



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



ESTUDOS ESTRUTURAIS DE COMPLEXOS ENTRE
FOSFOLIPASES A_2 HOMÓLOGAS ISOLADAS DO VENENO DE
Bothrops moojeni E INIBIDORES DA ATIVIDADE MIOTÓXICA

GUILHERME HENRIQUE MARCHI SALVADOR

BOTUCATU – SP

2016



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

ESTUDOS ESTRUTURAIS DE COMPLEXOS ENTRE
FOSFOLIPASES A_2 HOMÓLOGAS ISOLADAS DO VENENO DE
Bothrops moojeni E INIBIDORES DA ATIVIDADE MIOTÓXICA

CANDIDATO: GUILHERME HENRIQUE MARCHI SALVADOR

ORIENTADOR: MARCOS ROBERTO DE MATTOS FONTES

CO-ORIENTADOR: JULIANA IZABEL DOS SANTOS

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para a obtenção
do título de Doutor no Programa de Pós
Graduação em Ciências Biológicas (Genética)

BOTUCATU – SP

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Salvador, Guilherme Henrique Marchi.

Estudos estruturais de complexos entre fosfolipases A2 homólogas isoladas do veneno de Bothrops moojeni e inibidores da atividade miotóxica / Guilherme Henrique Marchi Salvador.
- Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Marcos Roberto de Mattos Fontes
Coorientador: Juliana Izabel dos Santos
Capes: 20901003

1. Bothrops. 2. Fosfolipases. 3. Serpente peçonhenta - Peçonha. 4. Animais venenosos. 5. Cristalografia de raios X.

Palavras-chave: Bothrops moojeni; Cristalografia de raios X; Fosfolipases A2 homólogas; Inibidores da atividade miotóxica; Venenos de serpentes.

*aos meu pais: Eliana e Prudente
aos meus irmãos Daniela e Luciano
à minha companheira Paula
ao meu amigo e orientador Marcos*

Agradecimentos

Ao meu orientador, Marcos Fontes, pela amizade e todas as palavras de sabedoria ditas e orientação profissional transmitidos durante estes anos de trabalho.

À Juliana, por sua ajuda e dedicação como co-orientadora, além de sua amizade e conselhos profissionais e pessoais.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) que financiou este projeto de pesquisa (Processo 2012/10830-8).

Ao CNPEM (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron) pela disposição das instalações para a realização dos experimentos de coleta de dados de difração de raios X.

Aos amigos do LBBC Guilherme, Letícia, Luiz Augusto, Márcio, Pedro, Rafael e Tahila por todos os momentos de descontração e ajuda neste e outros trabalhos.

Aos colegas e amigos do laboratório Andréa, Antoniel, Carlos, Eloah, Fábio, Fábio Matioli, Giovanna, Natália e Rafael por todas as trocas de conhecimento e pelos momentos de descontração.

Aos colegas Thiago R. Dreyer e Walter L. G. Cavalcante, pela colaboração nos experimentos apresentados neste trabalho, além da amizade e conselhos em meu caminho profissional.

Ao colega e amigo Lino F. de Lima, pela sua ajuda profissional nos experimentos de expressão de proteínas.

Aos meus queridos irmãos, Daniela (obrigado pelos conselhos pessoais e profissionais) e Luciano, que sua falta é indescritível.

À minha amada mãe, Eliana, por todo apoio dado durante esse e outros períodos importantes de minha vida e, em memória, ao meu amado pai Prudente.

À minha querida e amada companheira Paula, por todo apoio emocional e espiritual durante todos estes anos em que estamos juntos.

Estudos estruturais de complexos entre fosfolipases A₂ homólogas isoladas do veneno de *Bothrops moojeni* e inibidores da atividade miotóxica

Serpentes do gênero *Bothrops* representam cerca de 90% dos acidentes ofídicos que ocorrem no Brasil. Um componentes presente em venenos de serpentes são as fosfolipases A₂ (PLA₂s), que podem apresentar diversas atividades biológicas. Diversos estudos com PLA₂s e PLA₂s-homólogas de venenos de serpentes buscam melhor compreender o mecanismo da ação miotóxica, sugerindo diferentes sítios de ação. Neste trabalho, são apresentados estudos com PLA₂s-homólogas do veneno de *Bothrops moojeni*, conhecida popularmente como caíçaca. A miotoxina II (MjTX-II) foi estudada na forma nativa, complexada com ácidos graxos e os inibidores ácido rosmarínico e suramina, enquanto a miotoxina I (MjTX-I) foi estudada em complexo com o ligante suramina. Para a obtenção dos dados, foram utilizadas diferentes técnicas biofísicas como espalhamento dinâmico de luz, calorimetria por titulação isotérmica e cristalografia de raios X. Estes estudos foram complementados com estudos funcionais por técnicas miográficas e estudos computacionais por dinâmica molecular realizados por outros membros do Laboratório de Biologia Molecular Estrutural. As estruturas cristalográficas da MjTX-II nativa e complexada com ácidos graxos revelaram particularidades para esta toxina, como a independência da ligação de ácidos graxos na estrutura para a sua ativação - alinhamento dos resíduos importantes para a atividade miotóxica. A estrutura da MjTX-II com o ácido rosmarínico revelou que o ligante interage com uma das regiões relacionada com a atividade miotóxica da toxina, o que possivelmente explica a inibição da atividade miotóxica da toxina por técnicas miográficas e está de acordo com mecanismo previamente proposto. Dados cristalográficos do complexo MjTX-II/suramina mostram que há duas moléculas inibidoras interagindo com os sítios relacionados a atividade miotóxica da proteína, o que auxilia na formação de um oligômero induzido pela molécula inibidora corroborando com outros experimentos biofísicos e funcionais. A estrutura cristalográfica do complexo MjTX-I/suramina foi obtida a alta resolução, mostrando mudança oligomérica da forma tetramérica (nativa) para a forma dimérica, com a presença do ligante entre os monômeros, corroborando com dados de calorimetria obtidos.

Palavras-chave: Venenos de serpentes; fosfolipases A₂ homólogas; *Bothrops moojeni*; inibidores da atividade miotóxica; cristalografia de raios X.

Structural studies of complex between phospholipases A₂ homologues isolated from *Bothrops moojeni* venom and myotoxic activity inhibitors

Bothrops genus represents approximately 90% of the ophidian accidents that occur in Brazil. One of the compounds of the venom is the phospholipases A₂ (PLA₂s), which are proteins with a wide range of biological activities. Several studies with PLA₂s and PLA₂-homologues from snake venom were performed to better understanding the myotoxic mechanism, suggesting different activity sites. This work presents studies with PLA₂s-homologues isolated from *Bothrops moojeni*, known in Brazil as caçaca. The myotoxin II (MjTX-II) was studied in native, complexes to fatty acids, rosmarinic acid and suramin inhibitors. Myotoxin I (MjTX-I) was studied complexed to suramin. X-ray crystallography, dynamic light scattering and isothermal titration calorimetry were used to characterize the protein and complexes. Furthermore, functional studies by myographic techniques and computational studies using molecular dynamics were performed by other members of the Laboratory. Crystallographic structures of MjTX-II in native form and complexes to fatty acids reveals particularities for these toxin, such as the independence of the fatty acids binding for myotoxic residues alignment. The structure of MjTX-II complexed to rosmarinic acid showed that this ligand interact to a of regions related to myotoxic activity of toxin, which probably explaining its inhibitory action demonstrated by myographic techniques and is according to previous proposed mechanism. Crystallographic data of the MjTX-II/suramin complex shows two inhibitor molecules interacting to toxin surface, inducing its oligomerization and corroborating with other biophysical experiments. In contrast, MjTX-I/suramin complex crystal structure displayed an oligomeric change from the tetrameric (native) to dimeric structure.

Keywords: Snake venom; phospholipases A₂ homologue; *Bothrops moojeni*; myotoxic activity inhibitor; X-ray crystallography

Sumário

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. Acidentes Ofídicos	10
1.2. Fosfolipases A₂ e Fosfolipases A₂ homólogas	10
1.3. Moléculas inibidoras da mionecrose	13
1.4. <i>Bothrops moojeni</i> e miotoxinas I e II	14
2. OBJETIVOS	16
3. MÉTODOS	18
3.1. Purificação das toxinas	19
3.2. Estudos funcionais	19
3.3. Espalhamento de Luz Dinâmico	20
3.4. Cromatografia de exclusão molecular analítica	22
3.5. Calorimetria de Titulação Isotérmica	22
3.6. Experimentos de Dinâmica Molecular	24
3.7. Ensaio de cristalização	25
3.8. Coleta de dados de difração de raios X	27
3.9. Processamento e refinamento dos dados	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1. Purificação das toxinas MjTX-I e MjTX-II	31
4.2. Estudos com a MjTX-II nativa e dos complexos MjTX-II/ácidos graxos	33
<i>4.2.1. Papel dos ácidos graxos na estrutura da MjTX-II e nas Lys49PLA₂s e evidências estruturais para a independência de ácido graxo para a ativação da MjTX-II</i>	37
4.3. Complexo da MjTX-II com o inibidor ácido rosmarínico	41
4.4. Complexo MjTX-II/suramina	48
<i>4.4.1. Oligomerização da estrutura da MjTX-II/suramina</i>	48
<i>4.4.2. Evidências estruturais para a inibição da MjTX-II pela suramina</i>	56
4.5. Complexo da toxina MjTX-I com o ligante suramina	60
<i>4.5.1. Bases estruturais para a inibição da MjTX-I pela suramina</i>	67
4.6. Inibição das PLA₂s homólogas por diferentes moléculas	69
5. CONCLUSÃO	71
<i>5.1. Perspectivas futuras</i>	73

6. REFERÊNCIAS	74
7. ANEXOS	80
7.1. Produção da toxina PrTX-I na forma recombinante	81
7.2. Artigos publicados em periódicos no período de doutorado	90

Lista de Figuras

Figura 1: Duas possíveis conformações de dímeros na rede cristalina das Lys49-PLA ₂ s.	12
Figura 2: Compostos inibidores da atividade miotóxica.	14
Figura 3: Esquema simplificado do funcionamento de um equipamento de DLS.	21
Figura 4: Representação esquemática do experimento de microcalorimetria.	23
Figura 5: Esquema representativo dos métodos de difusão de vapor.	26
Figura 6: Modo em que o cristal é colocado ao <i>loop</i> de <i>nylon</i> .	27
Figura 7: Figura esquemática que representa o processo da coleta de dados por difração de raios X.	28
Figura 8: Cromatograma do veneno bruto de <i>B. moojeni</i> em troca iônica e gel de poliacrilamida a 13 % das frações correspondentes as toxinas de interesse.	31
Figura 9: Cromatograma dos picos correspondentes à MjTX-I e MjTX-II submetidos a fase reversa e gel de poliacrilamida a 13%.	31
Figura 10: Monocristais de MjTX-II nativa e crescidos na presença de ácidos graxos.	33
Figura 11: Estruturas cristalográficas da MjTX-II nativa e dos complexos MjTX-II/ácidos graxos e os respectivos mapas de densidade eletrônica dos ligantes.	36
Figura 12: Alinhamento de sequências de aminoácidos das Lys49-PLA ₂ s do gênero <i>Bothrops</i> com estruturas cristalográficas conhecidas.	37
Figura 13: Alteração estrutural que modifica a região da ligação Tyr119-Tyr119.	38
Figura 14: Ligações de hidrogênio Tyr119A-Tyr119B.	39
Figura 15: Localização dos íons sulfatos nas estruturas cristalográficas das Lys49-PLA ₂ s.	40
Figura 16: Gráfico que representa a amplitude das contrações de forma indireta.	41
Figura 17: Titulação calorimétrica de ácido rosmarínico em MjTX-II.	42
Figura 18: Monocristais do complexo MjTX-II/AR crescidos na temperatura de 18 °C.	43
Figura 19: Estrutura cristalográfica da MjTX-II/AR.	45
Figura 20: Estrutura cristalográfica das Lys49-PLA ₂ s complexadas com AR.	46
Figura 21: Interação da molécula de ácido rosmarínico na estrutura da MjTX-II.	47

Figura 22: Sobreposição das estruturas cristalográficas representadas em <i>ribbons</i> .	47
Figura 23: Gráfico que demonstra a amplitude das contrações.	48
Figura 24: Monocristais do complexo MjTX-II/suramina crescidos na temperatura de 18 °C.	49
Figura 25: Estrutura cristalográfica do complexo MjTX-II/suramina.	51
Figura 26: Interação das moléculas de suramina na estrutura da MjTX-II.	52
Figura 27: Média do RMSD dos carbonos alfa das cadeias principais do complexo tetramérico da MjTX-II.	53
Figura 28: Titulação calorimétrica de suramina em MjTX-II.	54
Figura 29: Análise da conformação oligomérica da MjTX-II/suramina por cromatografia de exclusão molecular analítica.	55
Figura 30: Sítios MDoS (sítio catiônico de docagem na membrana) e MDiS (sítio hidrofóbico para a ruptura da membrana) na estrutura da MjTX-II/suramina, onde estão destacados a molécula inibidora nestes sítios.	58
Figura 31: Sobreposição das estruturas de MjTX-II e Ecarpholina S/suramina.	59
Figura 32: Monocristais de MjTX-I/suramina.	60
Figura 33: Estrutura cristalográfica da MjTX-I/suramina.	61
Figura 34: Titulação calorimétrica de suramina em MjTX-I.	63
Figura 35: Interação da molécula de suramina na estrutura da MjTX-I.	64
Figura 36: Região destacada da interação entre os resíduos de número 119.	65
Figura 37: Alinhamento das sequências de aminoácidos das Lys49-PLA ₂ s isoladas do veneno de serpentes do gênero <i>Bothrops</i> .	66
Figura 38: Estrutura cristalográfica da MjTX-I e a superfície de cargas.	67
Figura 39: Sobreposição dos complexos MjTX-I/suramina e BaspTX-II/suramina.	68
Figura 40: Estruturas de PLA ₂ s complexadas com suramina e os locais de interação com estas proteínas.	69

Lista de Tabelas

Tabela 1: Soluções precipitantes para os cristais obtidos no trabalho.	27
Tabela 2: Estatísticas de coleta de dados e refinamentos estruturais das estruturas da MjTX-II nativa e dos complexos MjTX-II/AG.	34
Tabela 3: Estatísticas de coleta de dados e refinamento da estrutura do complexo MjTX-II/AR.	44
Tabela 4: Estatísticas de coleta de dados e refinamento estrutural do complexo MjTX-II/suramina.	50
Tabela 5: Parâmetros termodinâmicos globais e específicos da titulação MjTX-II/suramina	54
Tabela 6: Estatísticas de coleta de dados e refinamento estrutural do complexo MjTX-I/suramina.	62
Tabela 7: Dados termodinâmicos intrínsecos da interação entre suramina e MjTX-I.	63

Abreviaturas

AG: Ácidos graxos compostos por diferentes quantidades de carbonos em sua cadeia

AR: Ácido rosmarínico

BthTX-I: Bothropstoxina I, Lys49-PLA₂ isolada do veneno de *Bothrops jararacussu*

CD: Dicroísmo circular

DLS: Espalhamento de Luz Dinâmico

ITC: Calorimetria de Titulação Isotérmica

Lys49-PLA₂s: Fosfolipases A₂ miotóxicas sem atividade catalítica que possuem um resíduo de lisina na posição 49

MDiS: Sítio de desestabilização da membrana (*Membrane Disruption Site*)

MDoS: Sítio de ancoragem à membrana (*Membrane Docking Site*)

MjTX-I: Miotoxina I, Lys49-PLA₂ isolada do veneno de *Bothrops moojeni*

MjTX-II: Miotoxina II, Lys49-PLA₂ isolada do veneno de *Bothrops moojeni*

PEG: Polietilenoglicol

PDB: *Protein Data Bank*

PLA₂: Fosfolipases A₂

PrTX-I: Piratoxina I, Lys49-PLA₂ isolada do veneno de *Bothrops pirajai*

R_h: Raio Hidrodinâmico

RMSD: Desvio da raiz quadrática média

SAXS: Espalhamento de raios X a baixo ângulo

SDS: Sodium dodecyl sulfate

INTRODUÇÃO

1.1. Acidentes ofídicos

Acidentes causados por animais peçonhentos representam um importante problema de saúde pública, principalmente em áreas rurais de países da Ásia, África e América Latina. Geralmente, os acidentes causados por serpentes peçonhentas causam maior número de mortes que outras doenças negligenciadas como a dengue hemorrágica, cólera, leishmaniose, esquistossomose e doença de Chagas, despertando assim, a atenção da comunidade científica que ultimamente vem publicando trabalhos científicos de alto impacto nesta área e também levando Organização Mundial de Saúde (OMS) a classificar os acidentes ofídicos como uma doença negligenciada (Kasturiratne *et al.*, 2008; Williams *et al.*, 2010).

