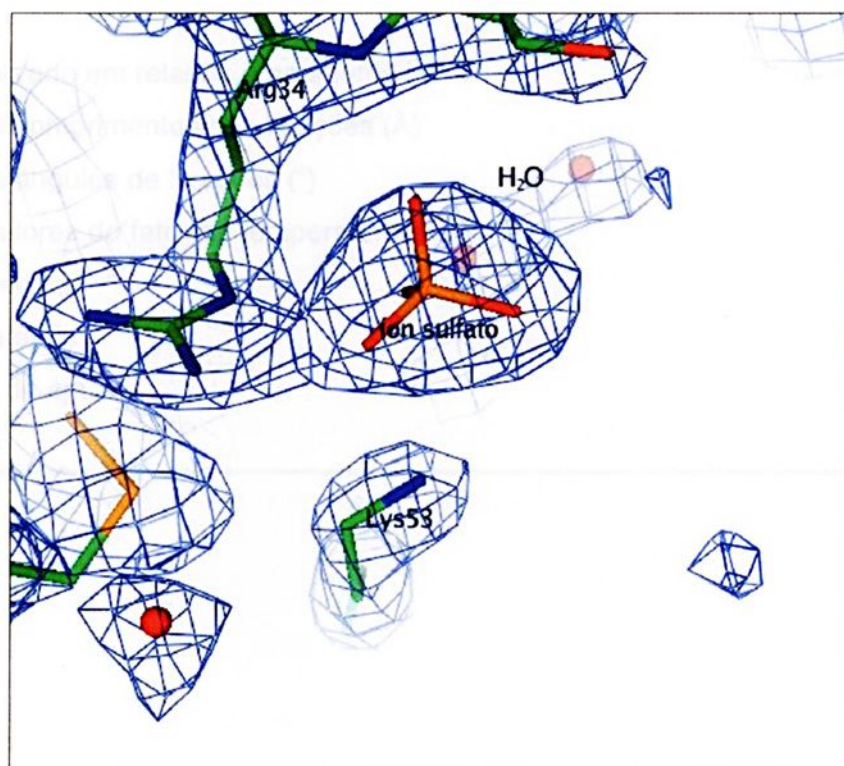


Figura 5.3.4 – Mapa de densidade eletrônica $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ (nível de contorno 1σ) na posição do íon sulfato.

Na etapa final do refinamento, foram inseridas automaticamente pelo programa ARP (pacote CCP4), as moléculas de água. Ajustes manuais foram feitos. De acordo com o mapa de densidade eletrônica $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ (nível de contorno 2σ), algumas moléculas de água foram manualmente retiradas por se tratar provavelmente de ruído. O refinamento foi interrompido quando valores mínimos para o R_{factor} e R_{free} foram atingidos. As estatísticas finais do refinamento são mostradas na tabela 5.3.1

Tabela 5.3.1-Valores dos coeficientes de confiabilidade e parâmetros estereoquímicos para a estrutura final da Anum-II, calculados pelo programa REFMAC5.

Estatísticas finais do refinamento da estrutura da Anum-II	
R_{factor} (%)	21,9
R_{free} (%)	27,0
Desvio observado em relação à geometria ideal	
R.m.s. dos comprimentos das ligações (Å)	0,02
R.m.s. dos ângulos de ligações (°)	1,9
Média dos valores do fator de temperatura (Å²)	
Cadeia principal	28,4
Cadeias laterais	29,2
Moléculas de água	53,1
Íon sulfato	57,5

CAPÍTULO 6

RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 DESCRIÇÃO DO MODELO CRISTALOGRÁFICO

A estrutura da Anum-II é constituída por 121 aminoácidos, um íon sulfato e 71 moléculas de água. De acordo com alguns padrões como seqüência de aminoácidos, estrutura secundária e pontes dissulfeto, a miotoxina-II é caracterizada como pertencente à classe II de PLA₂s secretadas (Renetseder *et al.*, 1985; Arni e Ward, 1996; Six e Dennis, 2000). Como em outras PLA₂s pertencentes a esta classe, a estrutura é estabilizada por sete pontes dissulfeto (resíduos 27:125, 29:45, 44:105, 50:133, 51:98, 61:91 e 84:96), apresentando como característica principal uma rígida plataforma formada por duas α -hélices antiparalelas (hélices 2 e 3, resíduos 37-54 e 90-109) interligadas por duas destas pontes. Os aminoácidos importantes para a hidrólise (com exceção do Asp49) permanecem conservados e se localizam nessas hélices (Figura 6.1.1).

A região do N-terminal (resíduos 1-17) forma parte do colar hidrofóbico e é altamente conservada nas miotóxicas Lys49-PLA₂s com a respectiva seqüência SLFELGKMILQETGKN. Embora substituições já tenham sido observadas, é a primeira vez (até o presente momento) que uma Lys49-PLA₂ apresenta um resíduo de asparagina (posição1) ao invés de uma serina. Substituição semelhante já foi observada para a Asp49-PLA₂ isolada do veneno da serpente *Agkistrodon piscivorus*

piscivorus (Maraganore e Heinrikson, 1986). Contudo, é improvável que este resíduo esteja relacionado com a atividade miotóxica, uma vez que a Anum-II apresenta os mesmos efeitos tóxicos que as outras enzimas desta família. Selistre e colaboradores têm sugerido o envolvimento dos resíduos Lys7, Glu12, Thr13 e Lys15, todos conservados na Anum-II, na atividade miotóxica (Selistre *et al.*, 1996).

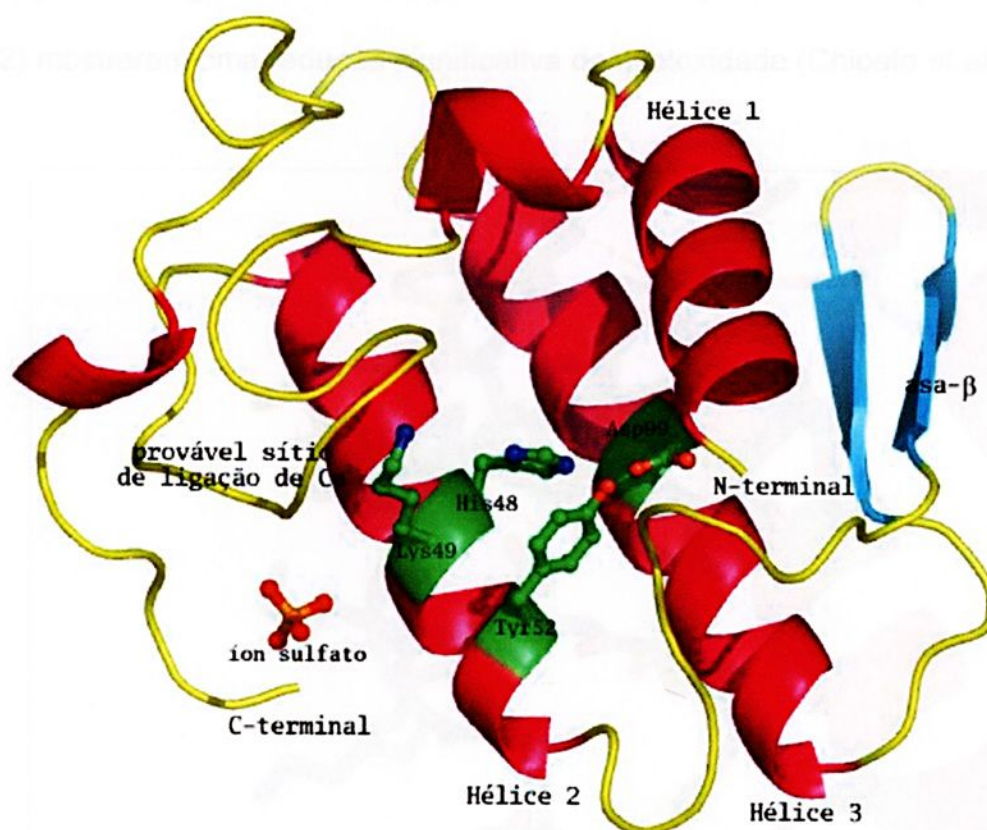


Figura 6.1.1 – Representação da estrutura cristalográfica da Anum-II. Com exceção do Asp49, todos os outros resíduos importantes na atividade catalítica se encontram conservados.

Vários experimentos têm identificado o C-terminal (115-133) (figura 6.1.2) como a região responsável pela atividade miotóxica nas Lys49-PLA₂s. A formação de um sítio catiônico nesta região é considerada envolvida na mediação de interações eletrostáticas com lipídios carregados negativamente. Experimentos

in vitro, utilizando peptídeos correspondentes a região 115-129 (KKYRYYLKPLCKK) da miotoxina-II da *Bothrops asper*, mostraram que a heparina (a qual se mostrou *in vivo* capaz de inibir a atividade miotóxica) se liga a esta região de caráter predominantemente catiônico (Lomonte *et al.*, 1994). Além disso, mutações sítio-dirigidas especificamente dos resíduos catiônicos e aromáticos (115-119) e a substituição das argininas e lisinas por alanina nas regiões 117-122 (exceto para a Lys122) mostraram uma redução significativa da miotoxidade (Chioato *et al.*, 2002).

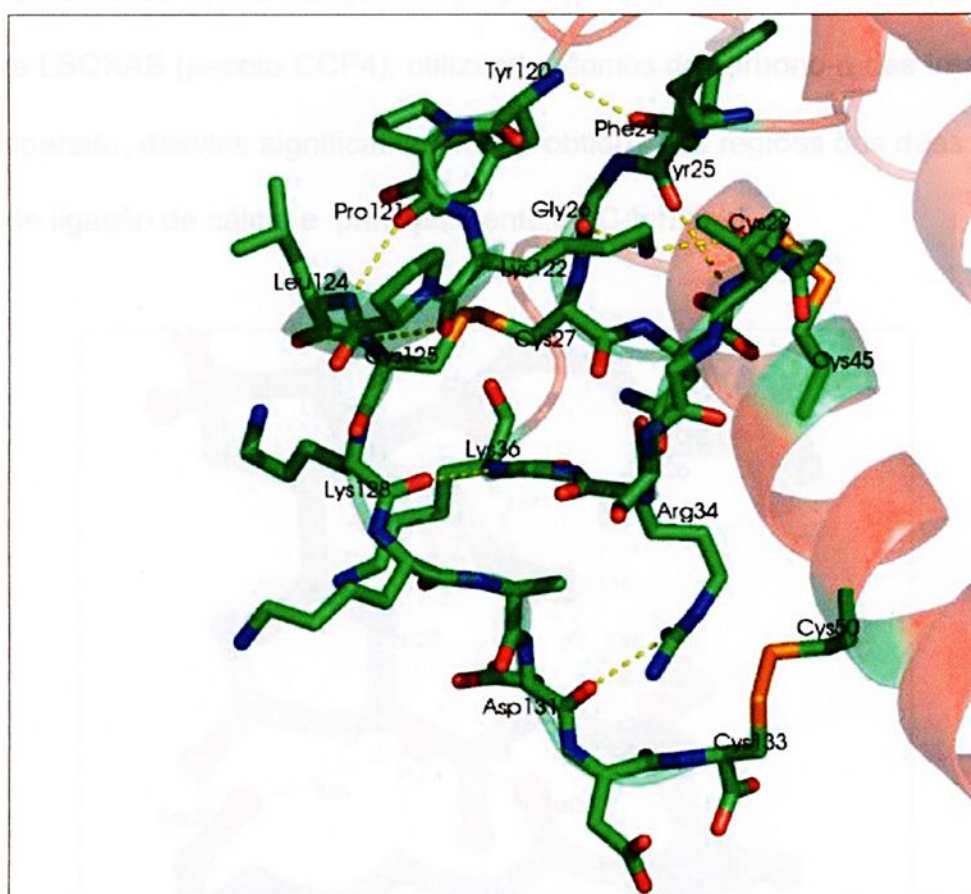


Figura 6.1.2 – Contatos entre o C-terminal e a região correspondente (nas Asp49-PLA₂s) ao sítio de ligação de cálcio. Participam das ligações de hidrogênio: o nitrogênio do grupo amida da Tyr120 com o oxigênio da carbonila da Phe24 (2,81 Å), o oxigênio da carbonila da Pro121 com o nitrogênio do grupo amida da Leu124 (3,00 Å), o nitrogênio do grupo amida da Cys29 com o oxigênio da carbonila da Tyr25 (3,15 Å), o nitrogênio (N ϵ) da cadeia lateral da Lys122 com os oxigênios das carbonilas dos resíduos Gly26 (2,69 Å) e Cys29 (2,87 Å), o nitrogênio do grupo amida da Cys125 com o oxigênio da carbonila da Lys122 (3,08 Å), o oxigênio da carbonila da Lys128 com o nitrogênio do grupo amida da Lys36 (2,93 Å) e o nitrogênio (N η 1) da Arg34 com o oxigênio da carbonila da Asp131 (3,02 Å). Há também duas pontes dissulfeto: Cys27-Cys125 e Cys50-Cys133.