Na América Latina, o gênero de serpente que causa o maior número de acidentes ofídicos (cerca de 85%) é o *Bothrops* (Gutierrez e Lomonte, 1995; Kasturiratne *et al.*, 2008; De Oliveira, 2009), onde o principal efeito causado neste acidente é a mionecrose, resultante principalmente do sinergismo de diferentes componentes do veneno, incluindo metaloproteases hemorrágicas que induzem isquemia da área afetada e fosfolipases A₂ homólogas miotóxicas, as quais promovem citotoxicidade direta em células musculares (Gutierrez *et al.*, 2009). Este efeito local não é eficientemente neutralizado pelos soros antiofídicos disponíveis, podendo levar a perda permanente de tecido, amputação e deficiência física das vítimas (Otero *et al.*, 2002; Lomonte *et al.*, 2003).

1.2. Fosfolipases A₂ e Fosfolipases A₂ homólogas

Fosfolipases A₂ (PLA₂s, E.C. 3.1.1.4) são enzimas cálcio-dependentes que podem participar de diversos processos fisiológicos, como o remodelamento de membranas, mediação de processos inflamatórios e digestão de fosfolipídios (Moreira *et al.*, 2002; Soares *et al.*, 2004). Além disso, esta classe de proteínas pode ser encontrada de forma abundante em venenos de artrópodes (insetos) e répteis (lagartos e serpentes) (Arni e Ward, 1996; Ownby *et al.*, 1999). As PLA₂s (incluindo as toxinas apresentadas neste trabalho) apresentam sete pontes dissulfeto e também os seguintes elementos de estrutura secundária: N-terminal com hélice- α (h1), uma hélice curta, o *loop* de ligação do íon cálcio, duas hélices- α (h2 e h3), uma folha β formada por duas fitas anti-paralelas (conhecidas também como β -wings) e o *loop* C-terminal (Arni e Ward, 1996; Magro *et al.*, 2009).

Além das PLA₂, podem também estar presentes nos venenos de serpentes outras proteínas com semelhanças estruturais em relação às PLA₂, porém cataliticamente inativas. Estas proteínas conhecidas como PLA₂s-homólogas ou PLA₂-like apresentam mutações

típicas nos resíduos da posição 49 (Lys49, Ser49 ou Arg49), sendo então conhecidas como Lys49-PLA₂s, Ser49-PLA₂s ou Arg49-PLA₂s. Em serpentes do gênero *Bothrops*, encontram-se as Lys49-PLA₂s, que são caracterizadas por serem cataliticamente inativas, pois a ligação do íon Ca⁺² no seu sítio ativo é impedida por vários fatores estruturais, como por exemplo as mutações naturais dos resíduos Asp49→Lys e Tyr28→Asn (Holland *et al.*, 1990; Fernandes *et al.*, 2010). Estas toxinas possuem a estrutura terciária semelhante às das PLA₂s catalíticas, porém suas diferentes funções podem estar associadas com a diferença na conformação oligomérica e sítios funcionais (Dos Santos *et al.*, 2009; Dennis *et al.*, 2011; Gutierrez *et al.*, 2013; Salvador, Fernandes, *et al.*, 2013; Fernandes *et al.*, 2014).

Diferentes técnicas biofísicas demonstram que as Lys49-PLA₂s são proteínas diméricas em solução (Da Silva Giotto *et al.*, 1998; Arni *et al.*, 1999; Soares, Guerra-Sa, *et al.*, 2000; Murakami *et al.*, 2007b; Fernandes *et al.*, 2013; Salvador, Cavalcante, *et al.*, 2013), porém, pode-se observar duas possibilidades de dímeros na rede cristalina destas toxinas, as quais foram denominadas "dímero convencional" e "dímero alternativo" (Figura 1). Inicialmente, a conformação dimérica convencional era adotada para a resolução destas estruturas, porém, em 2005, Murakami e colaboradores apresentaram a estrutura cristalográfica da BaspTX-II (toxina isolada do veneno de *B. asper*) co-cristalizada com o inibidor suramina, sendo que a configuração dimérica alternativa apresenta ser o único modo em que o inibidor poderia interagir com os dois monômeros sem ficar exposto ao solvente. Além disso, as estruturas da PrTX-I (toxina isolada do veneno de *B. pirajai*) e BthTX-I (toxina isolada do veneno de *B. jararacussu*) elucidadas por cristalografia na presença de α -tocoferol (vitamina E), também demonstraram que a interação entre o ligante e os dois monômeros da proteína era energeticamente mais favorável quando estas se encontrava na forma alternativa (Dos Santos *et al.*, 2009). Em 2007, Murakami e colaboradores também mostraram que a conformação alternativa é mais bem ajustada ao envelope protéico obtido por experimentos de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) com a toxina BthTX-I. Além destes dados, a análise para a melhor configuração oligomérica para Lys49-PLA₂s utilizando-se o programa *online* PDBe PISA (Krissinel e Henrick, 2007), indicou que a conformação dimérica alternativa apresenta maior área de interface e valores de energia livre mais favoráveis (Dos Santos *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2010).

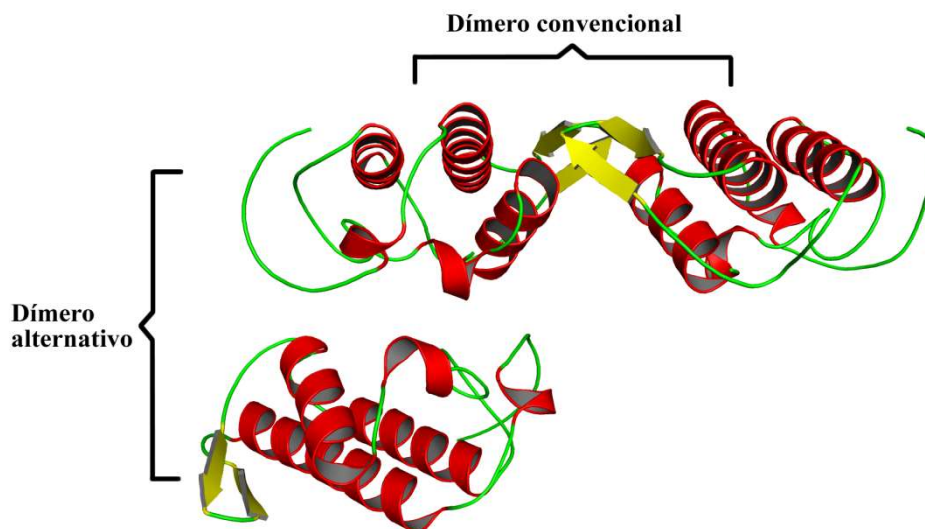


Figura 1: Duas possíveis conformações de dímeros na rede cristalina das Lys49-PLA₂s. As regiões em vermelho representam as hélices- α , em amarelo as folhas β e os loops são representados em verde.

Algumas possíveis regiões envolvidas no mecanismo miotóxico das Lys49-PLA₂s vem sendo destacadas por vários autores ao longo dos anos (Arni e Ward, 1996; Dos Santos *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2010; Fernandes *et al.*, 2013; Fernandes *et al.*, 2014), como por exemplo, a região C-terminal (chamado também anteriormente de sítio de ligação de heparina - resíduos 115-129), que estaria envolvida com o mecanismo miotóxico em colaboração com aminoácidos de caráter básico (lisinas e argininas) de outras regiões da proteínas formando um sítio de ação catiônico (Lomonte *et al.*, 1994; Kini, 2003).

Em 2009, dos Santos e colaboradores destacaram uma porção básica na estrutura das Lys49-PLA₂s, que era composto por uma lisina do N-terminal (Lys20) e outros dois resíduos do C-terminal, sendo uma lisina (Lys115) e uma arginina (Arg118), onde esta região foi denominada "sítio miotóxico". Foi observada a interação de íons sulfato nesta região em várias estruturas, onde estes íons se assemelham a cabeças de fosfolípidos (Bahnsen, 2005), propondo este local como o sítio de interação destas toxinas com a membrana. Porém, para o alinhamento e correta posição destes resíduos para a ação da toxina, estes mesmos autores sugeriram que a toxina deveria estar na forma ativa, ou seja, à partir da entrada de um substrato no canal hidrofóbico da toxina e na conformação de "dímero alternativo" (Murakami *et al.*, 2007b; Dos Santos *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2014).

Posteriormente, Fernandes e colaboradores em 2013 (Fernandes *et al.*, 2013) propuseram um complemento ao sítio miotóxico proposto em 2009. Nesta proposta, os autores sugerem que a região anteriormente chamada de "sítio miotóxico" seria a responsável pelo contato e ancoragem da toxina na membrana da célula muscular, passando então a

denominar este sítio de “*Membrane Docking Site – MDoS*”, e também propondo a existência de uma região hidrofóbica da toxina composta pelos resíduos leucina (Leu121) e fenilalanina (Phe125) que seria a responsável pela ruptura da membrana, passando a denominar esta de “*Membrane disruption site – MDiS*”.

No ano de 2014, Fernandes e colaboradores (Fernandes *et al.*, 2014) propuseram um mecanismo completo para a ação das Lys49-PLA₂s, composto por cinco passos: 1º Entrada de um substrato (ácidos graxos e/ou estruturalmente, moléculas de PEG4000 – que podem simular ácidos graxos) no canal hidrofóbico da toxina; 2º Ativação alostérica da proteína, alinhando os aminoácidos do MDoS e MDiS para a ação da toxina; 3º Ligação da toxina na membrana através do MDoS; 4º Penetração da toxina pelo MDiS; 5º Morte celular.

1.3. Moléculas inibidoras da mionecrose

A busca por inibidores para proteínas com atividade miotóxica (Lys49-PLA₂s por exemplo) têm sido muito intensa recentemente (De Oliveira *et al.*, 2003; Murakami *et al.*, 2005; Ticli *et al.*, 2005; Marcussi *et al.*, 2007; Murakami *et al.*, 2007a; Lomonte *et al.*, 2009; Dos Santos, Cardoso, *et al.*, 2011; Salvador *et al.*, 2015). O uso de plantas para fins medicinais e terapêutico já são validados cientificamente, pois várias plantas são usadas na medicina popular e contribui para a descoberta de várias drogas, como a morfina (anestésico alcalóide do ópio) e a rutina (potente vasodilatador) (Calixto *et al.*, 2000).

Sabe-se que várias espécies de plantas são usadas no tratamento contra envenenamento ofídico por comunidades que não possuem pronto acesso ao uso de soros anti-ofídicos (Soares *et al.*, 2005; Samy *et al.*, 2008). Como exemplo, um composto que demonstra atividade anti-ofídica é o ácido rosmarínico (AR – Figura 2A), que pode ser isolado do alecrim (*Rosmarinus officinalis*), pertencente da família *Lamiaceae* e da planta erva baleeira (*Cordia verbenacea*), pertencente à família *Boraginaceae*. Experimentos feitos com a incubação do AR e toxinas isoladas de venenos de serpentes mostraram que este composto pode possuir a propriedade de inibir a formação de edema e miotoxidade (Soares *et al.*, 2005; Ticli *et al.*, 2005).

Outro composto que também pode ser usado no tratamento da mionecrose causado por venenos de serpentes, é a suramina (8,8'-[carbonylbis [imino-3,1-phenylenecarbonylimino (4-methyl-3,1-phenylene) carbonylimino]] bis-1,3,5-naphthalenetrisulfonic acid hexasodium salt) (Figura 2B). Este composto polisulfonado sintético é altamente carregado negativamente e já é usado clinicamente no tratamento de

doenças causadas por parasitas, como a Tripanossomíase Africana e Oncocercose (Burch e Ashburn, 1951; Williamson e Desowitz, 1956; Cherry, 1960; Schneider, 1963; Murakami *et al.*, 2005). Alguns experimentos realizados com a suramina contra a ação de venenos de serpentes, mostraram que este composto pode inibir o bloqueio neuromuscular causado por neurotoxinas pré-sinápticas, como a crotoxina e β -bungarotoxina (Lin-Shiau e Lin, 1999) e prevenir a necrose muscular (Arruda *et al.*, 2002; De Oliveira *et al.*, 2003).

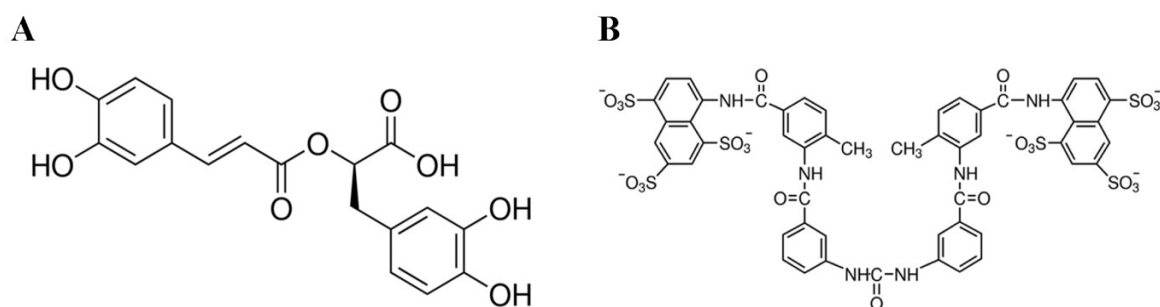


Figura 2: Compostos inibidores da atividade mitotóxica. **A.** Ácido rosmarínico; **B.** Suramina.

Como estas moléculas auxiliam na inibição das atividades biológicas das toxinas, futuramente, podem ser usadas como complemento para a soroterapia convencional já usada em acidentes ofídicos (De Oliveira *et al.*, 2003; Murakami *et al.*, 2005; Ticli *et al.*, 2005; Marcussi *et al.*, 2007; Murakami *et al.*, 2007b; Lomonte *et al.*, 2009).

1.4. *Bothrops moojeni* e miotoxinas I e II

Serpentes do gênero *Bothrops* são representantes da subfamília Crotalinae e são de grande interesse científico, médico e social no Brasil, pois são responsáveis pela grande maioria dos acidentes ofídicos que ocorrem no país (Cardoso, 2003). Uma espécie representante deste gênero é a *Bothrops moojeni* a qual é popularmente conhecida como caíçaca e pode medir 1,5 m, além de apresentar comportamento bastante agressivo, o que aumenta sua importância biológica, sendo que esta espécie consegue se adaptar a vários ambientes, sendo a principal espécie de *Bothrops* do cerrado (grandes áreas de formação aberta que se estendem do Brasil central até o sul do estado do Paraná) (Hoge, 1965; Cardoso, 2003).

A miotoxina I (MjTX-I) é uma toxina isolada do veneno de *B. moojeni* e é uma PLA₂ homóloga (Lys49-PLA₂) que apresenta uma massa molecular de 13,737 kDa (forma reduzida) estimada pela sequência de aminoácidos. Esta proteína é composta por 121 aminoácidos e contém uma elevada proporção de resíduos básicos e hidrofóbicos, podendo

apresentar formas diméricas, triméricas e tetraméricas em solução (Soares, Andriao-Escarso, *et al.*, 2000; Salvador, Fernandes, *et al.*, 2013). Os efeitos farmacológicos da MjTX-I são similares aos das demais Lys49-PLA₂s, apresentando miotoxicidade, cardiotoxicidade, formação de edema, rompimento dos lipossomos e letalidade. A MjTX-I, na sua forma nativa, não apresenta diretamente atividades hemolíticas ou anticoagulante (Soares, Andriao-Escarso, *et al.*, 2000) e além disso, para exibir a mesma eficácia que outras Lys49-PLA₂s em estudos realizados em preparações de músculos, é necessária cinco vezes mais quantidade de toxina (Salvador, Fernandes, *et al.*, 2013). A estrutura cristalográfica nativa da MjTX-I é diferenciada das outras Lys49-PLA₂s por se apresentar tetramérica; além desta proteína destacar-se por não possuir alguns dos resíduos responsáveis pela atividade miotóxica recentemente sugerida para as Lys49-PLA₂s de serpentes do gênero *Bothrops* (Dos Santos *et al.*, 2009; Salvador, Fernandes, *et al.*, 2013; Fernandes *et al.*, 2014).

A miotoxina II (MjTX-II) é uma PLA₂ homóloga (Lys49-PLA₂) básica com massa molecular de 13,887 kDa (forma reduzida - estimada pela sequência de aminoácidos) composta por 122 resíduos. O ponto isoelétrico de 8,9 é próximo do valor de outras miotoxinas, como bothropstoxinas (Homsí-Brandeburgo *et al.*, 1988) e piratoxinas (Mancuso *et al.*, 1995). A toxina apresenta drástica indução de edema e necrose quando aplicada em concentração de 50 µg (Soares *et al.*, 1998). A estrutura da MjTX-II nativa apresenta-se como dímero, assim como a maioria das Lys49-PLA₂s depositadas no banco de dados, porém apresenta algumas particularidades no modo de interação de moléculas de ácido graxo e PEG4000 no canal hidrofóbico, possivelmente causado pela mutação Leu32Gly e a inserção do aminoácido Asn na posição 120, o que também pode alterar o modo de ligação de moléculas inibidoras nesta toxina (Salvador, Cavalcante, *et al.*, 2013).

OBJETIVOS

Compreender o mecanismo da ação miotóxica das toxinas MjTX-I e MjTX-II isoladas do veneno da serpente *Bothrops moojeni*, sugerindo os sítios de ação e de ligação de moléculas inibidoras da atividade miotóxica para estas proteínas, podendo assim, contribuir para o desenvolvimento de fármacos que complementem o tratamento da soroterapia convencional utilizado em pessoas envolvidas em acidentes ofídicos.

MÉTODOS

3.1. Purificação das toxinas

O processo de purificação das toxinas MjTX-I e MjTX-II foi previamente descrito em 1998 por Soares e colaboradores (Soares *et al.*, 1998). Seguindo o protocolo, as toxinas que foram utilizadas neste trabalho foram isoladas por cromatografia de troca iônica na coluna CM-FF de 5 mL (GE) em equipamento de cromatografia líquida em alta pressão (HPLC). Para cada experimento de purificação, foram pesados cerca de 200 mg de veneno bruto liofilizado e adicionado o tampão bicarbonato de amônio pH 8,5 na concentração de 50 mM, centrifugado a 10000 rpm a 4 °C e aplicado na coluna (previamente equilibrada com o mesmo tampão). A eluição foi iniciada com o mesmo tampão, seguida de um gradiente de 50 mM até 500 mM de bicarbonato de amônio pH 8,5. A medida em que a concentração da solução tampão é aumentada, as proteínas que estavam em interação com a coluna são eluídas e detectadas por uma lâmpada ultra violeta (UV) ajustada para detecção de resíduos com anéis aromáticos (280 nm) presente no equipamento, emitindo sinais que são captados e apresentados por meio de um gráfico (cromatograma).

Após esta primeira etapa de purificação por troca iônica, as frações correspondentes às toxinas de interesse são submetidas a uma segunda etapa de purificação por cromatografia de fase reversa, onde a intenção é obter amostras com maior grau de pureza. Estes experimentos são realizados em coluna Shim-pack CLS-ODS (C-18) (Shimadzu), onde as frações diluídas em 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) são submetidas a um gradiente de 0 a 70% de acetonitrila (em 0,1% de TFA).

As amostras dos picos correspondentes às toxinas foram preparados em tampão de corrida desnaturante (Tris HCl pH 6,8; Sodium Dodecyl Sulfate (SDS); Glicerol; β -mercaptoetanol; azul de bromofenol) e submetidos a experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida a 13% (seguindo o protocolo de Laemmli (Laemmli, 1970)), podendo-se assim, observar o grau de pureza das amostras.

Assim que obtido o nível de pureza desejado, estas podem ser liofilizadas ou tratadas em filtros concentradores (Vivaspin - GE) na finalidade de se obter diferentes concentrações para diferentes experimentos.

3.2. Estudos funcionais

Os estudos funcionais foram realizados pelo Dr. Walter L. G. Cavalcante no Laboratório de Junção Neuromuscular do Departamento de Farmacologia, onde todos os

procedimentos foram realizados de acordo com a comissão de ética no uso de animais de experimentação (CEUA - Processo número 033/05).

Camundongos adultos (25 - 30 g) foram sacrificados por exsanguinação após deslocamento cervical, sendo posteriormente retirado a preparação nervo frênico-músculo diafragma e montado verticalmente em uma cuba para o órgão isolado com temperatura controlada ($35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$), que continha 15 mL de solução fisiológica (NaCl ; KCl ; MgCl_2 ; NaHCO_3 ; Na_2HPO_4 ; glicose) e borbulhada com carbogênio (95 % O_2 e 5 % CO_2). O budo costal diafragmático foi conectado a um suporte de vidro em formato de "L", e o centro tendíneo do músculo foi conectado a um transdutor de tensão isométrica (Grass Telefactor, Modelo FT03), acoplado a um amplificador de sinal (*Gould Systems*). Após isso, foram aplicados estímulos elétricos de forma direta e indireta, onde o primeiro consiste em de um eletrodo bipolar de platina acoplado a um estimulador elétrico (Grass Telefactor, Modelo S88) próximo a preparação, e para evitar alguma contribuição de contração indireta, foi adicionado pancurônio (bloqueador do receptor nicotínico) à solução nutriente. As contrações estimuladas de forma indireta são feitas à partir da sucção da extremidade livre do nervo frênico por um eletrodo de platina e assim, aplicado pulsos elétricos retangulares com duração de 0,5 ms, intensidade supramáxima e frequência de 0,2 Hz. Assim, os sinais são registrados em um computador através de um sistema de aquisição de dados *Summit ACQuire* (*Gould Systems*) e analisados utilizando o programa *Summit DataViewer* (*Gould Systems*).

Para os ensaios com as toxinas MjTX-II nativa, MjTX-II/AR e MjTX-II/suramina, as preparações foram mantidas a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ e submetidas a estabilização por um período de 45 minutos, sendo renovada a solução nutriente a cada 15 minutos, aplicando estímulos elétricos na frequência de 0,2 Hz. Após este período, as soluções contendo MjTX-II ($1\text{ }\mu\text{M}$) e a mistura MjTX-II/inibidor pré incubada (inibidor na concentração de $10\text{ }\mu\text{M}$) a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos foram adicionadas à cuba, sendo registradas as contrações musculares na forma direta e indireta por 90 minutos.

3.3. Espalhamento de luz dinâmico

Experimentos de espalhamento de luz dinâmico (DLS) com amostras purificadas de MjTX-I e MjTX-II com e sem a presença de moléculas inibidoras foram realizados no intuito de se avaliar o estado oligomérico das amostras em diferentes temperaturas e em soluções com diferentes pHs, sendo que a partir dos resultados obtidos, pode-se observar o raio hidrodinâmico das populações que estão em solução. Estes experimentos podem também

guiar experimentos de cristalização, pois as placas de cristalização são colocadas na temperatura em que as amostras apresentam menor valor de polidispersidade e menor formação de agregados.

O experimento consiste no uso de uma microcubeta contendo a solução de proteína (com ou sem inibidores) onde ocorre a incidência de um *laser* (Figura 3). As moléculas ali presentes se encontram em movimentos de rotação e translação (movimento *Browniano*), onde em geral, as partículas menores se movimentam com maior velocidade que as partículas maiores, causando assim, flutuações na intensidade da luz espalhada. Estas flutuações são medidas por um detector que pode, por exemplo, estar colocado a um ângulo de 90° da fonte de luz (Borgstahl, 2007).

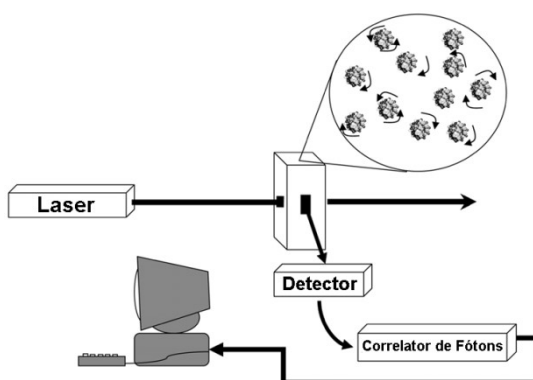


Figura 3: Esquema simplificado do funcionamento de um equipamento de DLS.

Dado o valor do coeficiente de difusão translacional (D_t), pode-se calcular o raio hidrodinâmico (R_h) das moléculas em solução, fazendo o uso da relação Stokes-Einstein ($Dt = \frac{kT}{6\pi\eta R_h}$; onde k é a constante de Boltzmann, T é a temperatura, η é a viscosidade do solvente e R_h é o raio hidrodinâmico). Além disso, a massa molecular (MW) pode também ser estimada, assumindo que as moléculas presentes são esféricas. Com o resultado obtido pelo experimento de DLS, é possível observar as diferenças na agregação e estados oligoméricos das moléculas em solução, onde pode-se encontrar moléculas monomodais monodispersas (somente um tipo de molécula em somente um estado oligomérico), monomodais polidispersas (um tipo de molécula em diferentes estados oligoméricos), multimodais monodispersas (duas ou mais moléculas diferentes em somente um estado oligomérico cada) e multimodais polidispersas (duas ou mais moléculas em diferentes estados oligoméricos) (Borgstahl, 2007).

Todos os experimentos de DLS foram conduzidos a 18 °C e 25 °C, tanto com amostras nativas e pré-incubadas com inibidores, no equipamento *DynaPro TITAN* (Wyatt Technology). As amostras das toxinas MjTX-I e MjTX-II diluídas em 20 mM bicarbonato de amônio pH 8,5 foram utilizadas na concentração de 2,5 mg/mL. Nos experimentos de DLS das toxinas com inibidores, foi adicionado uma solução contendo inibidores na concentração de 15 mg/mL, onde a concentração final de toxina em solução foi de 2,5 mg/mL e se obteve a proporção molecular de 1:10 (proteína:inibidor respectivamente). Foram realizadas cem medidas para cada experimento e analisadas no *software Dynamics v. 6.10* (Wyatt Technology).

3.4. Cromatografia de exclusão molecular analítica

O experimento de cromatografia de exclusão molecular analítica foi feito na intenção de se obter informações sobre o estado oligomérico das toxinas em solução, utilizando-se 20 µL das amostras de MjTX-I e MjTX-II pré incubada com suramina, ambas na concentração de 4 mg/mL utilizando coluna *Superdex 200 5/150* (GE Healthcare) equilibrada previamente com 50mM Tris HCl pH 5,9 a 20 °C, com fluxo de 0,5 mL/min. As massas moleculares padrões foram obtidas com o *kit* de calibração de baixa massa molecular (Sigma-Aldrich), o qual contém: *blue* dextran (2000 kDa), álcool desidrogenase (200 kDa), albumina de soro bovino (66 kDa), anidrase carbônica (29 kDa) e citocromo C (12,4 kDa). Os volumes de retenção para cada padrão e amostra foram mensurados e calculados a partir do coeficiente de partição (K_{av}), que é definido pela fórmula $K_{av} = (V_r - V_0)/(V_c - V_0)$, onde V_r é o volume de retenção, V_0 é o volume nulo (calculado baseado no volume de retenção do padrão *blue* dextran) e V_c é o volume necessário para ocupar toda a coluna. O coeficiente K_{av} de cada padrão foi colocado no gráfico pelo *log* da massa molecular a fim de gerar a curva padrão, usada para a determinação da massa molecular aproximada de cada estado oligomérico encontrados na amostra.

3.5. Calorimetria de titulação isotérmica

Os experimentos de calorimetria de titulação isotérmica foram realizados pelo Me. Thiago R. Dreyer e em colaboração para análise dos dados o Dr. Adrian Velazquez Campoy (Universidade de Zaragoza). Estes experimentos são realizados pela titulação, à temperatura constante, de dois ou mais compostos a fim de medir a variação de calor relacionada à interação entre as moléculas.

O equipamento de microcalorimetria utilizado foi o iTC200 (GE) que é composto por duas células (uma de reação e outra de referência), sensor e controlador de temperatura e uma micropipeta automatizada, que será responsável pela titulação do ligante na biomolécula (Figura 4). O princípio utilizado pelo equipamento é o da compensação dinâmica da potência, no qual mede a quantidade de potência ($\mu\text{cal/s}$) necessária para manter as duas células em temperatura constante e iguais entre si.

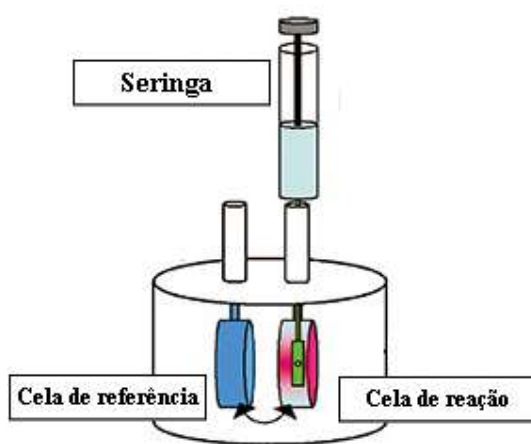


Figura 4: Representação esquemática do experimento de microcalorimetria. O titulante é injetado pela seringa na cela de reação, a qual tem que se manter na mesma temperatura da cela de referência.

A cada injeção da solução pela micropipeta, ocorre a interação de um determinado número de macromoléculas e ligantes, dependendo da afinidade de ligação e da concentração dos reagentes. A formação do complexo é acompanhada pela liberação ou absorção de calor (reação exotérmica ou endotérmica, respectivamente), que causa uma diferença de temperatura entre as duas células, a qual é prontamente compensada pela potência térmica aplicada na célula de reação, mantendo ambas à mesma temperatura. Após cada injeção, o sistema entra novamente em equilíbrio e o sinal registrado é de um padrão de deflexão na forma de um pico. Pelo cálculo da área de cada pico, é obtido o calor associado com a injeção e conforme a macromolécula fica saturada, a quantidade de calor liberado ou absorvido diminui até que apenas o calor de diluição da molécula injetada seja registrado. Pela taxa de variação da troca de calor entre célula e o ambiente, é determinada a taxa de ocorrência da reação e a variação de entalpia da reação (Velazquez-Campoy *et al.*, 2004; Freyer e Lewis, 2008).

Anteriormente às titulações, é necessário que as soluções em que a proteína e os ligantes (inibidores) estão sejam idênticas a fim de se evitar que ocorra variação na temperatura devido a interação entre soluções diferentes.

A análise de dados pode ser realizada em três etapas: *i)* ajuste da concentração da proteína para garantir que a estequiometria (n) das ligações correspondesse a valores inteiros ($n=1$ ou $n=2$); *ii)* cálculo do calor gerado ou absorvido em cada injeção e normalização deste pela razão molar dos ligantes pela proteína, feito no *software Nitpic*, uma vez que este apresentou melhores resultados quando comparado ao *software* Origin (Scheuermann e Brautigam, 2015) e *iii)* o ajuste dos dados (constante de dissociação (K_d) e entalpia (ΔH)) feitos através de polinômios de ligação (Freire et al., 2009; Vega et al., 2015). Os parâmetros de energia livre de Gibbs (ΔG) e variação de entropia (ΔS) são determinados matematicamente através da constante de dissociação e da variação de entalpia. Por fim, os gráficos dos calores de titulação e os termogramas podem ser confeccionados em *softwares* como o Origin.