A região correspondente ao sítio de ligação de cálcio nas Asp49-PLA₂s (25-33) é exibida em detalhes na figura 6.1.3. Como explicado anteriormente, a Anum-II é incapaz de ligar cálcio, já que o grupo ϵ -amino (N ζ) da Lys49 está ocupando a posição que seria do íon. A ausência desse cofator torna esta região muito flexível, assim como também a região da interface dimérica, onde estão localizadas as duas folhas- β antiparalelas (resíduos 74-84).

A figura 6.1.4 mostra o gráfico do desvio médio quadrático (r.m.s.d) entre a Anum-II e as outras Lys49-PLA₂s. A superposição (figura 6.1.5) foi feita por meio do programa LSQKAB (pacote CCP4), utilizando átomos de carbono- α das três hélices. Como esperado, desvios significativos foram obtidos nas regiões das duas folhas- β , do sítio de ligação de cálcio e principalmente do C-terminal.

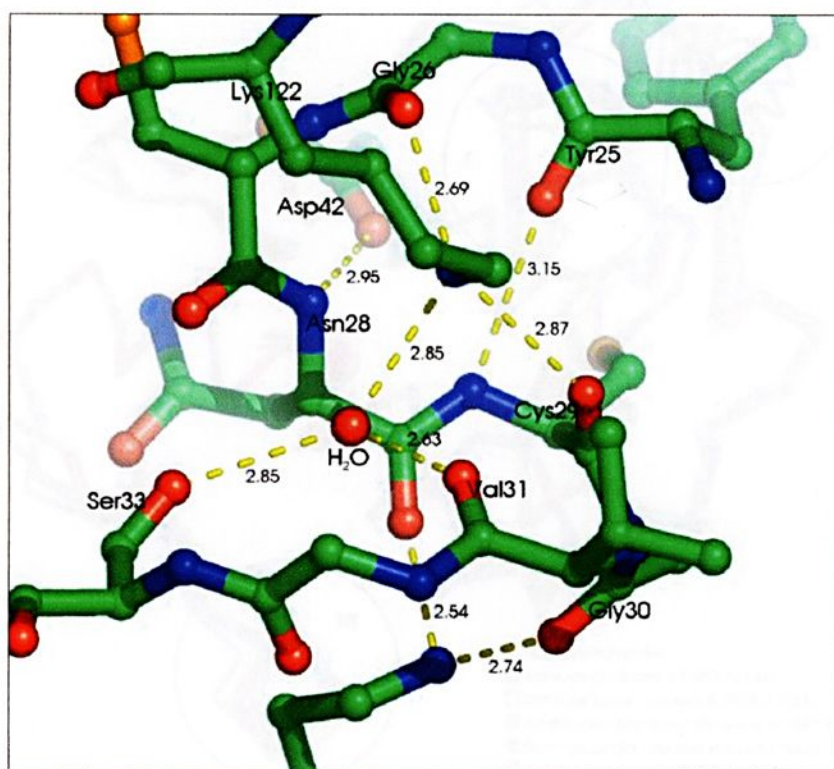


Figura 6.1.3 – Região correspondente (nas Asp49-PLA₂s) ao sítio de ligação de cálcio. Em destaque, estão as pontes de hidrogênio. As distâncias estão em angstroms.

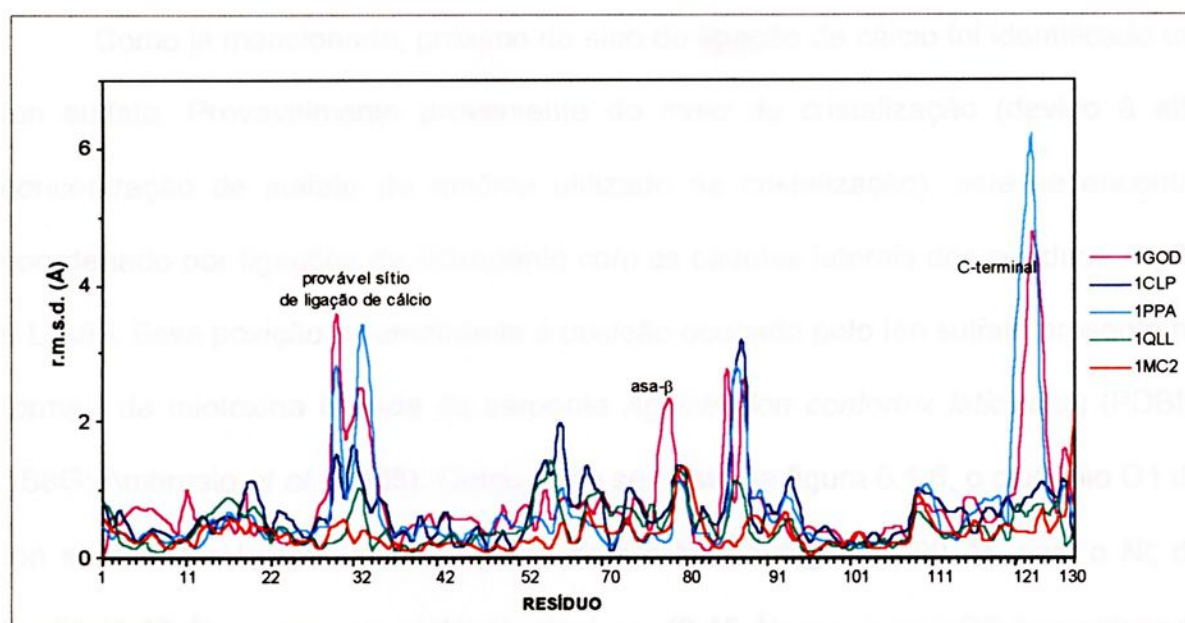


Figura 6.1.4 – R.m.s.d. entre a Anum-II e as outras Lys49-PLA₂ isoladas das serpentes *Bothrops godmani* (1GOD), *Bothrops asper* (1CLP – cadeia A), *Agkistrodon piscivorus piscivorus* (1PPA), *Bothrops pirajai* (1QLL – cadeia A) e *Agkistrodon acutus* (1MC2).

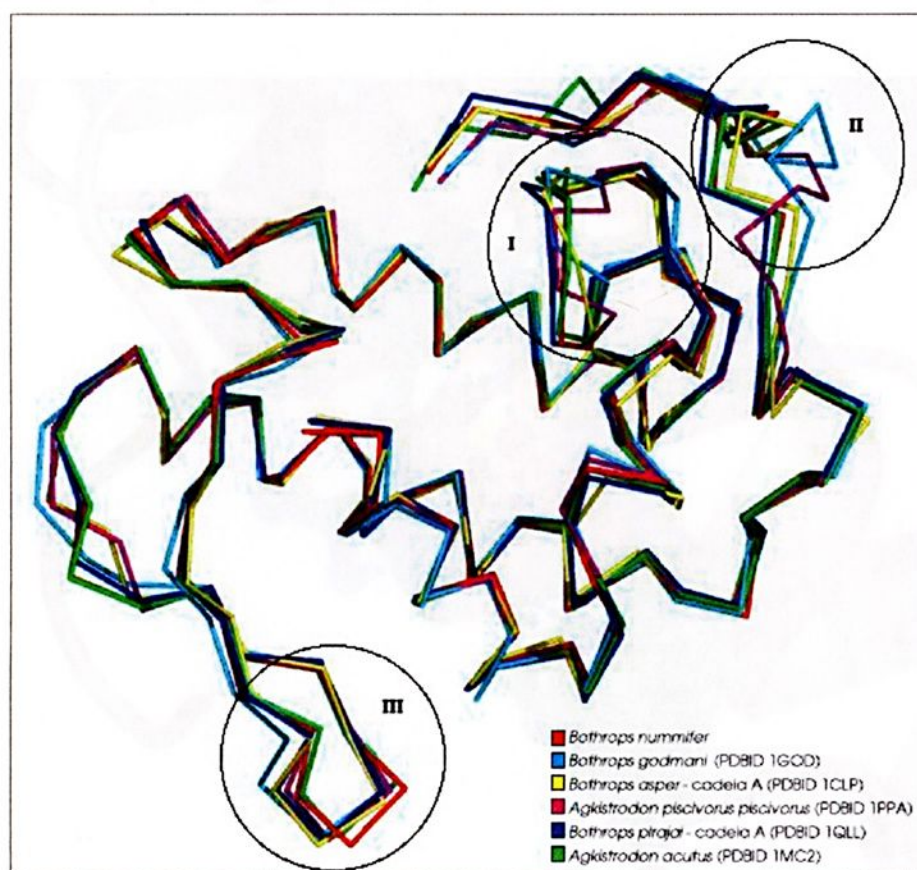


Figura 6.1.5 – Sobreposição da Anum-II com outras Lys49-PLA₂s. As principais diferenças estruturais ocorrem nas regiões I (sítio de ligação de cálcio), II (C-terminal) e III (região correspondente a interface dimérica, asa-β).

Como já mencionado, próximo do sítio de ligação de cálcio foi identificado um íon sulfato. Provavelmente proveniente do meio de cristalização (devido à alta concentração de sulfato de amônio utilizado na cristalização), este se encontra coordenado por ligações de hidrogênio com as cadeias laterais dos resíduos Arg34 e Lys53. Essa posição é semelhante à posição ocupada pelo íon sulfato presente na forma I da miotoxina isolada da serpente *Agkistrodon contortrix laticinctus* (PDBID 1S8G; Ambrosio *et al.*, 2005). Como pode ser visto na figura 6.1.6, o oxigênio O1 do íon sulfato, faz ligação de hidrogênio com o N ϵ da Arg34 (2,90 Å), com o N ζ da Lys53 (3,38 Å) e com uma molécula de água (2,45 Å), o oxigênio O2 é coordenado pelo grupo amida da Arg34 (3,02 Å) e o oxigênio O4 interage com o N ζ da Lys53 (3,38 Å) e com o N η 2 da Arg34 (2,68 Å).

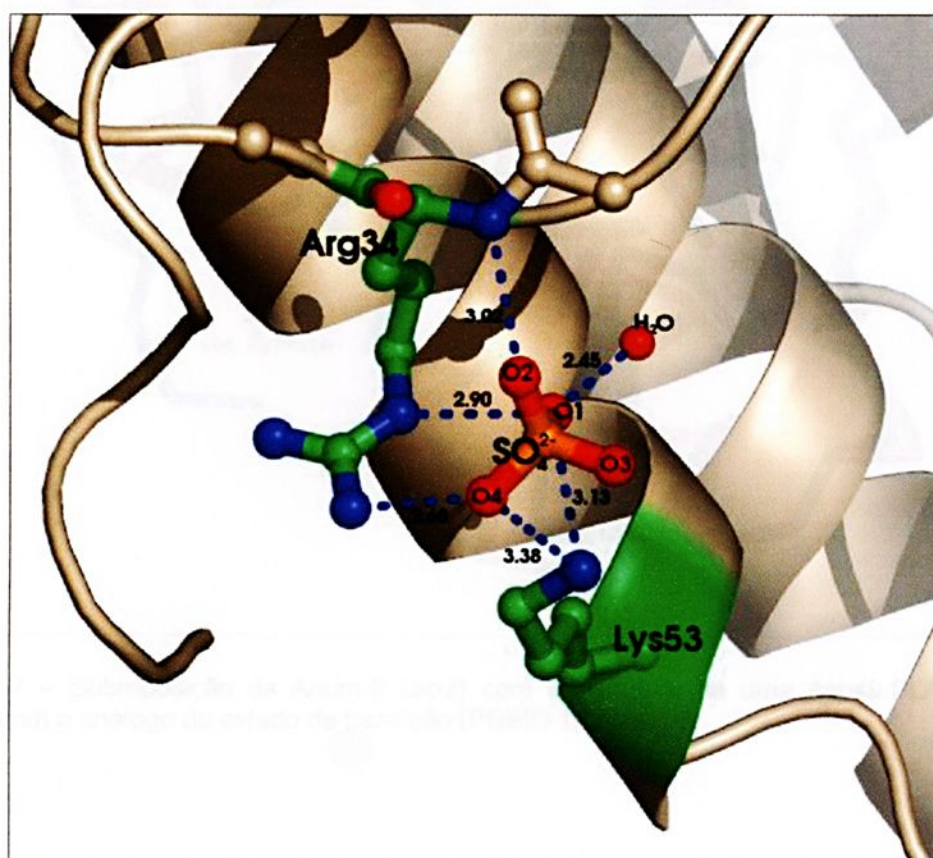


Figura 6.1.6 – Íon sulfato, proveniente do meio de cristalização.

A sobreposição da Anum-II com a estrutura de uma Asp49-PLA₂ em complexo com o análogo do estado de transição (PDBID 1POB, White *et al.*, 1990) mostrou que o íon sulfato, embora quimicamente semelhante ao grupo fosfato do análogo, ocupa uma posição diferente (figura 6.1.7). Essa posição ocupada pelo íon sulfato parece ser uma consequência do ambiente químico favorável, com fortes cargas positivas presentes naquela região, já que não há evidências que mostrem que essa posição seja relevante no processo catalítica.

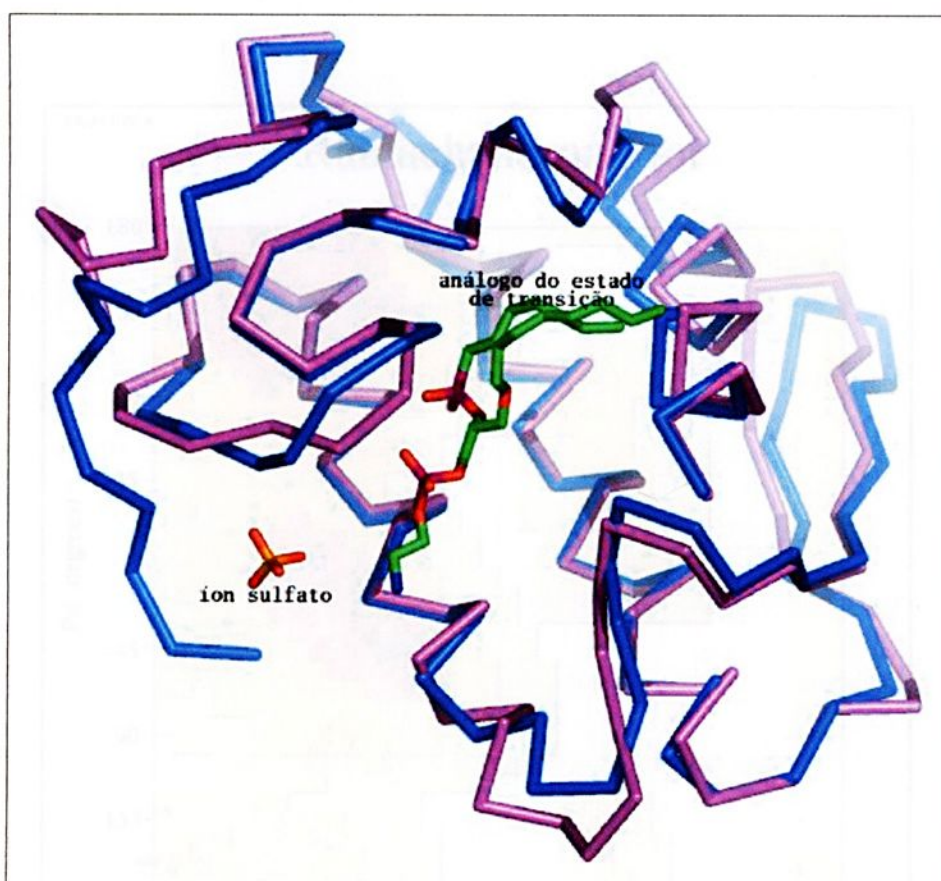


Figura 6.1.7 – Sobreposição da Anum-II (azul) com a estrutura de uma Asp49-PLA₂ (lilás) em complexo com o análogo do estado de transição (PDBID 1POB).

6.2 ANÁLISE DO MODELO

Os parâmetros estereoquímicos do modelo final foram analisados pelo programa PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993).

O modelo final apresentou boa configuração estereoquímica. O gráfico de Ramachandran, o qual afere as medidas dos ângulos diédricos ϕ e Ψ , indicou que 87% dos resíduos estão nas regiões mais favoráveis, 12% em regiões adicionalmente permitidas e somente 1% (Asp38, de acordo com a numeração de *Renetseder*, Asp39) em regiões generosamente permitidas (Figura 6.2.1).

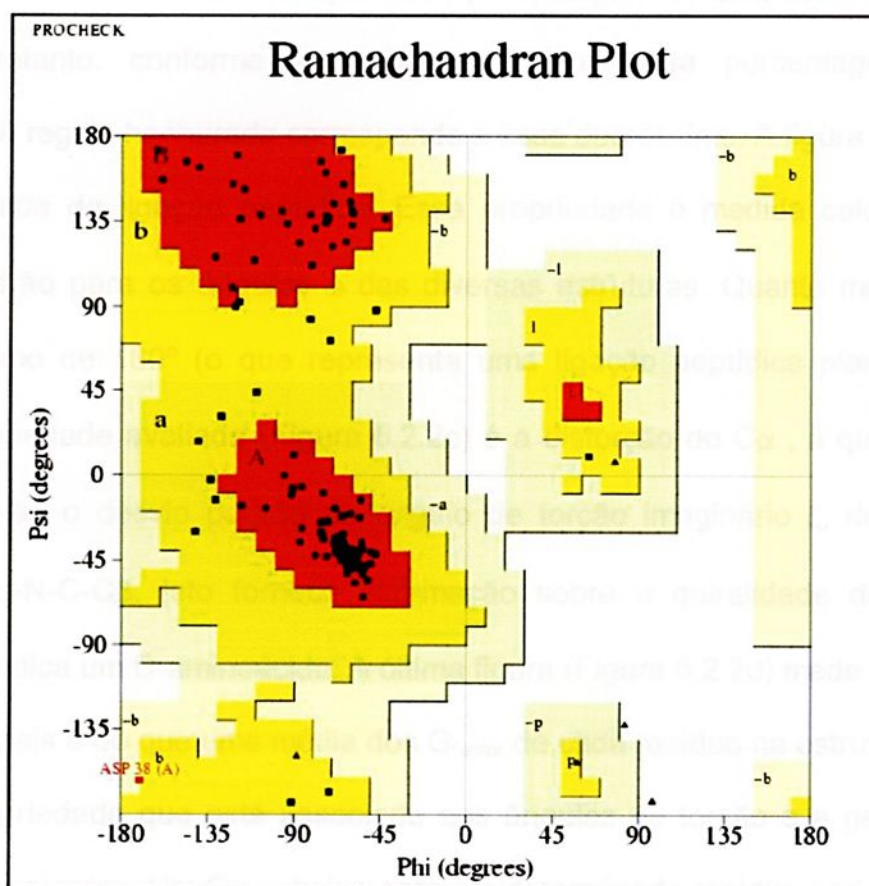


Figura 6.2.1- Diagrama de Ramachandran da molécula da miotoxina-II

Outras análises feitas pelo programa PROCHECK abordam parâmetros estereoquímicos da cadeia principal e mostram como a estrutura (indicada por um quadrado preto, figura 6.2.2) se comporta quando comparada com outras resolvidas na mesma resolução. A região hachurada representa a faixa de resultados obtida para essas estruturas, a linha central representa a média (em função da resolução), enquanto que a largura da banda corresponde à variação do desvio padrão sobre a média. Algumas propriedades são dependentes da resolução, já outras não.

A qualidade do diagrama de Ramachandran (Figura 6.2.2a) é medida pela porcentagem de resíduos que estão na região mais favorável do diagrama. Para um bom modelo obtido a alta resolução essa porcentagem deveria estar em torno de 90%, entretanto, conforme a resolução diminui, essa porcentagem também decresce. A região hachurada corresponde a esse decréscimo. A figura 6.2.2b avalia a planaridade da ligação peptídica. Essa propriedade é medida calculando-se o desvio padrão para os ângulos ω das diversas estruturas. Quanto menor o valor, mais próximo de 180° (o que representa uma ligação peptídica planar perfeita). Outra propriedade avaliada (Figura 6.2.2c) é a distorção do $C\alpha$, a qual é medida, calculando-se o desvio padrão do ângulo de torção imaginário ζ , definido pelos átomos $C\alpha-N-C-C\beta$. Isto fornece informação sobre a quiralidade dos $C\alpha$ e se negativo, indica um D-aminoácido. A última figura (Figura 6.2.2d) mede o G_{factor} total, que nada mais é do que uma média dos G_{factor} de cada resíduo na estrutura. O G_{factor} é uma propriedade que está associada aos ângulos de torção e a geometria das ligações covalentes. Um G_{factor} baixo para um determinado resíduo pode indicar, por exemplo, que a sua conformação tem pouca probabilidade de ocorrer. Pela análise

dessas figuras, observa-se que a estrutura da Anum-II está melhor em termos estereoquímicos do que a média das estruturas nesta mesma resolução.