Para os experimentos de ITC dos complexos MjTX-I/suramina, MjTX-II/suramina e MjTX-II/AR, foi utilizado um microcalorímetro iTC200 (GE) nas seguintes configurações: temperatura de 25 °C, agitação de 1000 rpm, tempo entre injeções de 240 segundos, primeira injeção com 0,4 μ L e as demais 19 injeções de 2 μ L (duração das injeções de 0,8 e 4 segundos, respectivamente) em 50 mM de bicarbonato de amônio pH 8,5. As concentrações utilizadas para as proteínas foram de 45 μ M (determinada por espectrofotometria) e a dos ligantes de 600 μ M. A análise dos dados foi realizada com os *softwares* Origin (Origin 7.0, OriginLab, Northampton, Massachusetts) e *Nitpic* utilizando-se modelos previamente descritos (Zhou et al., 2008; Freire et al., 2009; Vega et al., 2015).

3.6. Experimentos de dinâmica molecular

Os experimentos de dinâmica molecular foram feitos pelo aluno Fábio F. Matioli, onde foram realizadas um conjunto de simulações de dinâmica molecular dos complexos para analisar a estabilidade, conformação após a simulação, posição dos inibidores e das proteínas, interação proteína/inibidor, dentre outras possibilidades utilizando o *software Gromacs v.4.5.3 (Groningen Machine for Chemical Simulation)* (Hess et al., 2008). As simulações foram realizadas utilizando-se as configurações padrões: campo de força GROMOS 96 53a6 (Oostenbrink et al., 2005), protonação dos grupos carregados ajustados para pH 7,0, adição de moléculas de solvente (água) explícitas (Berendsen, 1981), adição de íons para promover o

equilíbrio do sistema e a distância mínima permitida entre qualquer átomo dos modelos e a parede da caixa de solvente/água fixadas para 0,5 nm. Após isso, uma minimização de energia (EM – *energy minimization*) foi realizada com o emprego de um algoritmo do tipo *steepest descent*, gerando-se as configurações iniciais dos sistemas. Após este passo, simulação de dinâmica molecular com restrição de posicionamento (PRMD) foi realizada com o objetivo de relaxar o sistema de forma gradual. Em seguida, uma nova simulação de dinâmica molecular foi executada para avaliar a estabilidade dos modelos em uma caixa periódica cúbica de solvente sob temperatura (298 K) e pressão (1,0 bar) constantes (Berendsen *et al.*, 1984).

Para o complexo MjTX-I/suramina, foram feitas duas simulações: a primeira foi a fim de checar a estabilidade do complexo formado na presença da molécula de suramina e a segunda foi na intenção de checar a estabilidade do dímero alternativo formado sem a molécula inibidora entre os monômeros (estrutura cristalográfica da proteína nativa é um tetrâmero formado por dois dímeros na forma convencional).

Também foram feitas duas simulações para o complexo MjTX-II/suramina, porém com o complexo tetramérico com as moléculas de suramina e o complexo tetramérico sem as moléculas de suramina.

3.7. Ensaios de cristalização

Os testes iniciais de cristalização foram feitos utilizando quites comerciais com diferentes soluções pré-determinadas (geralmente, 96 soluções diferentes), que são compostas por sais, polímeros e solventes orgânicos, e em conjunto com outras variáveis que podem afetar a cristalização como pH, aditivos (sais e/ou agentes orgânicos) e temperatura, temos evidências iniciais sobre as condições que possibilitam a obtenção de cristais (como pequenos cristais ou policristais) (Mcpherson, 1989; Jancarik *et al.*, 1991; Ducruix, 1992). O processo mais utilizado para testes de cristalização é o *salting-out*, que compreende em adicionar uma solução concentrada a um reservatório presente na placa de cristalização e na solução de proteína, onde posteriormente, irá ocorrer o aumento gradativo da concentração da proteína presente nesta mistura e assim, fazer com que a proteína atinja o ponto de supersaturação, que se ocorrido na forma desejável, acarretará na formação de cristais (Jancarik *et al.*, 1991; Kobe, 1999).

Um método bastante eficiente para o aumento gradativo da concentração da proteína é aquele baseado na difusão de vapor, que ocorre em um sistema fechado e com temperatura controlada, com a adição de duas soluções que irão realizar trocas apenas pela

fase gasosa. Para isto, dois métodos largamente utilizados e eficientes são os sistemas *Hanging drop* (gota suspensa) e *Sitting drop* (gota sentada) (Figura 5).

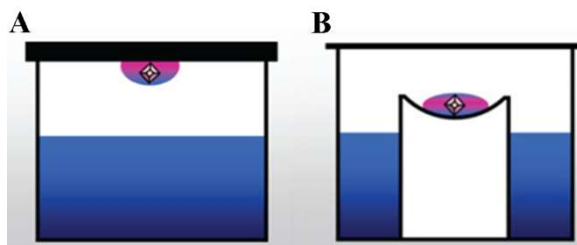


Figura 5: Esquema representativo dos métodos de difusão de vapor. **A.** *Hanging drop* e **B.** *Sitting drop*.

Em ambos, a solução precipitante presente no reservatório possui alta concentração, enquanto a solução de proteína em mistura com esta solução precipitante se encontra em menor concentração, ocorrendo assim, a perda de água em forma de vapor para a solução mais concentrada. Para que ocorra a formação de cristais convenientes para a coleta de dados, é necessário definir as melhores condições para o crescimento dos cristais, sendo necessário a alteração de alguns parâmetros, como por exemplo, a concentração e força iônica dos sais utilizados, pH e temperatura do processo (que pode aumentar ou diminuir a velocidade da troca gasosa). Estas alterações são feitas de forma cautelosa, pois se a proteína atingir o ponto de saturação rapidamente por exemplo, pode ocorrer a precipitação da proteína (Mcpherson, 1989; Ducruix, 1992).

Os cristais apresentados neste trabalho foram obtidos em temperatura de 18 °C pelo método de difusão de vapor no sistema *hanging drop*, onde as proteínas usadas estavam na concentração de 10 mg/mL diluídas em água ultra pura. As gotas eram constituídas por 1 µL de solução de proteína ou 0,7 µL de solução de proteína + 0,3 µL solução de moléculas usadas para os complexos (os ligantes foram ajustados para se obter a proporção de 1 molécula de proteína para 8 moléculas de ligantes) e 1 µL de solução do reservatório, o qual era composto por 500 µL de solução precipitante, descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Soluções precipitantes para os cristais obtidos no trabalho.

Toxina / complexo	Solução precipitante *
MjTX-I /suramina	32 % PEG4000; 0,1 M Tris HCl pH 8,5; 0,15 M Cloreto de Magnésio
MjTX-II nativa	30 % PEG4000; 0,1 M Tris HCl pH 8,5; 0,2 M Sulfato de Lítio
MjTX-II/AG6	15 % PEG4000; 15 % Isopropanol; 0,1 M Citrato de Sódio pH 5,6
MjTX-II/AG8	24 % PEG4000; 0,1 M Tris HCl pH 8,5; 0,2 M Sulfato de Lítio
MjTX-II/AG14	24 % PEG4000; 0,1 M Tris HCl pH 8,5; 0,2 M Sulfato de Lítio
MjTX-II/ácido rosmarínico	15 % PEG4000; 15 % Isopropanol; 0,1 M Citrato de Sódio pH 5,6
MjTX-II/suramina	30 % PEG4000; 0,1 M Tris HCl pH 8,5; 0,2 M Sulfato de Lítio

* Composição das soluções precipitantes foram preparadas tendo como base protocolos apresentados na literatura, para a MjTX-I (Marchi-Salvador *et al.*, 2005) e para a MjTX-II (Salvador; Cavalcante *et al.*, 2013).

3.8. Coleta de dados de difração de raios X

Após o crescimento com sucesso de monocristais, estes são montados em um *loop* de *nylon* ficando presos neste por tensão superficial (Figura 6), mergulhados em nitrogênio líquido e levados para coleta de dados em geradores de raios X ou fontes de radiação síncrotron que, quando comparado com uma fonte convencional, possui menor divergência vertical e maior brilho (Mcree, 1993).

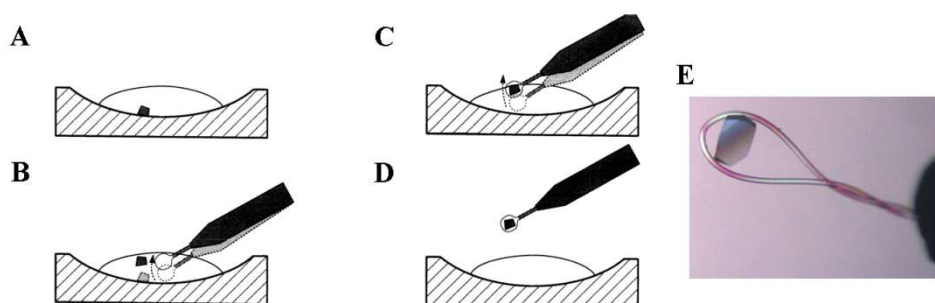


Figura 6: Modo em que o cristal é colocado ao *loop* de *nylon*. **A-D.** Cristal na gota e posterior posicionamento no *loop* de *nylon*. **E.** Cristal posicionado no *loop* e preso por tensão superficial.

O método de coleta de dados de difração de raios X mais conhecido e utilizado é o de roto-oscilação, onde o cristal é colocado em uma cabeça goniométrica e alinhado ao feixe de raios X, realizando-se movimentos de rotação entre $0,5^\circ$ e 2° de forma perpendicular ao feixe (Mcree, 1993; Drenth, 1994) (Figura 7). Além disso, o *loop* de *nylon* com o cristal recebe constantemente um fluxo de nitrogênio gasoso em temperatura criogênica (em torno de -173°C) com o intuito de reduzir os danos causados pela radiação e aumentar o tempo de vida do cristal que está sendo submetido à análise.

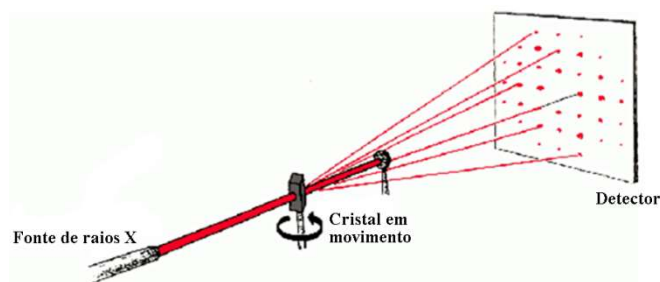


Figura 7: Figura esquemática que representa o processo da coleta de dados por difração de raios X.

Com a incidência do feixe de raios X, os elétrons presentes no cristal são capazes de difratar raios X, sendo que este espalhamento é coletado por um detector ligado a um computador, permitindo visualizar as imagens da difração. A coleta de dados completa dos cristais se dá por múltiplas imagens coletadas onde inicialmente podemos obter informações como os parâmetros de rede do cristal, grupo espacial, número de moléculas de proteína na unidade assimétrica e também calcular a porcentagem de água presente no cristal (Mcpherson, 1989). O processamento dos dados podem ser feitos com o uso dos programas HKL2000 (Otwinowski e Minor, 1997) e/ou *iMosflm* (Battye *et al.*, 2011), que são amplamente utilizados pela comunidade científica.

3.9. Processamento e refinamento dos dados

Após o processamento dos dados obtidos, obtém-se a intensidade e o desvio padrão dos pontos de difração devidamente indexados de acordo com cada uma das reflexões dos cristais. As reflexões são tratadas como ondas, apresentando intensidade ou fator de estrutura (F) e fase (α).

No entanto, após os experimentos de espalhamento de raios X, somente podemos conhecer a intensidade de cada reflexão, sendo necessário algum método para se descobrir as suas fases (Drenth, 1994). Há a possibilidade de se obter as fases pelo método de substituição molecular, sendo o método mais simples e usual, que se dá pelo uso de uma proteína modelo

homóloga com estrutura tridimensional já resolvida (com valores de identidade sequencial próximos à proteína de objeto de estudo). Esta proteína modelo deve ser posicionada corretamente na densidade eletrônica obtida, sendo necessária funções de rotação e translação por comparação dos fatores de estrutura da proteína modelo (F_{calc}) com os fatores de estrutura medidos (F_{obs}) (Navaza, 1997). Este processo pode ser feito por programas como o *Molrep* (Vagin e Teplyakov, 2010) ou *Phaser* (McCoey *et al.*, 2007), os quais são bastante utilizados pela comunidade cristalográfica.

Assim que determinada a estrutura por meio da técnica de substituição molecular, são iniciados os ajustes e refinamentos manuais da estrutura cristalográfica considerando-se os mapas de densidade eletrônica, por meio de programas gráficos, como o *software Coot* (Emsley e Cowtan, 2004). Seguidamente, o modelo deve ter a energia livre minimizada e alguns parâmetros estereoquímicos refinados, como as distâncias das ligações peptídicas, ângulos diédricos e interações, considerando os dados experimentais. O refinamento se dá pelo uso dos programas *Refmac* (Murshudov *et al.*, 1997), do pacote de programas CCP4 (Potterton *et al.*, 2004), e *Phenix* (Adams *et al.*, 2010). Após o final do processo, o modelo é acertado manualmente novamente com novos ajustes e refinado novamente de forma automatizada. Este processo é repetido até se obter a estrutura final da proteína, que é considerado quando se atinge a máxima concordância entre os valores de F_{calc} e o F_{obs} , mostrada pelos valores de R_{cryst} e R_{free} (McPherson, 2003). Os valores de R_{cryst} e R_{free} são basicamente idênticos, com exceção de que o R_{free} é calculado com a retirada de um conjunto de 5-10% de reflexões que não são usadas durante o refinamento da estrutura (Brunger, 1992).

O modelo final pode ser avaliado por meio do gráfico de Ramachandran e outros critérios estereoquímicos, utilizando-se programas como o *Phenix* (Adams *et al.*, 2010) e/ou o programa *online Molprobity* (Chen *et al.*, 2010), que avaliam a qualidade da estrutura por meio da coerência estereoquímica entre o modelo obtido e outras estruturas depositadas no banco de dados PDB (www.rcsb.org).

Após a obtenção do modelo final refinado, o processo de comparação estrutural e os estudos que visam relacionar a estrutura com a função miotóxica destas proteínas podem ser iniciados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Purificação das toxinas MjTX-I e MjTX-II

O veneno bruto submetido ao processo de purificação foi aplicado em coluna de troca iônica e com isso, foi obtido o cromatograma da Figura 8A. Os picos marcados no cromatograma correspondem às toxinas MjTX-I e MjTX-II respectivamente, bem como as alíquotas de número 3 e 4 observadas em gel de poliácridamida a 13 %, evidenciadas próximas ao marcador molecular de 15 kDa (Figura 8B).

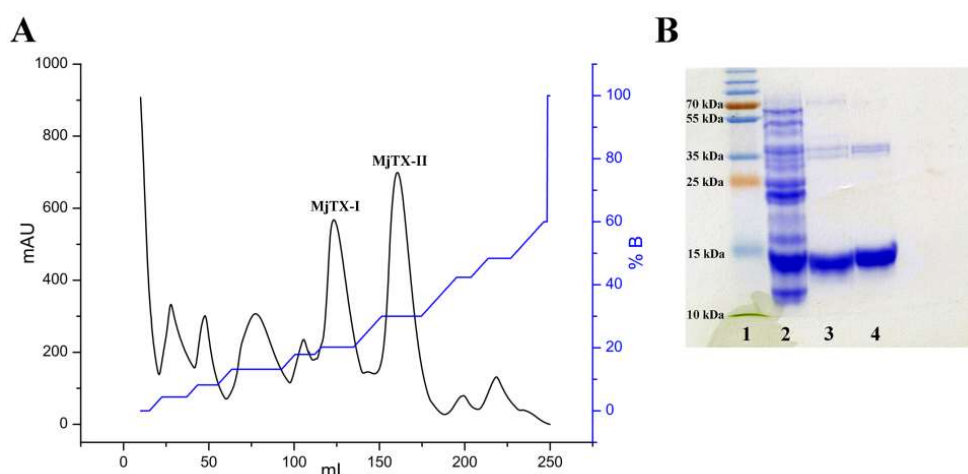


Figura 8: Cromatograma do veneno bruto de *B. moojeni* em troca iônica e gel de poliácridamida a 13 % das frações correspondentes às toxinas de interesse. **A.** Cromatograma da troca iônica em coluna CM-FF com picos destacados correspondentes às toxinas MjTX-I e MjTX-II e a linha em azul corresponde a concentração do tampão de eluição; **B.** Gel de eletroforese de poliácridamida a 13% onde o poço 1 é o marcador de massa molecular, poço 2 é o veneno bruto e as frações correspondentes a MjTX-I (3) e MjTX-II (4).