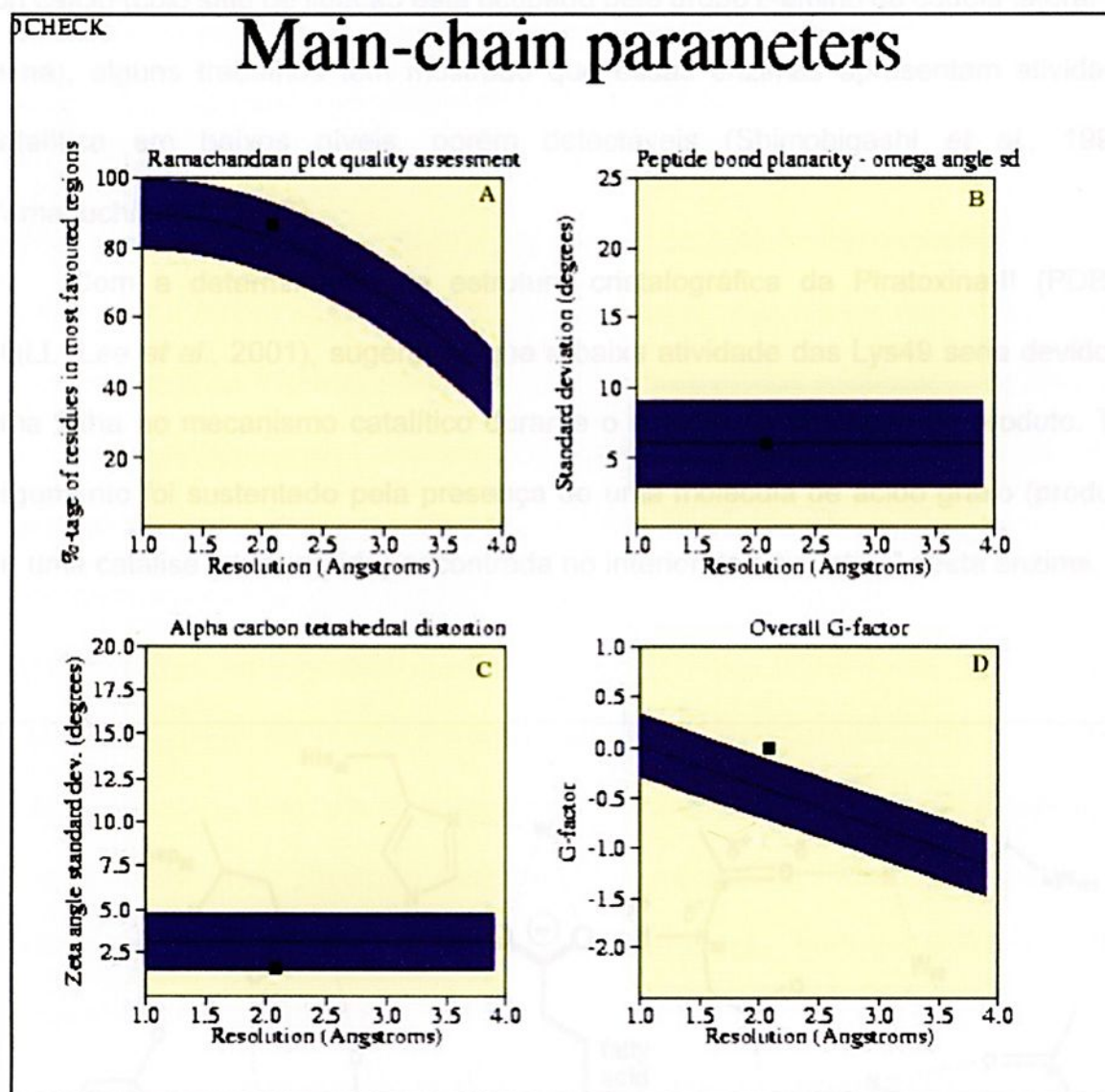


Figura 6.2.2- Estatísticas geradas pelo programa PROCHECK

6.3 ATIVIDADE CATALÍTICA X ATIVIDADE MIOTÓXICA

Embora as Lys49-PLA₂s sejam descritas como inativas devido à ausência do íon cálcio (cujo sítio de ligação está ocupado pelo grupo ϵ -amino da cadeia lateral da lisina), alguns trabalhos têm mostrado que essas enzimas apresentam atividade catalítica em baixos níveis, porém detectáveis (Shimohigashi *et al.*, 1995; Yamaguchi *et al.*, 1997).

Com a determinação da estrutura cristalográfica da Piratoxina-II (PDBID 1QLL; Lee *et al.*, 2001), sugeriu-se que a baixa atividade das Lys49 seria devido a uma falha no mecanismo catalítico durante o estágio de liberação do produto. Tal argumento foi sustentado pela presença de uma molécula de ácido graxo (produto de uma catálise interrompida) encontrada no interior do sítio “ativo” desta enzima.

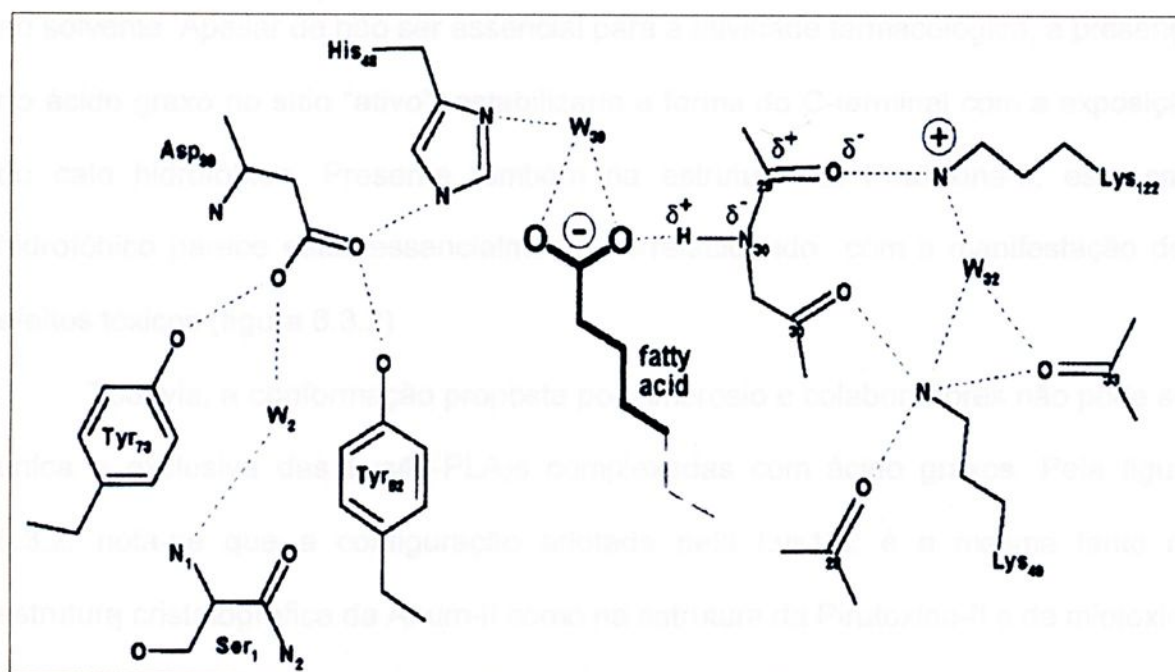


Figura 6.3.1- Sítio “ativo” da Piratoxina-II em complexo com um ácido graxo (PDBID 1QLL, Lee *et al.*, 2001).

Como pode ser visto na figura 6.3.1, a Lys122 (conservada em todas as Lys49-PLA₂s) seria a principal responsável pelo aumento da afinidade da enzima pelo ácido graxo. A interação deste resíduo com a carbonila da Cys29 estaria induzindo a polarização da ligação peptídica Cys29-Gly30 dificultando desta forma, a liberação do ácido graxo do interior do canal hidrofóbico.

Recentemente, com a identificação de uma outra molécula de ácido graxo no interior do sítio “ativo” da Lys49-PLA₂ do veneno da *Agkistrodon contortrix laticinctus* (PDBID 1S8G; Ambrosio *et al.*, 2005), foi proposto um mecanismo correlacionando a atividade catalítica residual destas enzimas com os efeitos miotóxico e de danos a membranas atribuídos ao C-terminal. De acordo com Ambrosio e colaboradores, a presença do ácido graxo no interior do sítio “ativo” (devido à ligação peptídica fortemente polarizada pela Lys122) deveria servir não apenas para ancorar na membrana, mas também para a exposição de resíduos hidrofóbicos do C-terminal ao solvente. Apesar de não ser essencial para a atividade farmacológica, a presença do ácido graxo no sítio “ativo”, estabilizaria a forma do C-terminal com a exposição do calo hidrofóbico. Presente também na estrutura da Piratoxina-II, este calo hidrofóbico parece estar essencialmente correlacionado com a manifestação dos efeitos tóxicos (figura 6.3.2)

Todavia, a conformação proposta por Ambrosio e colaboradores não pode ser única e exclusiva das Lys49-PLA₂s complexadas com ácidos graxos. Pela figura 6.3.2, nota-se que a configuração adotada pela Lys122 é a mesma tanto na estrutura cristalográfica da Anum-II como na estrutura da Piratoxina-II e da miotoxina isolada da *Agkistrodon contortrix laticinctus*. Mesmo os resíduos hidrofóbicos não sendo iguais, ainda assim observa-se a formação de um calo hidrofóbico na

estrutura da Anum-II, com a exposição das cadeias laterais dos resíduos, Pro121, Leu124 e Pro123 ao solvente (figura 6.3.3).

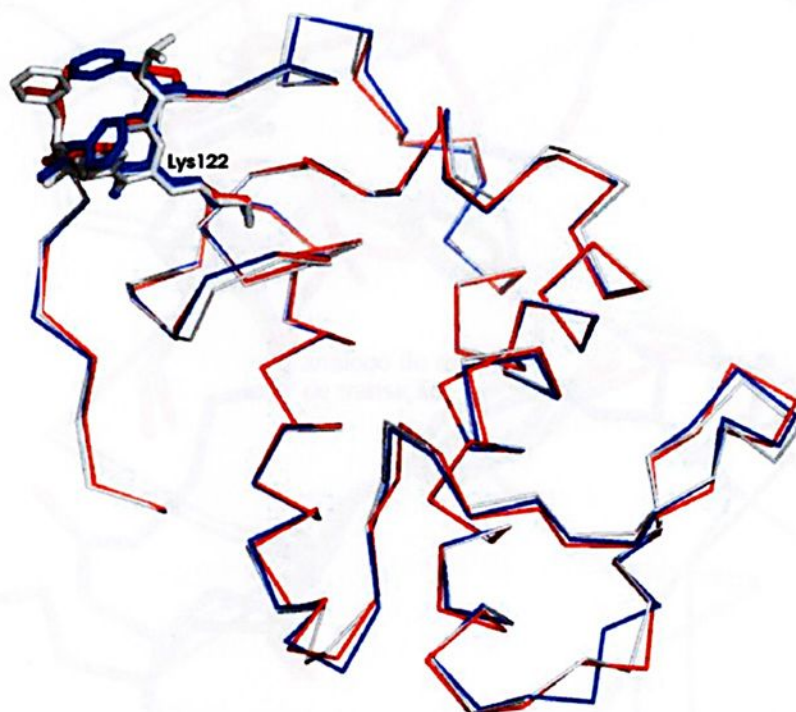


Figura 6.3.2 – Sobreposição da estrutura da Anum-II (vermelho) com as estruturas da Piratoxina-II (Branco) e da miotoxina ACL (azul). Em destaque está a Lys122, além dos resíduos que formam o calo hidrofóbico na Anum-II (Pro121/Pro123/Leu124), Piratoxina-II (Leu121/Pro123/Phe124) e miotoxina ACL (Phe121/Phe123).