Após esta etapa de purificação, ainda foi possível observar impurezas nas amostras que foram aplicadas no gel, sendo necessário outra etapa de purificação por cromatografia de fase reversa em coluna C18, cujos resultados são demonstrados nos cromatogramas das Figuras 9A e 9B (MjTX-I e MjTX-II respectivamente), além do gel de poliácridamida com as frações correspondentes (9C).

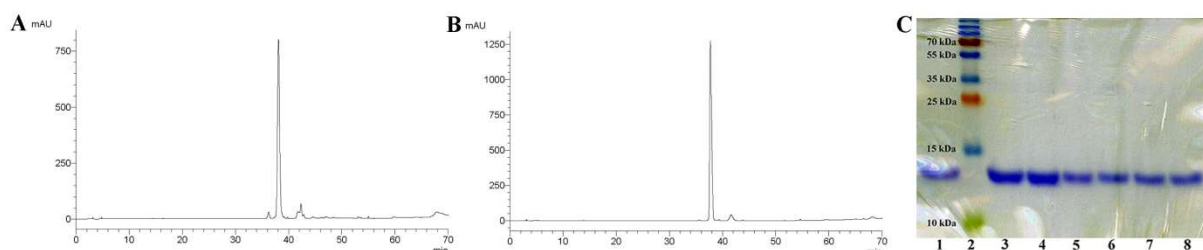


Figura 9: Cromatograma dos picos correspondentes à MjTX-I e MjTX-II submetidos a fase reversa e gel de poliácridamida a 13 %. **A e B.** Cromatografia de fase reversa em coluna C18 com os picos correspondentes às toxinas MjTX-I e MjTX-II, respectivamente. **C.** Gel de eletroforese de poliácridamida a 13% onde o poço 2 é o marcador de massa molecular e as frações correspondentes a MjTX-I (1, 3 e 4.), e MjTX-II (5, 6, 7 e 8).

As frações correspondentes às toxinas separadas por cromatografia de fase reversa foram concentradas para serem usadas posteriormente nos experimentos funcionais, DLS, ITC, SAXS e cristalização.

4.2. MjTX-II nativa e dos complexos MjTX-II/ácidos graxos

Como já apresentado e discutido por dos Santos e colaboradores (2009) e Fernandes e colaboradores (2014), os ácidos graxos possuem um papel importante para a atividade das toxinas Lys49-PLA₂s. Esta importância se dá a partir da entrada destas moléculas no canal hidrofóbico da toxina que causa a movimentação alostérica do monômero, expondo os sítios MDoS e MDiS para a ação miotóxica.

Os cristais obtidos com amostra de MjTX-II nativa e pré-incubada com ácidos graxos e foram obtidos por difusão de vapor em gotas montadas no sistema *hanging drop* a 18°C (Figura 10). Três ácidos graxos com diferentes quantidades de carbonos na composição foram usados: ácido hexanóico (6 carbonos - AG6), ácido octanóico (8 carbonos - AG8) e ácido tetradecanóico (14 carbonos - AG14) na proporção de 1 molécula de proteína para 8 de ligantes.

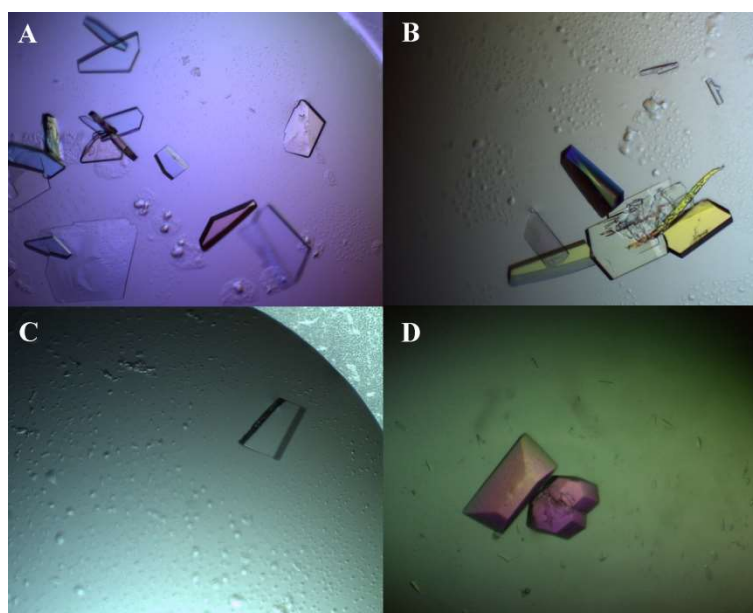


Figura 10: Monocristais de MjTX-II nativa e crescidos na presença de ácidos graxos. **A.** Cristais da MjTX-II nativa; **B.** MjTX-II crescidos na presença de um ácido graxo de 6 carbonos de tamanho; **C.** Cristais de MjTX-II crescidos na presença do ácido graxo de 8 carbonos de tamanho e; **D.** Cristais de MjTX-II obtidos na presença de ácido graxo de 14 carbonos.

Todos os conjuntos de dados obtidos foram processados e as estruturas foram resolvidas pelo método de substituição molecular, usando como modelo o monômero B da estrutura da MjTX-II depositada no banco de dados (PDB id: 4KF3). Os dados de processamento e refinamento estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Estatísticas de coleta de dados e refinamentos estruturais das estruturas da MjTX-II nativa e dos complexos MjTX-II/AG.

	MjTX-II nativa	MjTX-II/AG6	MjTX-II/AG8	MjTX-II/AG14
Cela Unitária (Å, °)	a=b=63,7; c=126,3; $\gamma=120$	a=51,2; b=62,9; c=88,1	a=51,0; b=61,6; c=54,0; $\beta=118,9$	a=50,5; b=62,7; c=86,8
Resolução (Å)	27,41 – 1,74 (1,81 – 1,74) ^a	26,83 - 1,70 (1,78 - 1,70) ^a	26,67 – 1,75 (1,81 – 1,75) ^a	35,86 – 1,94 (2,01 – 1,94) ^a
Grupo espacial	P3 ₂ 21	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Reflexões únicas	30761 (3035) ^a	31375 (3872) ^a	28286 (2895) ^a	20107 (1913) ^a
Completeza (%)	99,68 (100) ^a	97,5 (98,2) ^a	96,12 (98,64) ^a	96,59 (92,68) ^a
<i>I</i> / σ (<i>I</i>)	12,52 (4,34) ^a	25,65 (3,78) ^a	8,35 (3,18) ^a	7,76 (1,97) ^a
Multiplicidade	6,1 (5,8) ^a	4,8 (4,6) ^a	3,0 (3,0) ^a	5,3 (5,3) ^a
Moléculas na UA	2	2	2	2
Coefficiente de Matthews <i>V</i> _M (Å ³ Da ⁻¹)	2,67	2,60	2,68	2,48
<i>R</i> _{merge} ^b (%)	7,8 (37,7) ^a	5,1 (39,6) ^a	10,7 (55,7) ^a	17,2 (67,8) ^a
<i>R</i> _{cryst}	18,07	18,87	17,30	16,98
<i>R</i> _{free}	20,97	20,51	20,16	19,83
Número de átomos				
Proteína	1888	1893	1916	1900
Água	361	304	374	311
Ácidos graxos	---	1	2	2
Íons sulfato	6	7	4	6
Fator de temperatura médio (Å ²)	21,23	24,84	17,09	21,76
Ramachandran (%) ^c				
Favoráveis	96,0	95,0	96,0	95,0
Não favoráveis	0,0	0,83	0,45	0,45

^a Números entre parênteses são para a camada de maior resolução.

^b $R_{merge} = \sum_{hkl} [\sum_i (I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle)] / \sum_{hkl} \langle I_{hkl} \rangle$, onde $I_{hkl,i}$ é a intensidade de uma medida individual da reflexão com os índices de Miller *h*, *k* e *l*, e $\langle I_{hkl} \rangle$ é a média das intensidades da reflexão. Calculado para $I \geq 3\sigma(I)$.

^c Calculado pelo programa *MolProbity*

Além das quatro estruturas finais (nativa, MjTX-II/AG6, MjTX-II/AG8, MjTX-II/AG14 - Figura 11), foram usadas as duas estruturas de MjTX-II (MjTX-II/PEG4K - PDB *id*: 4KF3 e MjTX-II/ácido esteárico - PDB *id*: 1XXS) previamente depositadas no banco de dados para a análise comparativa, sendo possível observar algumas alterações estruturais e também no modo de ligação das moléculas hidrofóbicas na toxina.

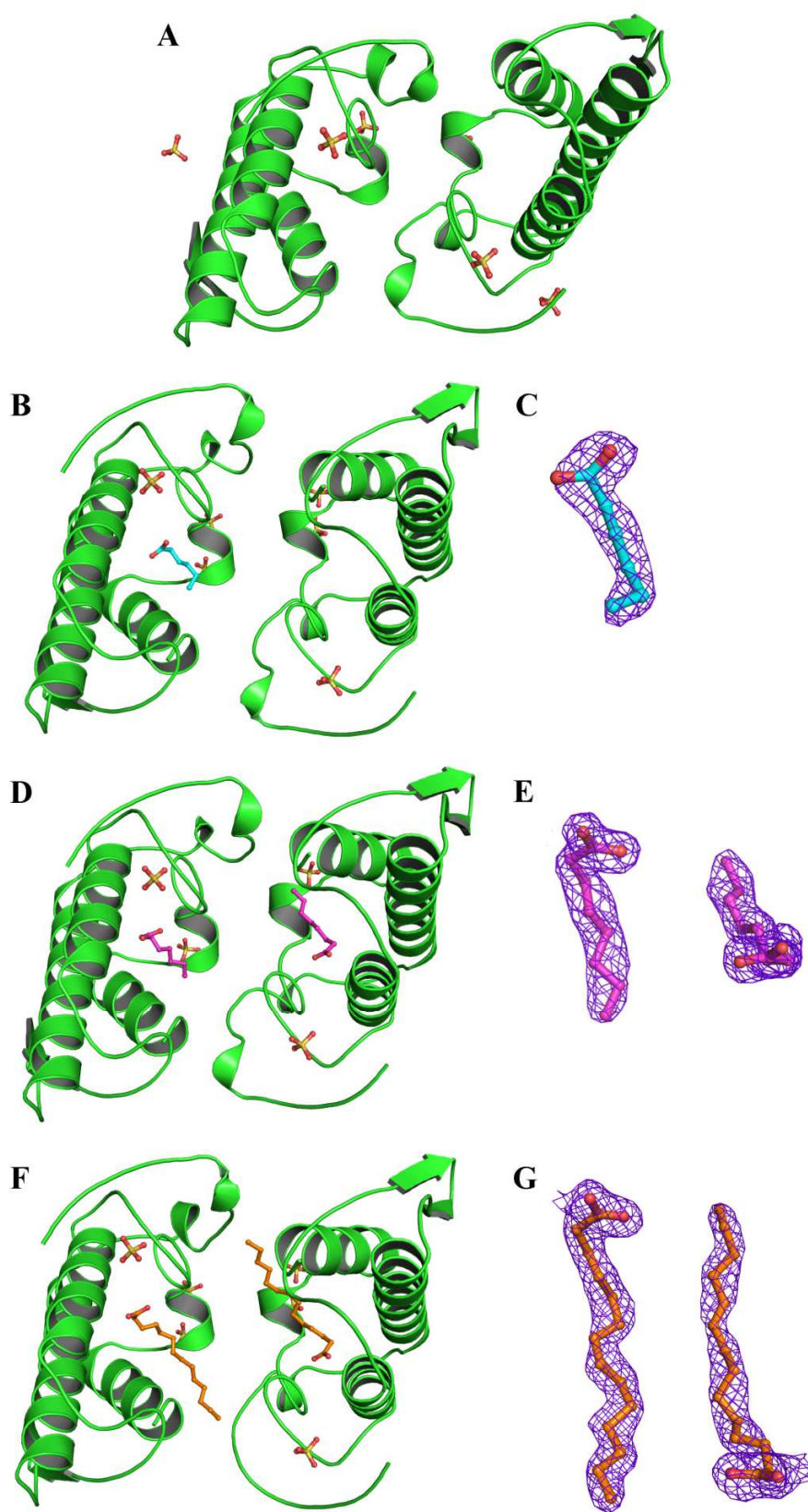


Figura 11: Estruturas cristalográficas da MjTX-II nativa e dos complexos MjTX-II/ácidos graxos e os respectivos mapas de densidade eletrônica dos ligantes. **A.** MjTX-II nativa; **B.** MjTX-II/AG6; **D.** MjTX-II/AG8; **F.** MjTX-II/AG14 e os ácidos graxos mostrados em detalhe com os mapas de densidade eletrônica (C, E e G - 6 carbonos, 8 carbonos e 14 carbonos respectivamente). As moléculas foram adicionadas para facilitar a visualização. Os mapas foram calculados com os coeficientes $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$ e contorno de $1,0 \sigma$.

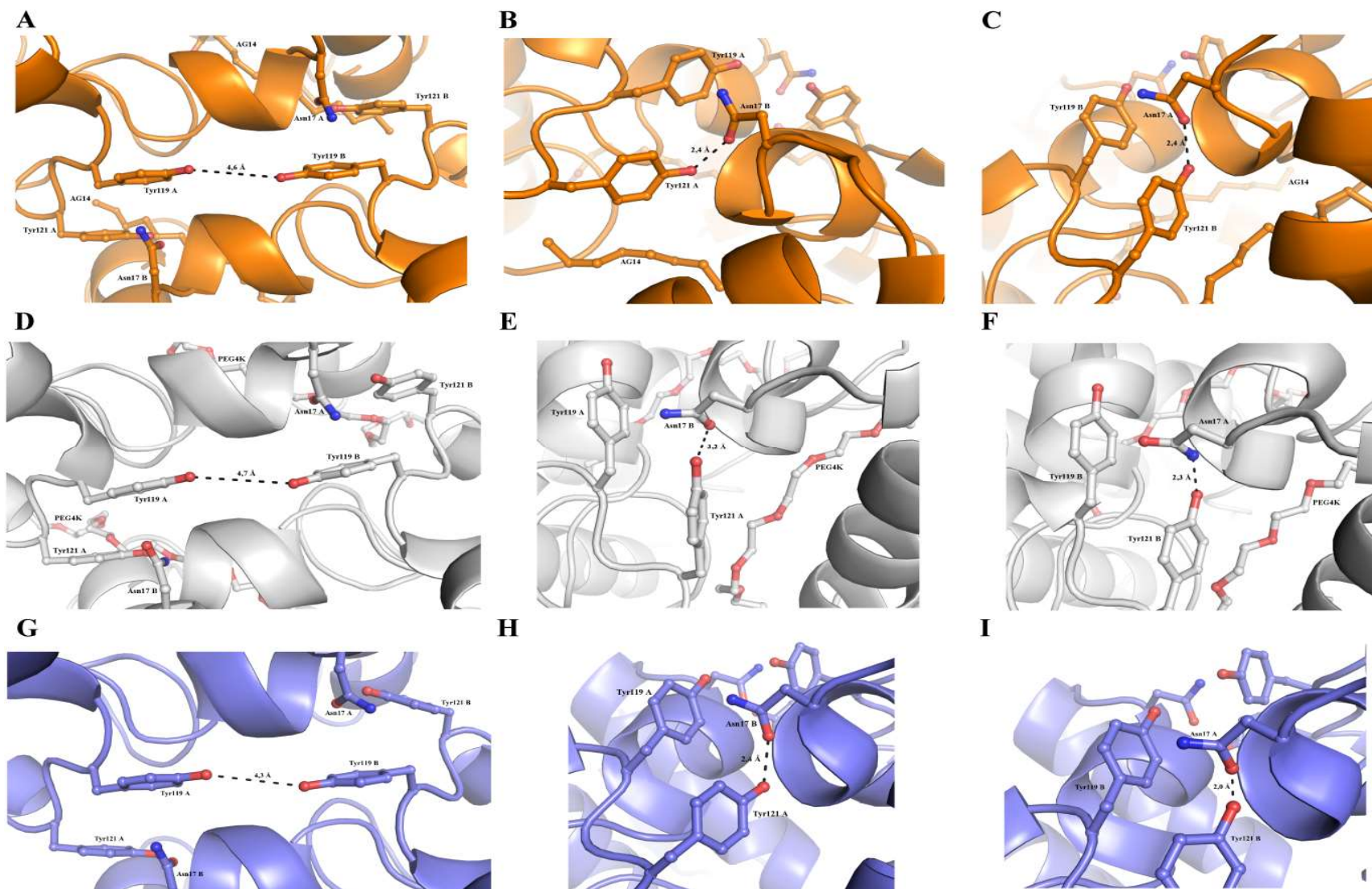


Figura 13: Alteração estrutural que modifica a região da ligação Tyr119-Tyr119. **A-C.** Estrutura da MjTX-II/AG14; **D-F.** Estrutura da MjTX-II/PEG4000; **G-I.** Estrutura da MjTX-II/AG18.