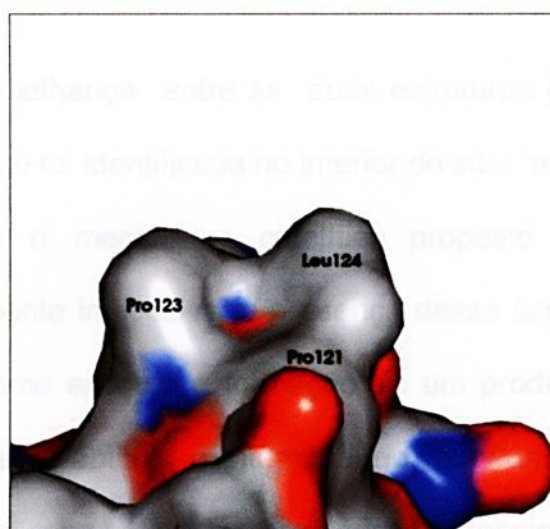


Figura 6.3.3 – Exposição de resíduos hidrofóbicos, mostrada através da superfície de van der Waals, em contato com o solvente. A região azul representa os nitrogênios, a região vermelha os oxigênios e a região branca os carbonos.

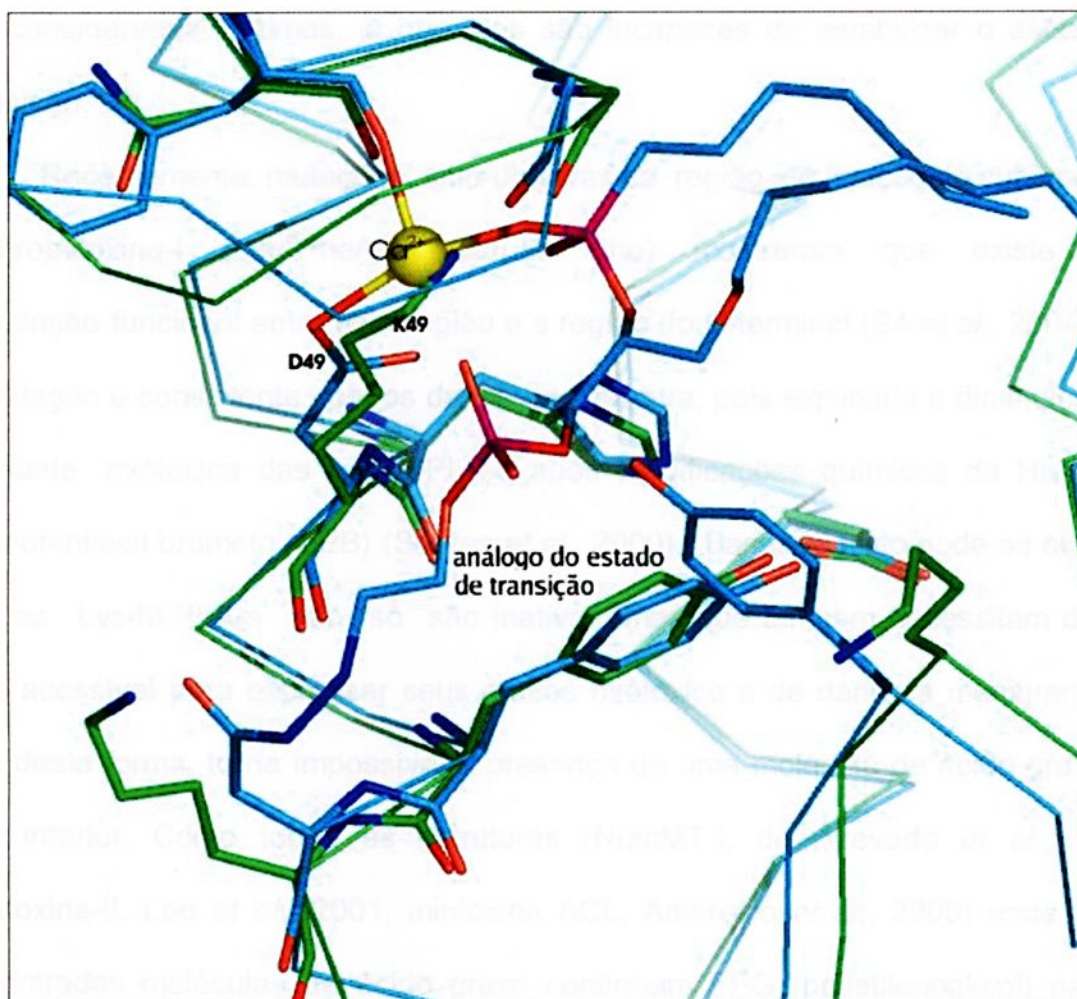


Figura 6.3.4 – Sobreposição da Anum-II (verde) com a estrutura de uma Asp49-PLA₂ (azul) em complexo com o análogo do estado de transição (PDBID 1POB). Como pode ser visto, só a lisina 49 não é capaz de estabilizar a carga do oxianion.

Apesar da semelhança entre as duas estruturas (figura 6.3.2), nenhuma molécula de ácido graxo foi identificada no interior do sítio “ativo” da Anum-II.

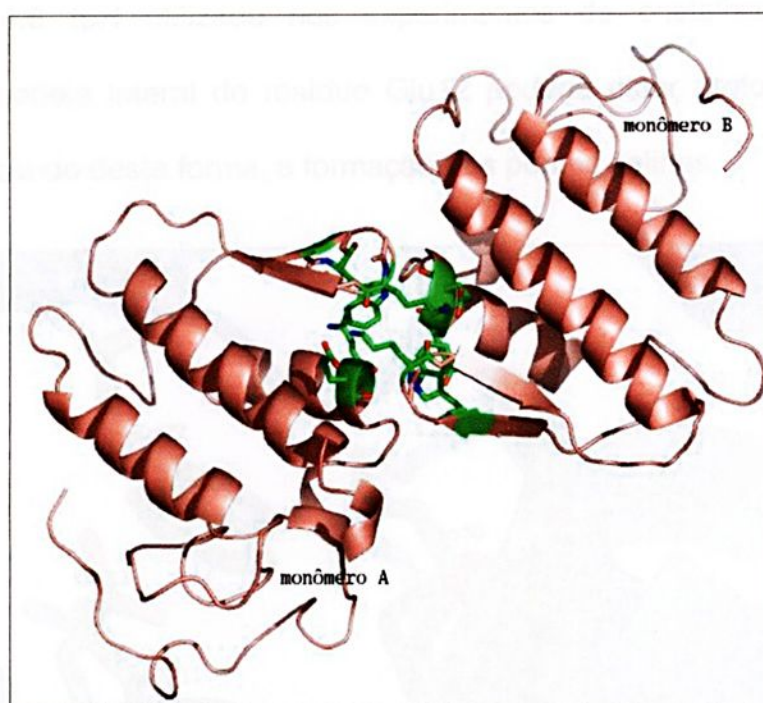
De acordo com o mecanismo catalítico proposto por Scott (Scott *et al.*, 1990), seria praticamente impossível a presença desse ácido graxo no interior do sítio “ativo”. Afinal, como explicar a formação de um produto se a enzima não é capaz nem mesmo de estabilizar o intermediário tetraédrico (figura 6.3.4). Como uma enzima deve ser capaz de ligar o estado de transição com uma afinidade superior a seu substrato ou a seu produto, certamente as Lys49-PLA₂s não podem

ser consideradas enzimas, já que elas são incapazes de estabilizar o estado de transição.

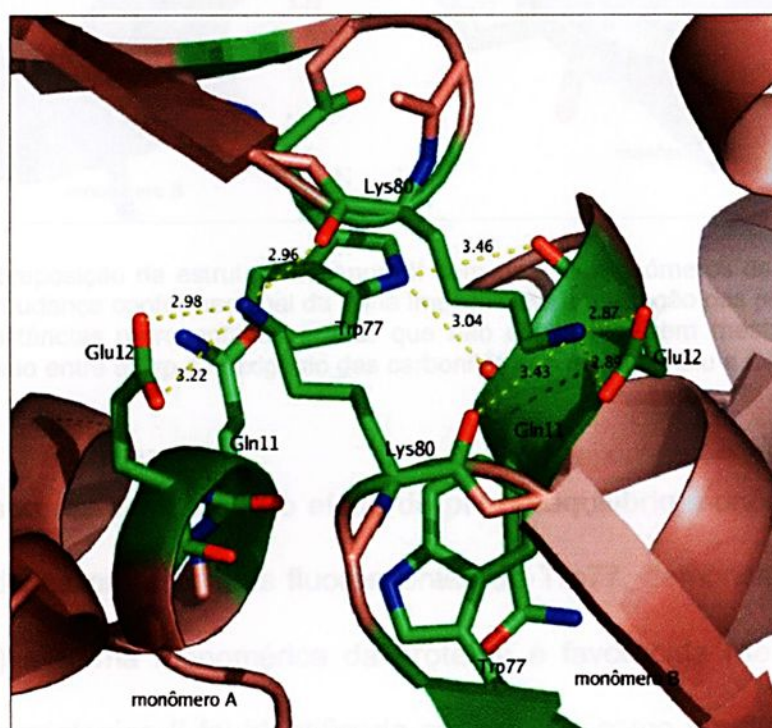
Recentemente, mutações sítio-dirigidas na região de ligação do substrato da Bothropstoxina-I (Leu⁵Phe/Val¹⁰²Ala/Leu¹⁰⁶Phe) mostraram que existe uma correlação funcional entre esta região e a região do C-terminal (Sá *et al.*, 2004). Tal correlação é consistente com os dados da literatura, pois explicaria a diminuição da atividade miótoxica das Lys49-PLA₂s após modificações químicas da His48 por bromofenilacil brometo (BPB) (Soares *et al.*, 2000). Baseado nisto pode-se concluir que as Lys49-PLA₂s não só são inativas, mas que também necessitam de um sítio acessível para expressar seus efeitos mióxico e de danos a membranas, o que desta forma, torna impossível a presença de uma molécula de ácido graxo no seu interior. Como todas as estruturas (NumMT-I, de Azevedo *et al.*, 1999; Piratoxina-II, Lee *et al.*, 2001; miotoxina ACL, Ambrosio *et al.*, 2005) onde foram encontradas moléculas de ácido graxo continham PEG (polietilenoglicol) na sua solução de cristalização é muito provável que a densidade observada no interior do sítio “ativo” seja correspondente a uma molécula de PEG e que a atividade catalítica residual seja o produto da contaminação destas com as ativas Asp49-PLA₂s.

6.4 DÍMERO X MONÔMERO

Estudos da interface dimérica da estrutura cristalográfica da Piratoxina-I (Azevedo *et al.*, 1998), Bothropstoxina-I (da Silva Giotto *et al.*, 1998) e da miotoxina-II da *Bothrops asper* (Arni *et al.*, 1995), têm identificado recíprocas interações envolvendo os resíduos Glu12, Trp77 e Lys80 de cada monômero. Estes resíduos (Figura 6.4.1), localizados na α -hélice N-terminal e nas duas folhas- β estão envolvidos na formação de ligações de hidrogênio e de pontes salinas que estabilizam a estrutura dimérica. (Ward *et al.*, 1998; Arni *et al.*, 1995; da Silva Giotto *et al.*, 1998). Embora eles sejam completamente conservados na Anum-II, a superposição da estrutura com os dois monômeros da BaspMT-II não mostrou qualquer tipo de interação que pudesse favorecer a formação do dímero. Como mostra a figura 6.4.2 a principal mudança conformacional ocorre na cadeia lateral da Lys80. Na realidade, nenhuma densidade foi observada para a cadeia lateral deste resíduo (figura 5.3.2), sendo impossível determinar a sua correta localização. Isto é característico de resíduos que se encontram expostos ao solvente e que apresentam uma alta flexibilidade, a qual poderia ser atribuída neste caso, a perda das pontes salinas envolvendo o resíduo Glu12. A dissociação dos dímeros (devido a perda destas interações) poderia ser uma consequência do pH utilizado nos experimentos de cristalização (Arni *et al.*, 1999). Este argumento também é suportado por outras estruturas monoméricas cristalizadas a pH ácido: a miotoxina-II isolada da serpente *Bothrops godmani*, obtida a pH 4,6 (Arni *et al.*, 1999), a miotoxina ACL isolada da serpente *Agkistrodon contortrix laticinctus* a pH 6,5 (PDBID 1S8G; Ambrosio *et al.*, 2005) e a Lys49-PLA₂ da serpente *Deinagkistrodon acutus* a pH 5,6 (PDBID 1MG6; Huang *et al.*, não publicado).



(a)



(b)

Figura 6.4.1-Interface dimérica da miotoxina-II isolada do veneno da serpente *Bothrops asper* (a). Em destaque (b), estão as possíveis ligações de hidrogênio e pontes salinas dos resíduos envolvidos na dimerização.

Em pH 4,6 (pH utilizado nos experimentos de cristalização), o ânion carboxilato da cadeia lateral do resíduo Glu12 poderia estar protonado, portanto neutro, inviabilizando desta forma, a formação das pontes salinas.

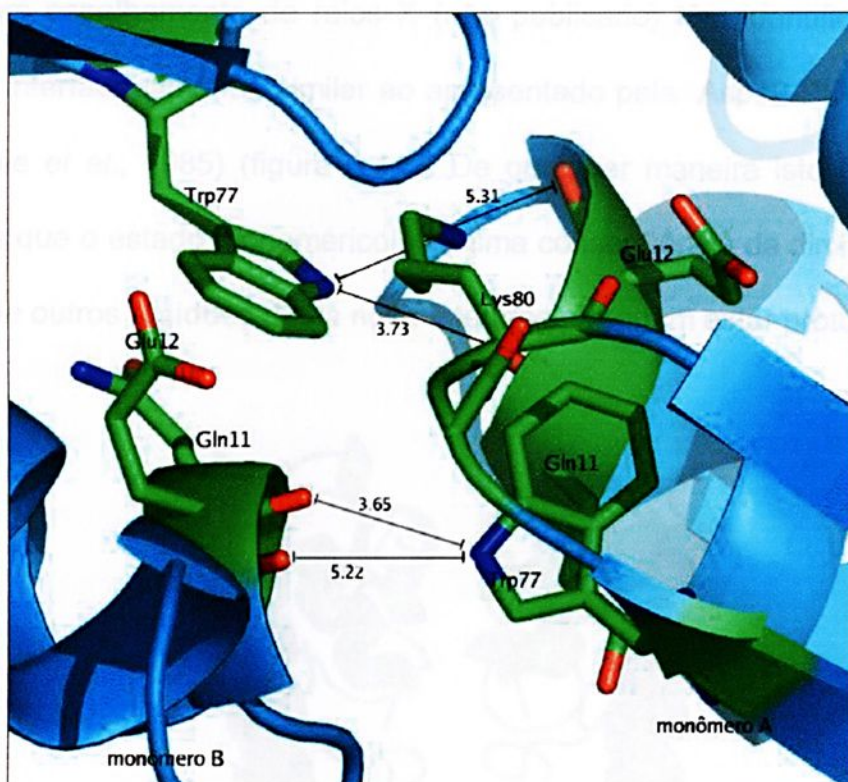


Figura 6.4.2 - Sobreposição da estrutura da Anum-II com os dois monômeros da BaspMT-II. Como pode ser visto, a mudança conformacional da lisina impossibilita a formação das pontes salinas. Note também, pelas distâncias representadas acima, que não é possível nem mesmo a formação de pontes de hidrogênio entre o Trp e o oxigênio das carbonilas dos resíduos Glu e Gln.

Além disso, estudos sobre o efeito do pH no equilíbrio monômero-dímero da BthTX-I, usando as propriedades fluorescentes do Trp77, demonstraram que a pH ácido (pH 5,0) a forma monomérica da proteína é favorecida (de Oliveira *et al.*, 2001). Como a miotoxina-II foi identificada em solução como um dímero (Angulo *et al.*, 2000), tudo indica que o estado monomérico observado por cristalografia de raios X, seja na verdade um artefato de cristalização, sendo a dissociação induzida pela diminuição do pH. Embora esta hipótese forneça uma explicação razoável para

a dissociação dos dímeros, os argumentos descritos neste trabalho se baseiam em uma interface estabelecida por ligações de hidrogênio e pontes salinas de configuração semelhante àquela exibida pela figura 6.4.1. Contudo, recentes estudos com espalhamento de raios X (não publicado) têm identificado um novo modelo de interface dimérica similar ao apresentado pela Asp49-PLA₂ da *Crotalus atrox* (Brunie *et al.*, 1985) (figura 6.4.3). De qualquer maneira isto não invalida a hipótese de que o estado monomérico seja uma consequência da diminuição do pH, uma vez que outros resíduos desta nova interface poderiam estar protonados.

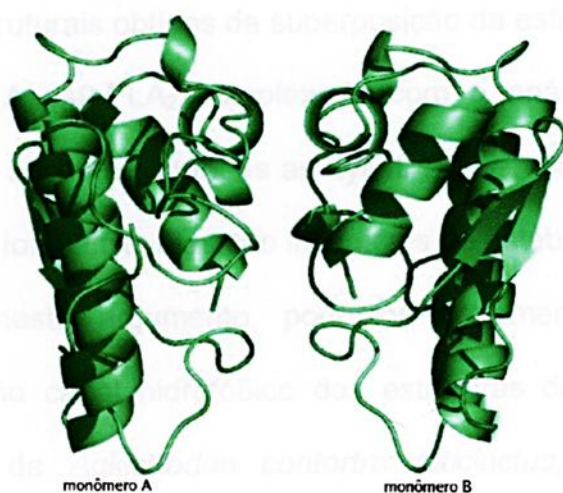


Figura 6.4.3 – Novo modelo de interface dimérica proposto em nosso laboratório para a miotoxina isolada do veneno da *Bothrops asper*. Ao contrário do modelo anterior, a região hidrofóbica de ligação do substrato lipídico não fica exposta ao solvente.

CAPÍTULO 7

CONCLUSÕES

A estrutura da miotoxina-II isolada do veneno da serpente *Bothrops nummifer* (Anum-II) foi determinada a 2.1 Å pelo método de substituição molecular e refinada até um residual cristalográfico de 22% ($R_{\text{free}} = 27\%$).

Os resultados estruturais obtidos da superposição da estrutura cristalográfica da Anum-II com uma Asp49-PLA₂ complexada com o análogo de estado de transição sugerem que, assim como todas as Lys49-PLA₂s, ela é inativa, uma vez que sem a presença do íon cálcio, elas são incapazes de estabilizar o intermediário tetraédrico. Baseado neste argumento, podemos certamente concluir que a densidade observada no canal hidrofóbico das estruturas da Piratoxina-II e da miotoxina do veneno da *Agkistrodon contortrix laticinctus*, seja na verdade, correspondente a uma molécula de PEG, já que este estava presente nas condições de cristalização de ambas as estruturas.

Com relação ao arranjo oligomérico, podemos inferir que independentemente do tipo de interface dimérica, a forma monomérica da Anum-II é provavelmente uma consequência do ambiente químico em que a proteína se encontra (particularmente pH e força iônica). Todavia, novos estudos do estado de oligomerização da Anum-II em força iônica baixa, sob diversas condições de pH, usando DLS ou espalhamento de raios X a baixo ângulo seriam necessários para confirmar isto.



APÊNDICE A

INTENSIDADE DE DIFRAÇÃO

Quando um feixe de raios X incide sobre um cristal, a intensidade espalhada por um determinado plano (hkl) é definida por:

$$I(hkl) = I_0 \lambda^3 [(e^4)/(r^2 m^2 c^4)] [LPA (V_x/V^2)] |F(hkl)|^2$$

Onde I_0 é a intensidade da radiação incidente, λ é o comprimento de onda da radiação, V_x é o volume do cristal, V é o volume da cela unitária, m e e são a massa e carga do elétron, $|F(hkl)|$ é o módulo (amplitude) do fator de estrutura e r é a distância cristal-detector. L , P e A representam respectivamente o fator de Lorentz, o fator de polarização e o fator de absorção. Observe que o fator de massa no denominador justifica o desprezo pela dispersão do núcleo, uma vez que a massa do próton é aproximadamente 2000 vezes maior que a massa do elétron.

ESPALHAMENTO POR UM ÁTOMO

O espalhamento de raios X por um átomo está relacionado com o número de elétrons e com suas posições na nuvem eletrônica. A densidade eletrônica na posição $\mathbf{r}$ em relação ao centro do átomo é denotada por $\rho(\mathbf{r})$. A radiação espalhada por um elemento de volume dV a uma distância $\mathbf{r}$ terá, portanto, amplitude $\rho(\mathbf{r}) dV$ e diferença de fase $2\pi / \lambda \mathbf{r} \cdot \mathbf{S}$ (onde $\mathbf{S} = (\mathbf{s} - \mathbf{s}_0) / \lambda$). Considerando-se que a densidade eletrônica é esfericamente simétrica, somando-se sobre todos os elementos

de volume, obtemos a radiação espalhada por um átomo.

$$f(\mathbf{S}) = \int \rho(\mathbf{r}) \exp(2\pi i \mathbf{r} \cdot \mathbf{S}) d\mathbf{v}$$

Esta expressão representa o fator de espalhamento atômico, que na prática são calculados usando mecânica quântica. Valores para o fator de espalhamento atômico podem ser encontrados em tabelas. Esses valores estão relacionados com o tipo de átomo e com o ângulo de espalhamento, sendo independente do comprimento da radiação incidente.