Nas estruturas elucidadas da MjTX-II nativa, MjTX-II/AG6 e MjTX-II/AG8, a ausência ou o modo diferenciado de ligação destas moléculas de ácido graxos de menor tamanho, provocam algumas mudanças no canal hidrofóbico, como a movimentação da cadeia lateral do aminoácido Tyr121, deixando este resíduo em uma posição distinta. Com isso, para que o dímero volte a ficar estabilizado, a ligação entre as cadeias laterais dos aminoácidos Tyr119 é observada novamente (Figura 14).

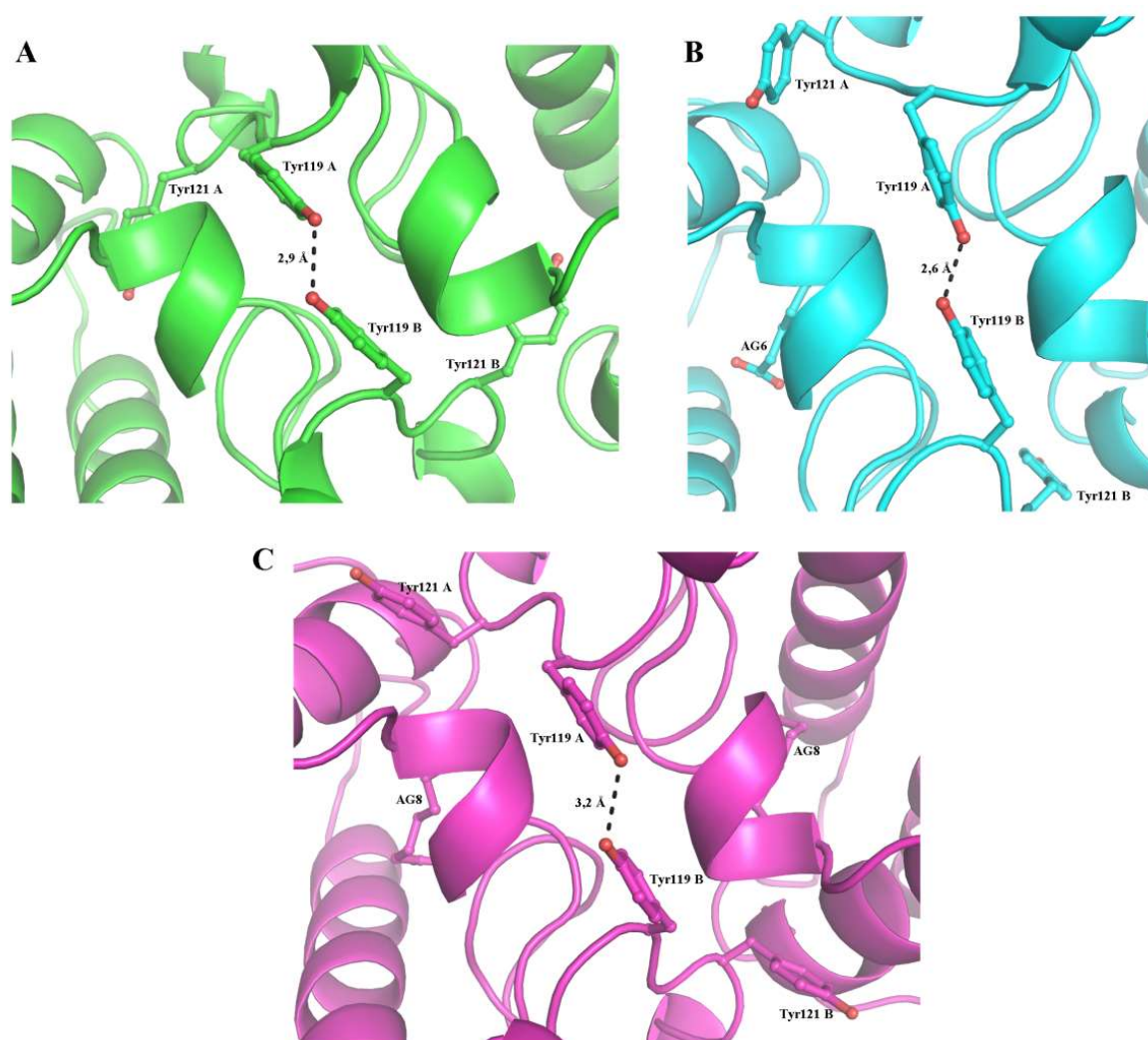


Figura 14: Ligações de hidrogênio Tyr119A-Tyr119B. **A.** Estrutura da MjTX-II nativa; **B.** Estrutura da MjTX-II/AG6; **C.** Estrutura da MjTX-II/AG8.

A inexistência da ligação do resíduo Tyr121 e Asn17 não interfere no posicionamento para a ação da toxina, pois ligação de hidrogênio entre as cadeias laterais da Tyr119 possibilitam a correta posição e alinhamento dos sítios funcionais para a ação da toxina, sugerindo que a entrada das moléculas no canal hidrofóbico da MjTX-II seria dispensável para a expressão da atividade miotóxica desta toxina.

Outra evidência para a independência das moléculas de ácido graxo para a ativação da MjTX-II é a presença dos íons sulfatos próximos aos sítios MDoS de ambos os monômeros da estrutura nativa e complexada com ácido graxo de 6 e 8 carbonos, como observado nas Lys49-PLA₂s complexadas (Figura 15).

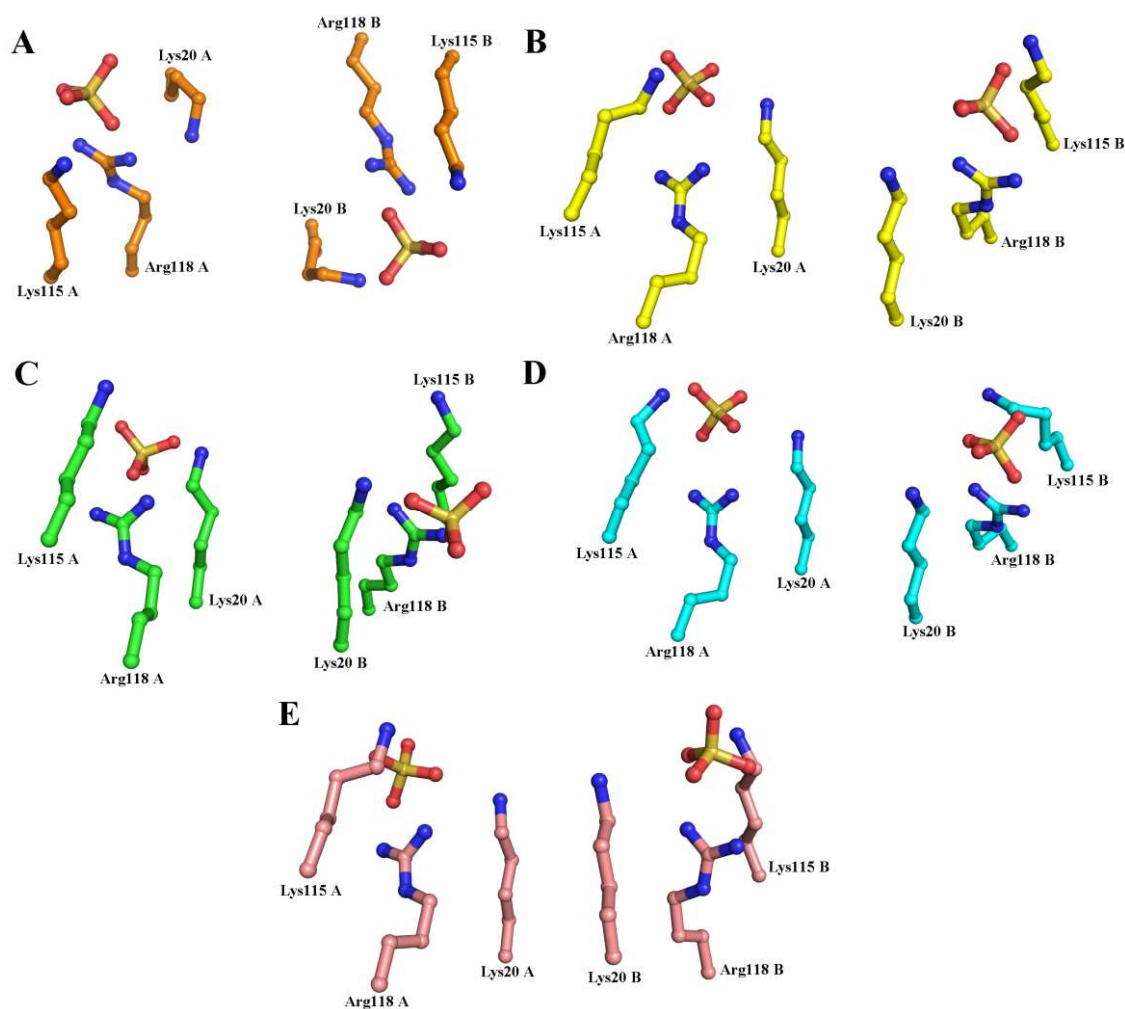


Figura 15: Localização dos íons sulfatos nas estruturas cristalográficas das Lys49-PLA₂s. **A.** PrTX-I/vitamina E (PDB id: 3CYL); **B.** MjTX-II/AG6; **C.** MjTX-II/AG8; **D.** MjTX-II/AG14; **E.** MjTX-II nativa.

Portanto, pelas evidências observadas, pode-se dizer que independentemente da presença ou do tamanho da molécula de ácido graxo no canal hidrofóbico da MjTX-II, esta irá sempre se encontrar na forma ativa, diferentemente de outras Lys49-PLA₂s como PrTX-I ou BthTX-I, por exemplo.

4.3. Complexo da MjTX-II com o inibidor ácido rosmarínico

Os resultados apresentados por Salvador e colaboradores (2013) mostram que a MjTX-II apresenta atividade miotóxica similar a outras Lys49-PLA₂s (Heluany *et al.*, 1992; Soares *et al.*, 2001; De Oliveira *et al.*, 2003; Oshima-Franco *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2004; Cavalcante *et al.*, 2005; Gallacci *et al.*, 2006; Stabeli *et al.*, 2006; Cavalcante *et al.*, 2007; Randazzo-Moura *et al.*, 2008; Ponce-Soto *et al.*, 2009; Dos Santos, Cardoso, *et al.*, 2011), promovendo o bloqueio das contrações em preparações de músculo diafragma produzidas por estímulos de forma direta e indireta. A paralisia promovida por PLA₂s miotóxicas pode ser atribuída à diminuição da excitabilidade da fibra muscular, resultante da despolarização prolongada decorrente da alteração da permeabilidade da membrana celular.

Após a pré-incubação da MjTX-II (1 μ M) com ácido rosmarínico (38,57 μ M), foi prevenido cerca de 80% da paralisia promovida pela toxina. O composto AR aplicado sozinho, não interferiu na contração muscular quando comparado com o controle (Figura 16).

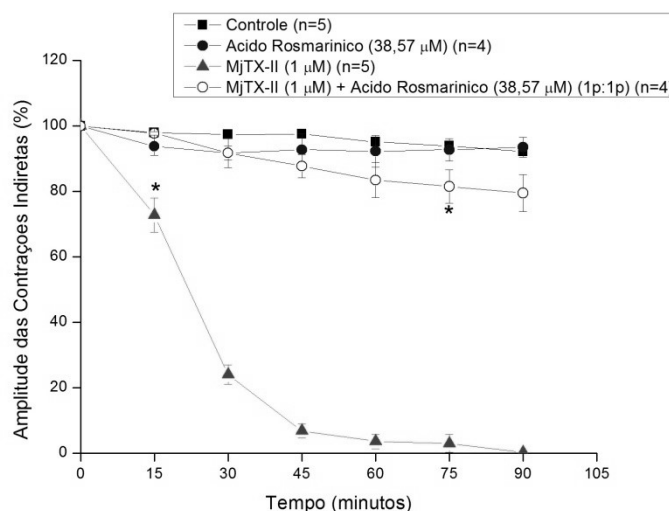


Figura 16: Gráfico que representa a amplitude das contrações de forma indireta. O grupo controle (sem toxina e ácido rosmarínico— quadrado preto), ácido rosmarínico sozinho (círculo azul), MjTX-II (triângulo magenta) e MjTX-II/ácido rosmarínico (círculo sem preenchimento) são mostrados no gráfico. A amplitude das contrações se manteve próximo a 80% após a adição do complexo MjTX-II/AR.

A Figura 17 mostra o termograma resultante da titulação da MjTX-II com ácido rosmarínico utilizando o equipamento de ITC. Não foi possível obter constantes termodinâmicas da reação, indicando que o ligante apresenta baixa afinidade pela proteína. Tal fato pode ser comprovado pela forma do termograma, uma vez que este apresentou semelhante a sistemas com baixa constante de Wiseman (Wiseman *et al.*, 1989), calculada em função da constante de afinidade e da concentração da macromolécula em questão. Dessa

forma, objetivando-se determinar a constante de dissociação do sistema seria necessário aumentar muito a concentração do ligante em uma nova titulação (Perozzo *et al.*, 2004), o que pode inviabilizar o experimento.

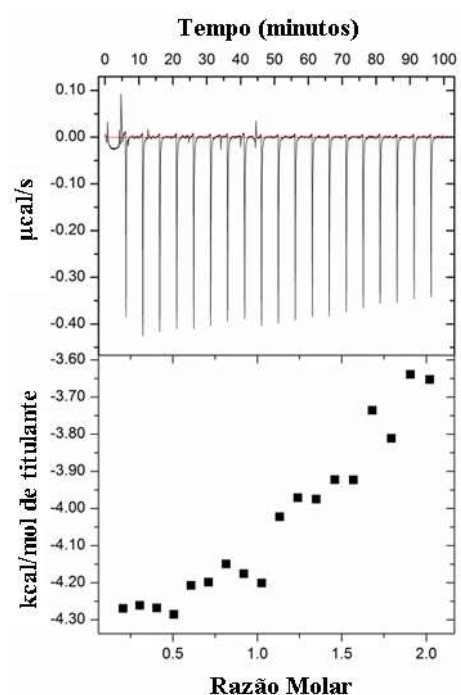


Figura 17: Titulação calorimétrica de ácido rosmarínico em MjTX-II. Painel superior mostra os dados brutos (potência térmica em função do tempo) da titulação de 200 μL de ácido rosmarínico à 450 μM em MjTX-II à 45 μM . Painel inferior mostra a isoterma de ligação (calor integrado normalizado pelo ligante em função da razão molar).