FATOR DE ESTRUTURA

Considere um átomo j à distância $\mathbf{r}_j$ da origem da cela unitária. O fator de espalhamento desse átomo é definido como:

$$\mathbf{f}_j = \int \rho(\mathbf{r}) \exp[2\pi i (\mathbf{r} + \mathbf{r}_j) \cdot \mathbf{S}] d\mathbf{v}$$

$$\mathbf{f}_j = f_j \exp(2\pi i \mathbf{r}_j \cdot \mathbf{S})$$

Expressões similares podem ser obtidas para todos os átomos na cela unitária. O espalhamento total é a soma do espalhamento de cada átomo que a constitui

$$F(\mathbf{S}) = \sum \mathbf{f}_j$$

$$F(\mathbf{S}) = \sum f_j \exp(2\pi i \mathbf{r}_j \cdot \mathbf{S})$$

Como as coordenadas dos átomos podem ser reescritas como frações dos lados da cela unitária, a posição do j ésimo átomo é dada por:

$$\mathbf{r}_j = a\mathbf{x}_j + b\mathbf{y}_j + c\mathbf{z}_j$$

Utilizando as relações de Laue,

$$(2\pi / \lambda) (\mathbf{a} \cdot \mathbf{S}) = 2\pi h / \lambda$$

$$(2\pi / \lambda) (\mathbf{b} \cdot \mathbf{S}) = 2\pi k / \lambda$$

$$(2\pi / \lambda) (\mathbf{c} \cdot \mathbf{S}) = 2\pi l / \lambda$$

o produto $\mathbf{r}_j \cdot \mathbf{S}$ pode ser definido como:

$$\begin{aligned} \mathbf{r}_j \cdot \mathbf{S} &= x_j \mathbf{a} \cdot \mathbf{S} + y_j \mathbf{b} \cdot \mathbf{S} + z_j \mathbf{c} \cdot \mathbf{S} \\ &= h x_j + k y_j + l z_j \end{aligned}$$

Reescrevendo $F(\mathbf{S})$, obtemos:

$$F(hkl) = \sum f_j \exp 2\pi i (h x_j + k y_j + l z_j)$$

Esta é a equação do Fator de estrutura. Ela representa a radiação total espalhada por uma cela unitária e pode ser escrita também em termos da amplitude $|F(hkl)|$ e da fase $\varphi(hkl)$.

$$F(hkl) = |F(hkl)| \exp [2\pi i \varphi(hkl)]$$

FATOR DE TEMPERATURA

A expressão desenvolvida para o cálculo do fator de espalhamento é válida somente para átomos a temperatura zero Kelvin. Como as mudanças na temperatura afetam o movimento térmico dos átomos e conseqüentemente as intensidades de espalhamento, este valor deve ser multiplicado por um termo dependente da temperatura.

$$f = f^0 \exp[-B(\sin^2\theta/\lambda^2)]$$

onde f é o fator de espalhamento corrigido, f^0 é o fator de espalhamento calculado para um dado átomo a zero Kelvin e B (isotrópico) = $8\pi^2 \langle u^2 \rangle$ (onde $\langle u^2 \rangle$ representa o deslocamento médio quadrático de um átomo em torno da sua posição de equilíbrio). A expressão acima, conhecida como equação de Debye-Waller, apenas reduz a intensidade dos picos, não interferindo em sua forma.

DENSIDADE ELETRÔNICA

A densidade eletrônica pode ser obtida a partir da expressão do fator de estrutura, o qual pode ser reescrito como um somatório contínuo sobre todo o volume da cela unitária.

$$F(S) = \int \rho(\mathbf{r}) \exp 2\pi i \mathbf{r}_j \cdot \mathbf{S} d\mathbf{v}$$

Multiplicando ambos os lados da expressão acima por $\exp -2\pi i \mathbf{r}_j \cdot \mathbf{S}$ e integrando sobre todo o volume do espaço de difração (espaço recíproco), obtemos a densidade eletrônica da cela unitária:

$$\rho(\mathbf{r}) = \int F(S) \exp -2\pi i \mathbf{r}_j \cdot \mathbf{S} d\mathbf{v}$$

Substituindo esta integral por um somatório sobre os três índices h , k , e l , temos:

$$\rho(xyz) = 1/V \sum \sum \sum F(hkl) \exp -2\pi i(hx + ky + lz)$$

$$\rho(xyz) = 1/V \sum \sum \sum |F(hkl)| \exp -2\pi i[hx + ky + lz - \phi(hkl)]$$

Pela expressão acima é possível calcular a densidade eletrônica para cada posição (xyz) da cela unitária. Entretanto, como do padrão de difração só é possível

obter as intensidades e conseqüentemente os fatores de estrutura ($I(hkl) \propto |F(hkl)|^2$), outros métodos (como por exemplo substituição molecular) devem ser empregados na obtenção dos ângulos de fase perdidos durante o experimento.

FUNÇÃO DE PATTERSON

A função de Patterson é importante por que ela pode ser calculada sem considerar a informação de fase. Em resumo, a função de Patterson fornece um mapa vetorial. Esses vetores podem ser intramoleculares (de um molécula a outra) ou intermoleculares (vetores entre átomos da mesma molécula). Ela é definida por:

$$P(\mathbf{u}) = \int_{\text{volume da cela unitária}} \rho(\mathbf{u}) \rho(\mathbf{r} + \mathbf{u}) d\mathbf{v}$$

ou

$$P(uvw) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |F(hkl)|^2 \cos[2\pi(hu + kv + lw)]$$

Onde uvw são as coordenadas no espaço (cela) de Patterson

FUNÇÃO DE ROTAÇÃO

A função de rotação é usada para encontrar a orientação correta da molécula modelo (proteína utilizada para a obtenção preliminar das fases) dentro do retículo cristalino. Isto é feito comparando-se os vetores intermoleculares de Patterson da molécula alvo $P(\mathbf{u})$ (obtidos das amplitudes dos fatores de estrutura da proteína em análise) com os da molécula modelo a diferentes orientações $P_r(\mathbf{u})$. A superposição

de $P(\mathbf{u})$ com $P_r(\mathbf{u})$ define a função de rotação, sendo o valor máximo obtido quando os dois grupos vetoriais possuírem a mesma orientação.

$$R(\alpha\beta\gamma) = \int_{\substack{\text{volume} \\ \text{da cela} \\ \text{unitária}}} P(\mathbf{u}) \times P_r(\mathbf{u})$$

A função de rotação explora o fato de que os vetores intermoleculares só dependem da orientação da molécula (ou seja, dos ângulos de rotação) e não da sua posição na cela unitária.

FUNÇÃO DE TRANSLAÇÃO

Embora os ângulos de rotação ($\alpha\beta\gamma$) tenham sido determinados, resta ainda, encontrar os parâmetros translacionais. A translação necessária para posicionar corretamente a proteína modelo pode ser encontrada a partir da função de translação:

$$T(\mathbf{t}) = \int_{\substack{\text{volume} \\ \text{da cela} \\ \text{unitária}}} P_{\text{calc}}(\mathbf{u}, \mathbf{t}) \times P_{\text{obs}}(\mathbf{u}) d\mathbf{u}$$

Onde $P_{\text{calc}}(\mathbf{u})$ é a função de Patterson observada, $P_{\text{obs}}(\mathbf{u})$ é a função de Patterson calculada e $\mathbf{t}$ a translação aplicada sobre as coordenadas do modelo. Quando o modelo estiver posicionado corretamente, a função deverá ter picos com valores correspondentes aos vetores intramoleculares.

Entretanto, a melhor maneira para se encontrar a translação é através do método de tentativa e erro. A molécula modelo é transladada dentro da unidade assimétrica, para cada nova posição, fatores de estrutura (amplitudes) são

calculados e comparados com os fatores de estrutura observados. O correto posicionamento fornece o menor valor de R_{factor} . Outros parâmetros, tais como o coeficiente de correlação, também são utilizados para medir essa concordância.

$$R = \frac{\sum_{hkl} \left| |F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}| \right|}{\sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|} \quad CC = \frac{\sum_{hkl} \left(|F_{\text{obs}}|^2 - \overline{|F_{\text{obs}}|^2} \right) \times \left(|F_{\text{calc}}|^2 - \overline{|F_{\text{calc}}|^2} \right)}{\left[\sum_{hkl} \left(|F_{\text{obs}}|^2 - \overline{|F_{\text{obs}}|^2} \right)^2 \sum_{hkl} \left(|F_{\text{calc}}|^2 - \overline{|F_{\text{calc}}|^2} \right)^2 \right]^{1/2}}$$

R_{FACTOR} & R_{FREE}

O R_{factor} expressa a concordância entre as amplitudes observadas $|F_{\text{obs}}|$ derivada das intensidades de cada reflexão ($F_{\text{obs}} \propto (I_{\text{obs}})^{1/2}$), e as amplitudes calculadas $|F_{\text{calc}}|$ correspondentes a estrutura refinada.

O R_{factor} pode ser utilizado para medir o progresso do refinamento e a qualidade do modelo. Entretanto é preciso ser cauteloso, o R_{factor} não deve ser usado como único critério, uma vez que esse valor também depende da resolução, da completeza e da precisão dos dados observados. Em média, estruturas refinadas a uma resolução de 2,0 Å apresentam o R_{factor} em torno de 20%. Como o R_{factor} pode ser minimizado artificialmente, um pequeno grupo de intensidades (5% a 10%), são escolhidas aleatoriamente e separadas do processo de refinamento. Esse conjunto de teste é utilizado no cálculo (de maneira análoga ao R_{factor}) de um novo fator conhecido como R_{free} .

$$R_T^{\text{free}} = \frac{\sum_{hkl \in T} \left| |F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}| \right|}{\sum_{hkl \in T} |F_{\text{obs}}|}$$

APÊNDICE B

ANUM-II (miotoxina-II isolada do veneno da serpente *Bothrops nummifer*)

Classificação: E.C.3.1.1.4, definida pela Enzyme Nomenclature, NC-IUBMB, Academic Press, New York, (1992).

Características Físico-Químicas (Protparam: <http://us.expasy.org/cgi-bim/protparam>)

Fórmula química: C₅₉₅H₉₂₈N₁₆₂O₁₈₀S₁₅

Número de aminoácidos: 121 (1880 átomos)

Peso molecular: 13711,7

PI teórico: 8,71

Seqüência de aminoácidos

NLYQLWKMIL QETGKNAAPS YGFYGCNCGV GSRGKPKDAT DRCCFVHKCC YKALTD CSPK
TDSYSYSWKD KTIVCGKNNP CLKQECECDK AVAICLRDNL DTYNKNYKIY PKPLCKKADD
C

AMINOÁCIDO	QUANTIDADE	PORCENTAGEM
Ala (A)	7	5.8%
Arg (R)	3	2.5%
Asn (N)	8	6.6%
Asp (D)	10	8.3%
Cys (C)	14	11.6%
Gln (Q)	3	2.5%
Glu (E)	3	2.5%
Gly (G)	7	5.8%
His (H)	1	0.8%
Ile (I)	4	3.3%
Leu (L)	8	6.6%
Lys (K)	17	14.0%
Met (M)	1	0.8%
Phe (F)	2	1.7%
Pro (P)	6	5.0%
Ser (S)	6	5.0%
Thr (T)	6	5.0%
Trp (W)	2	1.7%
Tyr (Y)	9	7.4%
Val (V)	4	3.3%

REFERÊNCIAS

Adams, P.D., Pannu, N.S., Read, R.J. and Brünger, A.T. (1997) Cross-validated maximum likelihood enhances crystallographic simulated annealing refinement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 5018-5023.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402.

Ambrosio, A.L.B., Nonato, M.C., Selistre De Araujo, H.S., Arni, R.K., Ward, R.J., Ownby, C.L., De Souza, D.H.F., Garratt, R.C. (2205) A molecular mechanism for Lys49-phospholipase A₂ activity based on ligand-induced conformational change. *J. Biol. Chem.* **280**, 7326 –7335.

Angulo, Y., Olamendi-Portugal, T., Possani, L.D. and Lomonte, B. (2000) Isolation and characterization of myotoxin II from *Artropoides (Bothrops) nummifer* snake venom, a new Lys49 phospholipase A₂ homologue. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **32**, 63-71.

Arni, R.K., Ward, R.J., Gutiérrez, J.M. and Tulinsky, A. (1995) Structure of a calcium-independent phospholipase-like myotoxic protein from *Bothrops asper* venom. *Acta Cryst.* **D51**, 311-317.

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

Arni, R. K., Fontes M. R. M., Barberato C., Gutiérrez, J. M., Díaz, C. and Ward R. J. (1999) Crystal structure of myotoxin-II, a monomeric Lys49-phospholipase homologue isolated from the venom of *Cerrophidion (Bothrops) godmani*. *Arch. Biochem. Biophys.* **366**, 177-182.

de Azevedo Jr., W.F., Ward, R.J., Canduri, F., Soares, A., Giglio, J.R. and Arni, R.K. (1998) Crystal structure of Piratoxin-I: a calcium independent, myotoxic phospholipase homologue from *Bothrops pirajai* venom. *Toxicon* **36**, 1395-1406.

de Azevedo Jr., W.F., Ward, R.J., Gutiérrez, J.M. and Arni, R.K. (1999) Structure of a Lys49-phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of *Bothrops nummifer* (jumping viper). *Toxicon* **37**, 371-384.

van den Bergh, L.L.M., Slotboom, A.J., Verheij, H.M. and de Haas, G.H. (1989) The role of Asp-49 and other conserved amino acids in phospholipases A₂ and their importance for enzymatic activity. *J. Cell. Biochem.* **39**, 379-390.

Bezzine, S., Koduri, R.S., Valentin, E., Murakami, M., Kudo, I., Ghomashchi, F., Sadilek, M., Lambeau, G. and Gelb, M.H. (2000) Exogenously added human group X-secreted phospholipase A₂ but not the group IB, IIA, and V enzymes efficiently release arachidonic acid from adherent mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 3179-319.

Blundell, T.L. and Johnson, L.M. (1976) *Protein Crystallography*, ed. Academic Press.

Brunie, S., Bolin, J., Gewirth, D. and Sigler, P.B. (1985) The refined crystal structure of the dimeric phospholipase A₂ at 2.5 Å. *J. Biol. Chem.* **260**, 9742-9749.

Chioato, L., Oliveira, A.H.C., Ruller, R., Sá, J.M. and Ward, R.J. (2002) Distinct sites for myotoxic and membrane-damaging activities in the C-terminal region of a Lys49-phospholipase A₂. *Biochem. J.* **366**, 971-976.

Collaborative Computational Project, Number 4 (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Cryst.* **D50**, 760-763.

van Deenen, L.L.M. and de Haas, G.H. (1963) The substrate specificity of phospholipase A₂. *Biochim. Biophys. Acta* **70**, 538-553.

Dijkstra, B.W., Kalk, J.H., Hol, W.G. and Drenth, J. (1981) Structure of bovine pancreatic phospholipase A₂ at 1.7 Å resolution. *J Mol Biol.* **147**, 97-123.

Drenth, J. (1999) *Principles of X-ray Crystallography*, 2nd ed. Heidelberg: Springer.

Ducruix, A. & Giegé, R. (1999) *Crystallization of proteins and nucleic acids: a practical approach*, 2nd ed. Oxford: IRL press.

Evans, P.R. (1997) *Joint CCP4 and ESF-EACBM Newsletter* **33**, 22-24.

Giacovazzo, C. (1992) *Fundamentals of Crystallography*, ed. Oxford University Press.

Gutiérrez, J. M. and Chaves, F. (1980) Efectos proteolítico, hemorrágico y mionecrótico de los venenos de serpientes costarricenses de los generos *Bothrops*, *Crotalus* y *achesis*. *Toxicon* **18**, 315-321.

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

International Tables for Crystallography Vol. A (1992) Kluwer Academic, 3th edition.

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

Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S. and Thornton, J.M. (1993) PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* **26**, 283-291.

Lee, W.-H., da Silva Giotto, M.T., Marangoni, S., Toyama, M.H., Polikarpov, I. and Garrat, R.C. (2001) Structural basis for low catalytic activity in Lys49-phospholipase A₂ – a hypothesis: the crystal structure of piratoxin II complexed to fatty acid. *Biochemistry* **40**, 28-36.

Leslie, A.G.W. (1992) *Joint CCP4 and EACMB Newsletter Protein Crystallography*, 26. Daresbury Laboratory, Warrington, UK.

Li, Y., Yu, B.-Z., Zhu, H., Jain, M. K. and Tsai, M.-D. (1994) Phospholipase A₂ engineering. Structural and functional roles of the highly conserved active residue Aspartate-49. *Biochemistry* **33**, 14714-14722.

Lomonte, B., Moreno, E., Tarkowski, A., Hanson, L.A. and Maccarana, M. (1994) Neutralizing interaction between heparin and myotoxin II, a Lys49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modelling. *J. Biol. Chem.* **269**, 29867-29873.

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

Maraganore, J.M. and Heinrickson, R.L. (1986) The lysine-49 phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*. Relation of structure and function to other phospholipases A₂. *J. Biol. Chem.* **261**, 4797-4804.

McPherson, A. (1982) *Preparation and Analysis of Protein Crystals*, ed. Wiley, New York.

McPherson, A., Malkin, A.J. and Kuznetsov, Y.G. (1995) The science of macromolecular crystallization. *Science* **3**, 759-768.

Murshudov, G. N., Vagin, A. A. and Dodson, E. J. (1997) Refinement of macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method. *Acta Cryst.* **D53**, 240-255.

de Oliveira, A.H.C., Giglio, J.R., Andrião-Escarso, S.H., Ito, A.S. and Ward, R.J. (2001) A pH-induced dissociation of the dimeric form of a lysine 49-phospholipase A₂ abolishes Ca²⁺-independent membrane-damaging activity. *Biochemistry* **40**, 6912-6920.

Polikarpov, I., Perles, L.A., de Oliveira, R.T., Oliva, G., Castellano, E.E., Garrat, R.C. and Craievich, A. (1998) Set-up and experimental parameters of the protein crystallography beamline at the brazilian national synchrotron laboratory. *J. Synch. Rad.* **5**, 72-76.

Renetseder, R., Brunie, S., Dijkstra, B.W., Drenth, J. and Sigler, P.B. (1985) A comparison of the crystal structures of phospholipase A₂ from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. *J. Biol. Chem.* **260**, 11627-11636.

Roussel, A. and Cambillau, C. (1991) Silicon Graphics Geometry Partners Directory, Silicon Graphics, Mountain View, CA, 86-89.

Sá, J.M., Chioato, L., Ferreira, T.L., de Oliveira, A.H.C., Ruller, R., Rosa, J.C., Greene, L.J. and Ward, R.J. (2004) Topology of the substrate-binding site of a Lys49-phospholipase A₂ influences Ca²⁺-independent membrane-damaging activity. *Biochem.* **382**, 191-198.

Scott, D.L., White, S.P., Otwinowski, Z., Yuan, W., Gelb, M.H. and Sigler, P.B. (1990) Interfacial catalysis : the mechanism of phospholipase A₂. *Science* **250**, 1541 –1546.

Scott, D.L., Achari, A., Vidal, J.C., Sigler, P.B., (1992) Crystallographical and biochemical studies of the (inactive) Lys49 phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*. *J. Biol. Chem.* **267**, 22645–2265.

Selistre-de-Araujo, H.S., White, S.P. and Ownby, C.L. (1996) cDNA cloning and sequence analysis of a lysine-49 phospholipase A₂ myotoxin from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom. *Arch. Biochem. Biophys.* **326**, 21-30.

Shimohigashi, Y., Tani, A., Matsumoto, H., Nakashima, K., Yamaguchi, Y., Oda, N., Takano, Y., Kamiya, H., Kishino, J., Arita, H. and Ohno, M. (1995) Lysine-49 phospholipases A₂ from *Trimeresurus flavoviridis* venom are membrane-acting enzymes. *J. Biochem. (Tokyo)* **118**, 1037–1044.

da Silva Giotto, M.T., Garrat, R.C., Oliva, G., Mascarenhas, Y.P., de Azevedo, W.F., Jr., Giglio, J.R., Cintra, A.C.O., Arni, R.K. and Ward, R.J. (1998) Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: conformational changes in bothropstoxin I, a dimeric Lys49-phospholipase A₂ homologue. *Prot. Struct. Funct. Genet.* **30**, 442-454.

Six, D.A. and Dennis, E. A. (2000) The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes : classification and characterization. *Biochim. Biophys. Acta* **1488**, 1-19.

Soares, A.M., Guerra-Sá, R., Borja-Oliveira, C.R., Rodrigues, V.M., Rodrigues-Simioni, L., Rodrigues, V., Fontes, M.R.M., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M. and Giglio, J.R. (2000) Dissociation of enzymatic and pharmacological properties of piratoxins-I and -III, two myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops pirajai* snake venom. *Arch. Biochem. Biophys.* **378**, 210-219.

Solórzano, A. (1989) Distribución y aspectos reproductivos de la mano de piedra, *Bothrops nummifer* (Serpentes: Viperidae), en Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* **37**, 133-137.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gilson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.

Vagin, A. A. and Teplyakov, A. (1997) MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Cryst.* **30**, 1022-1025.

Verheij, H.M., Volwerk, J.J., Jansen, E.H., Puyk, W.C., Dijkstra, B.W., Drenth, J. and de Haas, G.H. (1980) Methylation of histidine-48 in pancreatic phospholipase A₂. Role of histidine and calcium ion in the catalytic mechanism. *Biochemistry* **19**, 743-750.

Wang, X., Yang, J., Gui, L., Lin, Z., Chen, Y. and Zhou, Y. (1996) Crystal structure of an acidic phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon halys pallas*. *J. Mol. Biol.* **255**, 669-676.

Ward, R.J., de Azevedo, W.F., Jr. and Arni, R.K. (1998) At the interface: crystal structures of phospholipases A₂. *Toxicon* **36**, 1623-1633.

Watanabe, L., Angulo, Y., Lomonte, B. and Arni R. K. (2004) Crystallization of the Lys49-PLA₂ homologue, myotoxin-II from the venom of *Atropoides nummifer* *Biochim. Biophys. Acta* **1703**, 87-89.

Yamaguchi, Y., Shimohigashi, Y., Chiwata, T., Tani, A., Chijiwa, T., Lomonte, B. and Ohno, M. (1997) Lys-49-phospholipases A₂ as active enzyme for beta-arachidonoyl phospholipid bilayer membranes. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **43**, 19–26.

Yuan, W. and Gelb, M.H. (1988) Phosphonate-Containing Phospholipid Analogues: Synthesis and Inhibition Studies with Phospholipase A₂. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 2665.



* Todas as figuras de representação de moléculas foram feitas utilizando o programa **PyMOL** vs. 0.86 (Warren L. DeLano “ The PyMOL Molecular Graphics System “ DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA, USA). [http:// www.pymol.org](http://www.pymol.org)