Experimentos de cristalização com amostra pré-incubada de MjTX-II/AR resultaram em cristais convenientes para experimentos de difração de raios X após aproximadamente 60 dias (Figura 18).

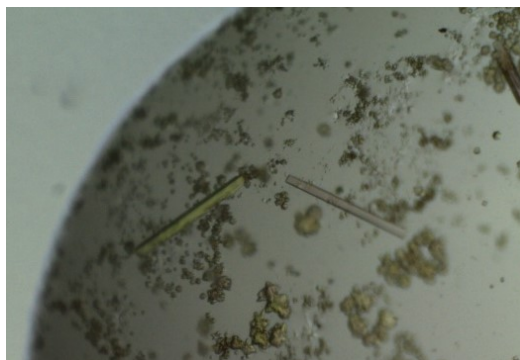


Figura 18: Monocristais do complexo MjTX-II/AR crescidos na temperatura de 18 °C.

O cristal montado no *loop* de *nylon* foi levado para coleta de dados por difração de raios X, sendo coletados 360 imagens usando o detector (PILATUS 2M - Dectris), presente na linha de luz MX-2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron. Após processamento com o programa HKL2000 (Otwinowski e Minor, 1997), a estrutura foi determinada por substituição molecular e revelou duas moléculas na unidade assimétrica, no grupo espacial $P2_12_12_1$. Ao final do processo de refinamento, foi obtido os valores de $R_{\text{crist}}=15,71\%$ e $R_{\text{free}}=19,10\%$ com 1,60 Å de resolução. Os dados de coleta de dados e refinamento estão mostrados na Tabela 3.

Tabela 3: Estatísticas de coleta de dados e refinamento estrutural do complexo MjTX-II/AR

Cela unitária (Å)	a=46,1; b=65,8; c=90,4
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Resolução (Å)	23,75 – 1,60 (1,67 – 1,60) ^a
Reflexões únicas	37066 (4479) ^a
Completeza (%)	99,7 (98,3) ^a
<i>I</i> / σ (<i>I</i>)	21,82 (2,96) ^a
Multiplicidade	9,7 (4,7) ^a
Moléculas na UA	2
R_{merge} ^b (%)	10,5 (72,3) ^a
R_{cryst}	15,71
R_{free}	19,10
Número de átomos (não hidrogênios)	
Proteína	1913
Águas	398
Moléculas de Ácido Rosmarínico	1
Fator de temperatura médio (Å ²)	20.6
Gráfico de Ramachandran (%) ^c	
Favoráveis	96,92
Não Favoráveis	0,0

^a Números entre parênteses são para a camada de maior resolução.

^b $R_{merge} = \sum_{hkl} [\sum_i (I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle)] / \sum_{hkl} \langle I_{hkl} \rangle$, onde $I_{hkl,i}$ é a intensidade de uma medida individual da reflexão com os índices de Miller *h*, *k* e *l*, e $\langle I_{hkl} \rangle$ é a média das intensidades da reflexão. Calculado para $I \geq 3\sigma(I)$.

^c Calculado pelo programa *MolProbity*

A estrutura final mostrou um dímero na unidade assimétrica (Figura 19A) com a interação de uma molécula de ácido rosmarínico (Figura 19B) próximo aos resíduos do MDiS e 398 moléculas de água.

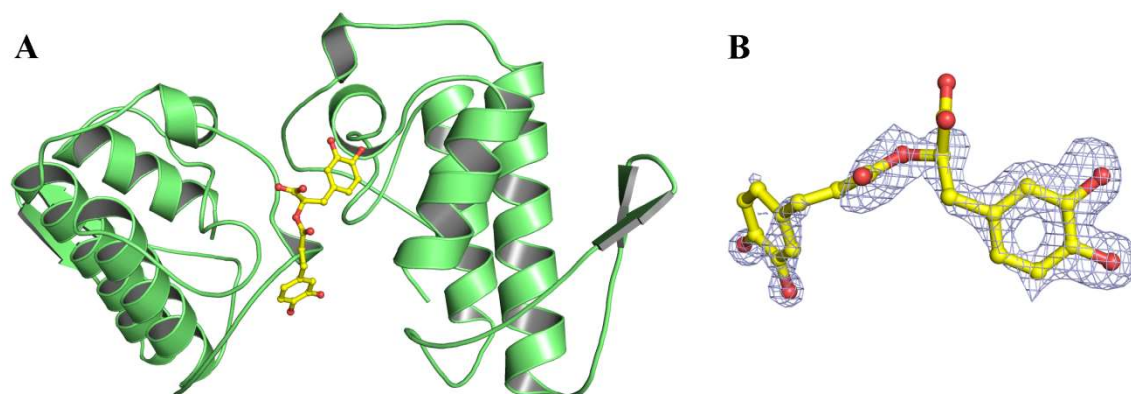


Figura 19: Estrutura cristalográfica da MjTX-II/AR. **A.** Pode se observar a molécula de AR interagindo com a porção C-terminal de ambos monômeros. **B.** Mapa de densidade eletrônica da molécula de AR na estrutura da MjTX-II. A molécula em amarelo foi adicionada para facilitar a visualização. Os mapas foram calculados com os coeficientes $|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$ e contorno de $1,0 \sigma$.

Como mostrado acima, a pré-incubação da MjTX-II com AR neutraliza o efeito miotóxico da toxina de forma eficiente e similar aos descritos para as Lys49-PLA₂s complexadas com inibidores de origem vegetal e sintéticos (PrTX-I/AR, MjTX-I/suramina, MjTX-II/suramina e BaspTX-II/suramina).

Como proposto em 2011, o modo em que o inibidor interage com a toxina no complexo PrTX-I/AR, causa o bloqueio da entrada de substratos ao canal hidrofóbico da toxina, impedindo a ativação alostérica necessária para o alinhamento dos resíduos do MDoS, e posteriormente a ação da toxina (Dos Santos, Cardoso, *et al.*, 2011). Em contraste com a estrutura da PrTX-I/AR, a estrutura cristalográfica do complexo MjTX-II/AR mostra a ligação uma molécula do inibidor interagindo com a estrutura protéica (Figura 20A) em uma região distinta (Figura 20B). Na estrutura da MjTX-II/AR, a molécula inibidora se posiciona bloqueando os resíduos do sítio MDiS (Figura 20C).

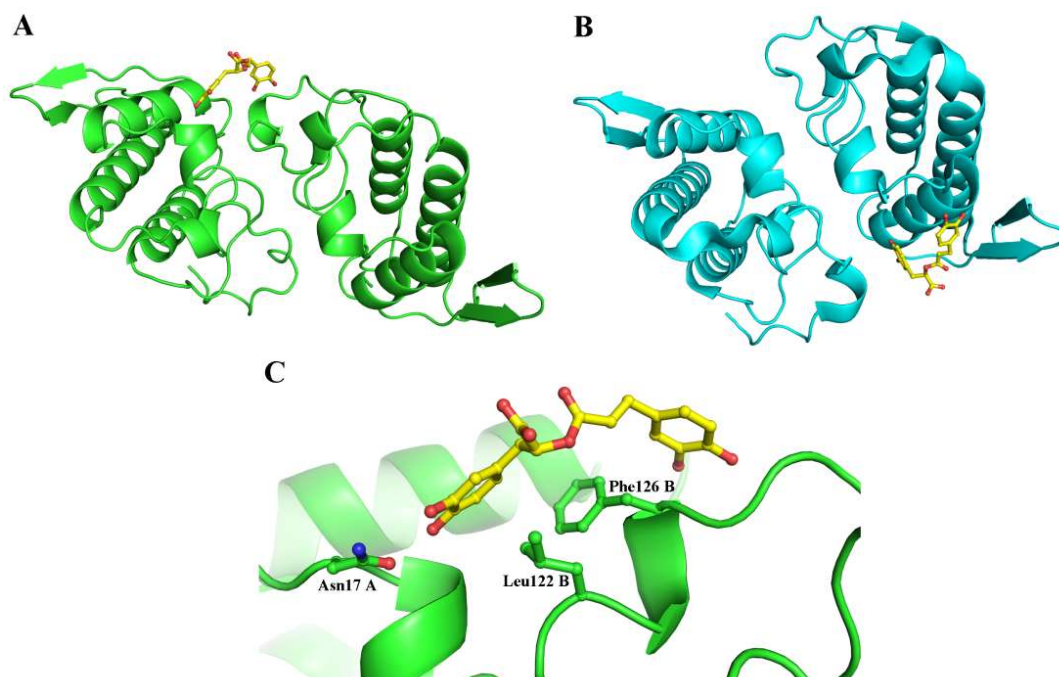


Figura 20: Estrutura cristalográfica das Lys49-PLA₂s complexadas com AR. **A.** MjTX-II/AR (verde); **B.** PrTX-I/AR (ciano); **C.** Local de interação da molécula de ácido rosmarínico com a estrutura da MjTX-II/AR, o qual estão destacados os resíduos do MDiS (Leu122 e Phe126) interagindo com a porção rígida da molécula inibidora e o resíduo Asn17, que interage com a região flexível de AR.

Como observado na Figura 20, a molécula inibidora possui duas regiões de interação, a "rígida" (fator de temperatura médio 31,53 Å²) interagindo com a porção N-terminal do monômero A (Pro18, Ans17 e Ala19) e o resíduo Leu122 do monômero B, e a "flexível" (a baixa qualidade do mapa de densidade eletrônica mostrado na Figura 19 indica uma alta variação de posicionamento da molécula - fator de temperatura médio 37,81 Å²) pode estar interagindo com a porção C-terminal (incluindo o resíduo Phe126 - MDiS) do monômero B ou exposta ao solvente (Figura 21).

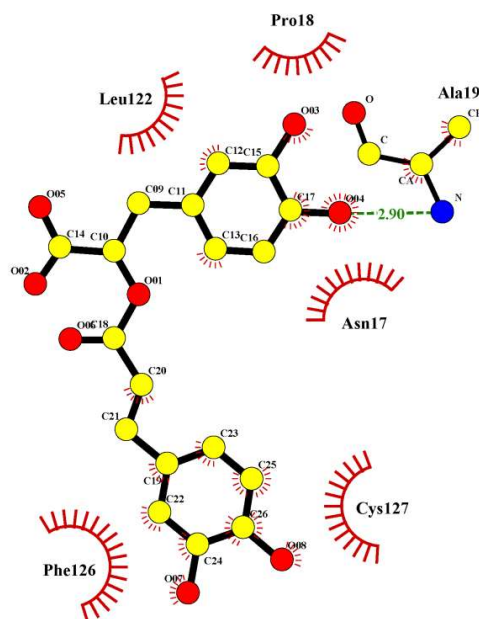


Figura 21: Interação da molécula de ácido rosmarínico na estrutura da MjTX-II. A ligação de hidrogênio entre o inibidor e o resíduo Ala19 é mostrada pelas linhas pontilhadas e os contatos hidrofóbicos são mostrados pelo pelos arcos. Figura feita usando o programa *Ligplot* (Wallace *et al.*, 1995).

Além disso, a superposição das estruturas de MjTX-II/AR com outras Lys49-PLA₂s (Figura 22) mostra diferenças na estrutura quaternária associada com a presença da molécula inibidora nesta região, a qual impossibilita a entrada de substratos no canal hidrofóbico da toxina e impede o correto alinhamento dos resíduos do MDoS, semelhante ao modo de inibição sugerido para a PrTX-I/RA.

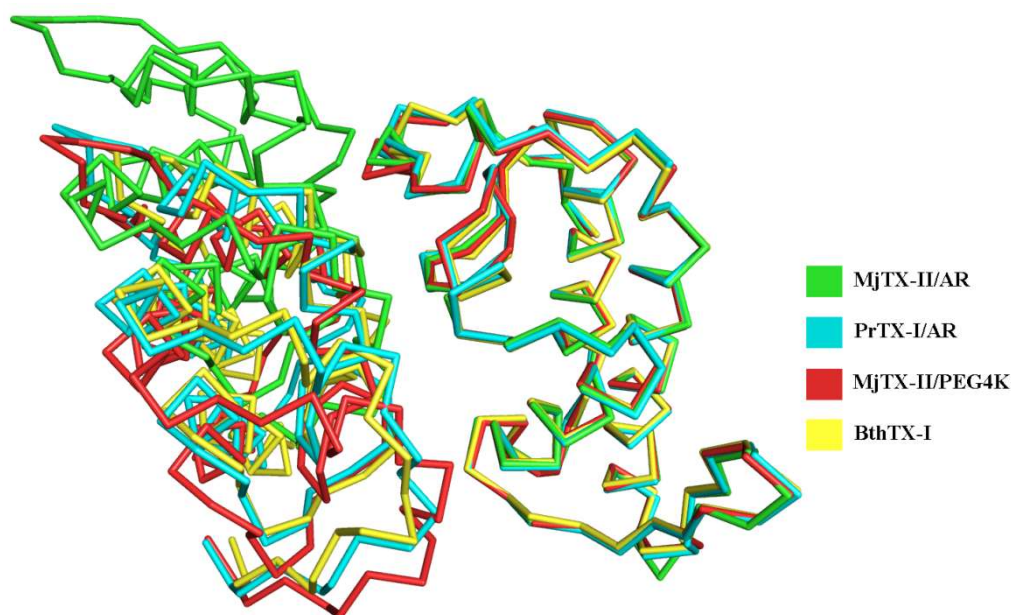


Figura 22: Sobreposição das estruturas cristalográficas representadas em *ribbons*. MjTX-II/AR (verde), PrTX-I/AR (ciano), MjTX-II/PEG4K (vermelho) e BthTX-I (amarelo). Pode-se notar a diferença estrutural da molécula de MjTX-II/AR (verde) que foi provavelmente causada pela presença da molécula inibidora de AR.

4.4. Complexo MjTX-II/suramina

A toxina MjTX-II (1 μ M) promove o bloqueio da contração com estímulos na forma direta e indireta nas preparações neuromusculares, porém após a pré-incubação da toxina (1 μ M) com suramina (10 μ M), a paralisia promovida pela toxina foi prevenida em aproximadamente 85 %, independentemente se o estímulo era feito de forma direta ou indireta. A suramina quando aplicada sozinha, não alterava a contração muscular, quando comparado com o controle (Figura 23).

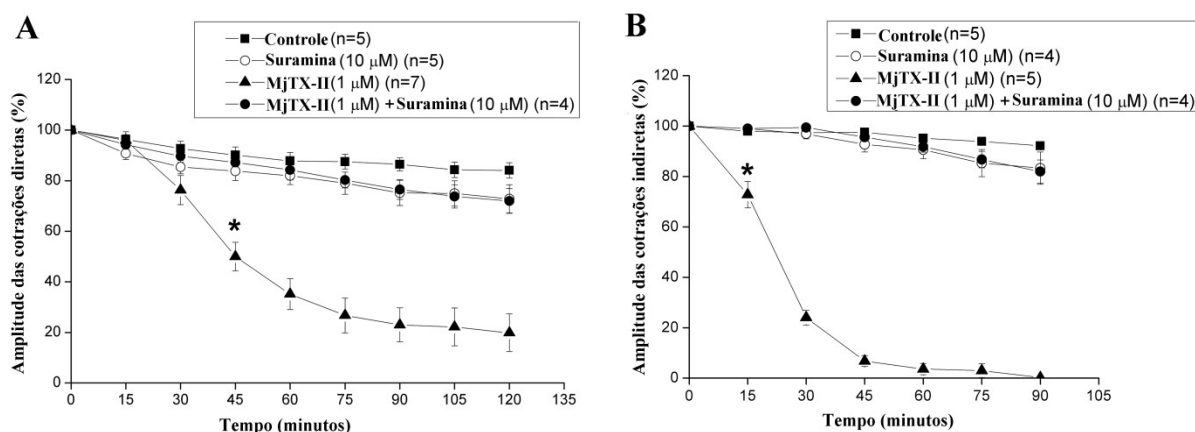


Figura 23: Gráfico que demonstra a amplitude das contrações. Forma direta (A) e indireta (B). O grupo controle (sem toxina ou inibidor – quadrado), suramina sozinha (círculo branco), MjTX-II (triângulo) e MjTX-II/suramina (círculo preto) são mostrados no gráfico. A amplitude das contrações se manteve em torno de 85 % após a adição do complexo MjTX-II/suramina.

A pré-incubação da MjTX-II com suramina, neutraliza o efeito da toxina sobre o músculo, semelhante aos resultados descritos anteriormente para outras PLA₂s homólogos, como a BthTX-I (De Oliveira *et al.*, 2003), BaspTX-II (Murakami *et al.*, 2005) e Ecarpholina S, uma Ser49-PLA₂ (isolada do veneno de *Echis carinatus* - (Zhou *et al.*, 2008)).

Os cristais do complexo MjTX-II/suramina obtidos (Figura 24) foram levados à coleta e o conjunto de dados composto por 127 imagens (oscilação de 1°) foram processados a 1,9 Å de resolução.

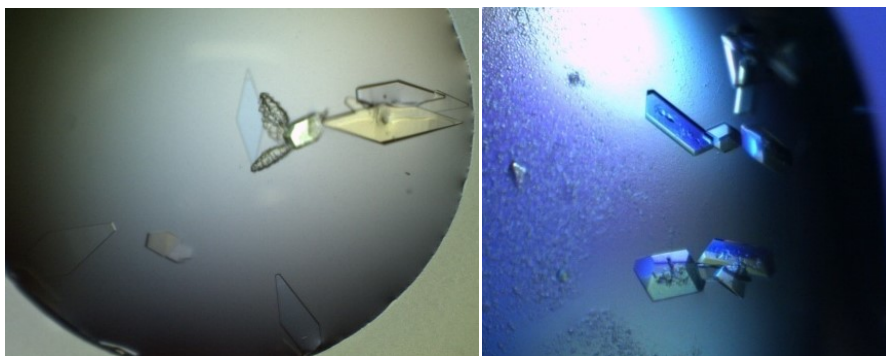


Figura 24: Monocristais do complexo MjTX-II/suramina crescidos na temperatura de 18 °C.

O cristal pertence ao grupo espacial $P2_12_12_1$ e a estrutura resolvida por substituição molecular é composta por duas moléculas na unidade assimétrica. As estatísticas de refinamento da estrutura final feita pelo programa *PHENIX* v.1.8.4 (Adams *et al.*, 2010) e os valores de análise estereoquímica obtidos pelo programa *online Molprobit* (Chen *et al.*, 2010) estão na Tabela 4.

Tabela 4: Estatísticas de coleta de dados e refinamento estrutural do complexo MjTX-II/suramina.

Cela unitária (Å)	a=50,8; b=63,6; c=87,7
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Resolução (Å)	31,82 – 1,90 (1,96 – 1,90) ^a
Reflexões únicas	23031 (2258) ^a
Completeza (%)	99,9 (99,7) ^a
<i>I</i> / σ (<i>I</i>)	8,6 (2,5) ^a
Multiplicidade	4,9 (4,7) ^a
Moléculas na UA	2
<i>R</i> _{merge} ^b (%)	14,4 (78,9) ^a
<i>R</i> _{cryst}	19,7
<i>R</i> _{free}	22,8
Número de átomos (não hidrogênios)	
Proteína	1916
Águas	197
Moléculas de suramina	2
Moléculas de PEG 4000	3
Íons Sulfato	7
Fator de temperatura médio (Å ²)	20,6
Gráfico de Ramachandran (%) ^c	
Favoráveis	95,0
Não Favoráveis	0,91

^a Números entre parênteses são para a camada de maior resolução.

^b $R_{merge} = \sum_{hkl} [\sum_i (I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle)] / \sum_{hkl} \langle I_{hkl} \rangle$, onde $I_{hkl,i}$ é a intensidade de uma medida individual da reflexão com os índices de Miller *h*, *k* e *l*, e $\langle I_{hkl} \rangle$ é a média das intensidades da reflexão. Calculado para $I \geq 3\sigma(I)$.

^c Calculado pelo programa *MolProbity*

A estrutura final revelou um dímero na conformação alternativa, 3 moléculas de PEG4000, 7 moléculas do íon sulfato, 2 moléculas de suramina e 259 moléculas de água (Figura 25A) na unidade assimétrica. Assim como observado em outras Lys49-PLA₂S, duas moléculas de PEG4000 se localizam próximo a cadeia lateral do resíduo His48 em cada monômero e a terceira se localiza próximo a Lys7 do monômero B (esta molécula de PEG4000 também se liga à Lys7 do monômero A, quando aplicado a operação de simetria) (Figura 25B). As moléculas de suramina interagem com a superfície dos monômeros da

MjTX-II/suramina de maneira simétrica, tendo contato com resíduos presentes no C e N terminal da toxina. Este modo de ligação na superfície da toxina, também auxilia na interação com outras suraminas adjacentes e outros aminoácidos, formando um oligômero com quatro moléculas (Figura 25B) na cela unitária cristalina, onde curiosamente, há também a formação de dois dímeros na conformação alternativa.

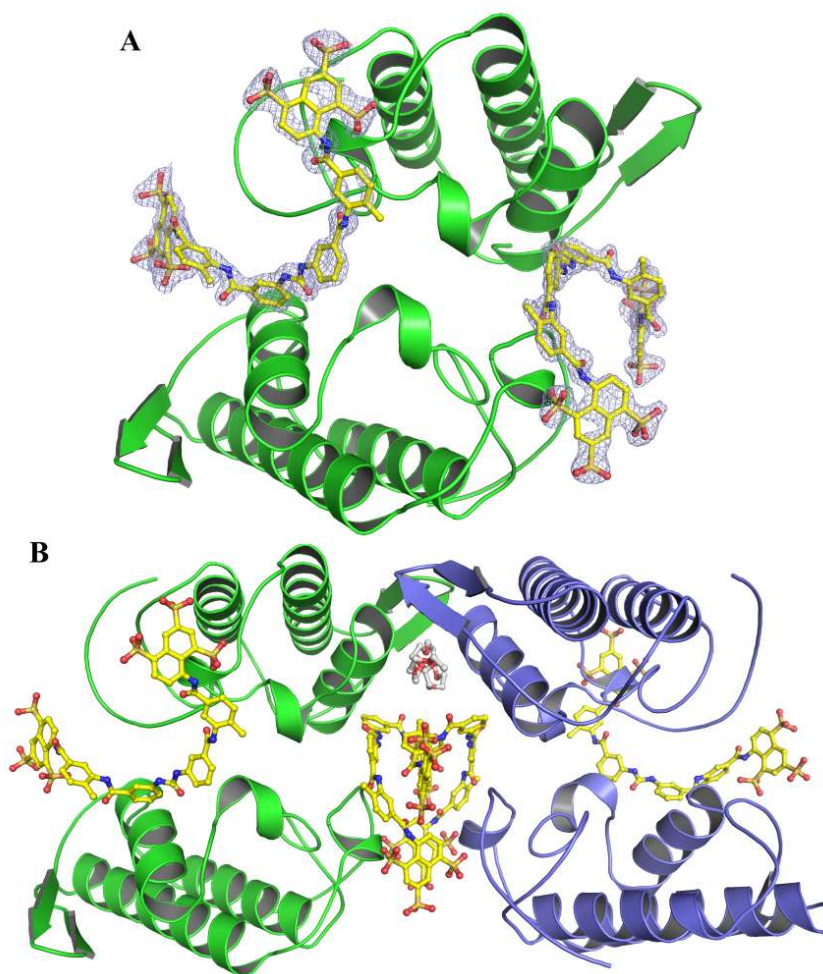


Figura 25: Estrutura cristalográfica do complexo MjTX-II/suramina. **A.** *Cartoon* do estrutura mostrada em verde e as moléculas de suramina estão mostradas em *sticks* amarelos. O mapa de densidade eletrônica (coeficientes $|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$) do inibidor com o contorno de $1,0 \sigma$. **B.** Conformação tetramérica do complexo formado por dois dímeros na unidade assimétrica, conformação também sugerida pelo programa PISA (Krissinel e Henrick, 2007).

Na estrutura da MjTX-II/suramina, pode-se observar vários contatos hidrofóbicos e três interações polares (Figura 26) entre o inibidor e a superfície da toxina em ambos monômeros, que ocasiona a formação do complexo tetramérico, principalmente pela interação entre as moléculas de suramina.

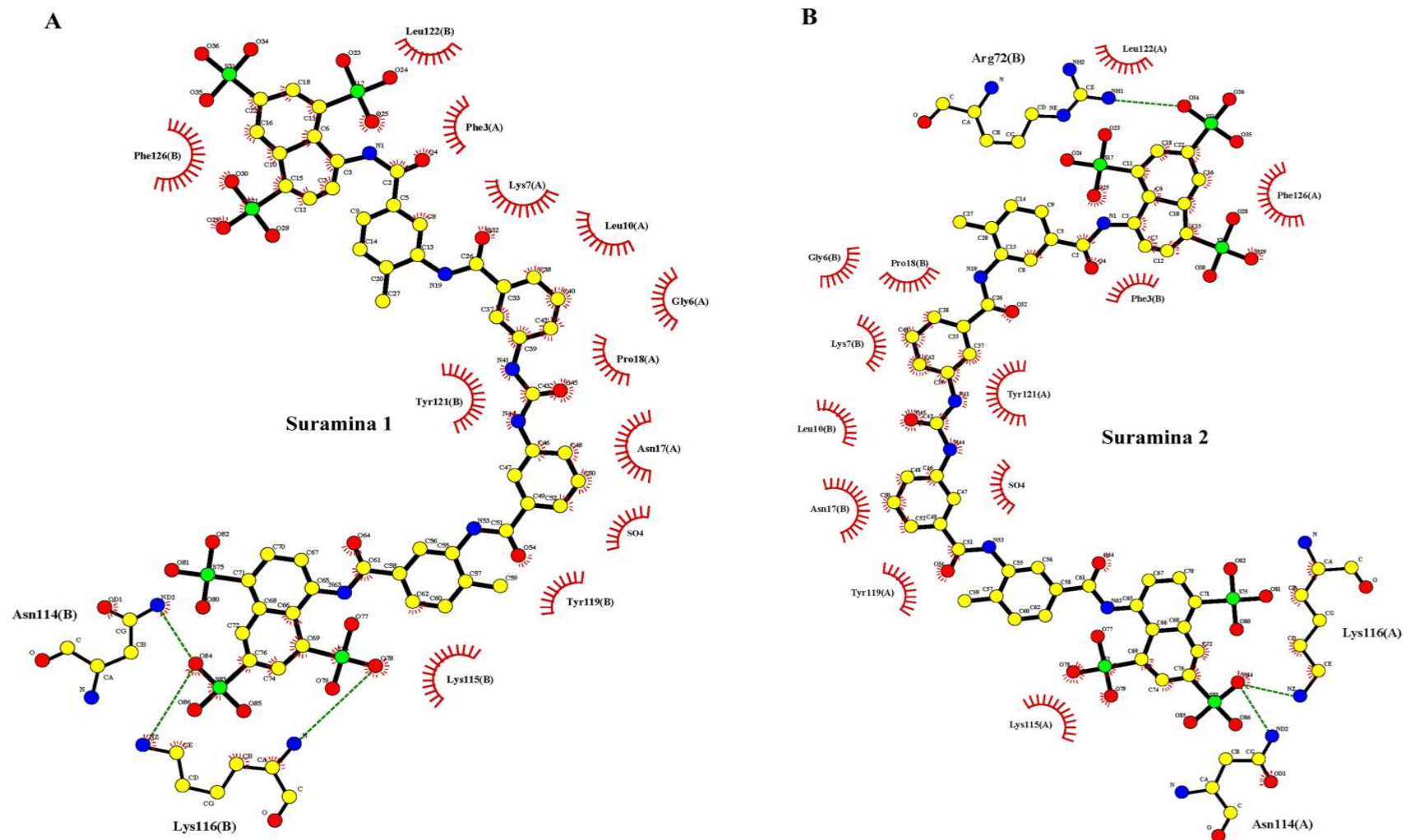


Figura 26: Interação das moléculas de suramina na estrutura da MjTX-II. **A** e **B** representam a interação das suraminas 1 e 2 nos monômeros A e B da MjTX-II, respectivamente. As ligações de hidrogênio são mostrados pelas linhas pontilhadas e os contatos hidrofóbicos são mostrados pelo pelos arcos. Figura feita pelo programa *Ligplot* (Wallace *et al.*, 1995).

Dados estes resultados, foram executados experimentos de dinâmica molecular com o intuito de verificar a estabilidade da estrutura tetramérica do complexo observado na cela unitária. Para isso, foram usados dois modelos diferentes: o primeiro era composto por um complexo tetramérico (quatro moléculas de proteína e quatro moléculas de suramina ligadas na interface do complexo) e o segundo era composto por quatro moléculas da proteína sem nenhuma molécula de suramina.

Após o tempo de 50 ns de simulação o complexo tetramérico com a suramina demonstrou valores mais baixos de RMSD e de flutuação dos resíduos quando comparado com a estrutura tetramérica sem o inibidor (Figura 27). Portanto, podemos dizer que a estrutura tetramérica ligada com as moléculas de suramina apresenta menor tendência de movimento dos dímeros, pois as moléculas de suramina auxiliam na estabilização deste tetrâmero formado.

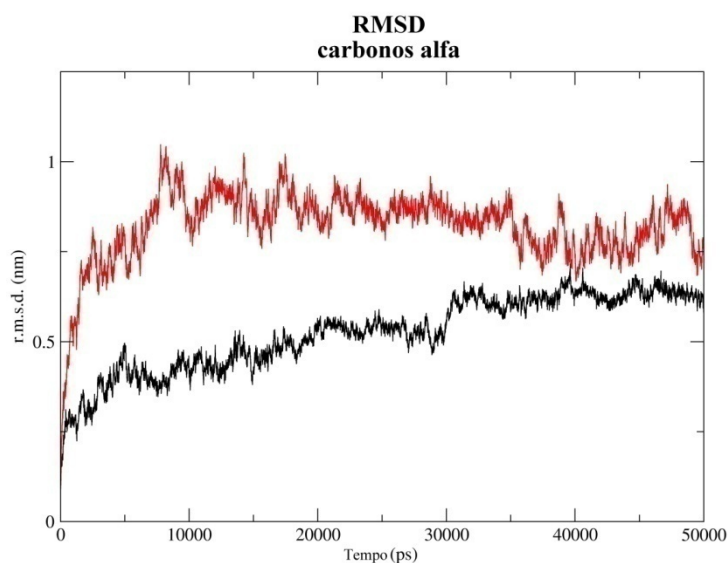


Figura 27: Média do RMSD dos carbonos alfa das cadeias principais do complexo tetramérico da MjTX-II. O gráfico para a estrutura sem os ligantes (vermelho) e o complexo tetramérico MjTX-II/suramina (preto) são mostrados ao longo do tempo de 50 ns de dinâmica molecular.

A interação entre a MjTX-II e a suramina foi avaliada por ITC. Uma representação de uma titulação calorimétrica é mostrada na Figura 28. O termograma exibe comportamento bifásico, indicando ao menos 2 eventos distintos de ligação. Para evitar restrições em relação aos sítios de ligação, foi adotado um modelo geral com 2 sítios de ligação (uma molécula de ligante para cada monômero de MjTX-II) baseado nas constantes gerais de associação (β_1 e β_2) e entalpias de ligação (ΔH_1 e ΔH_2). A análise de regressão não linear permitiu estimar os parâmetros de ligação (Tabela 5). A constante de interação α

($=4\beta_2/\beta_1^2$) de 0,1 e coeficiente de Hill de 0,5 indicaram que os sítios de ligação são não idênticos ou tem cooperatividade negativa (Brown, 2009). Além disso, devido à simetria estrutural na MjTX-II (como mostrado nos dados cristalográficos) os sítios de ligação das moléculas inibidoras podem ser considerados idênticos com cooperatividade negativa.

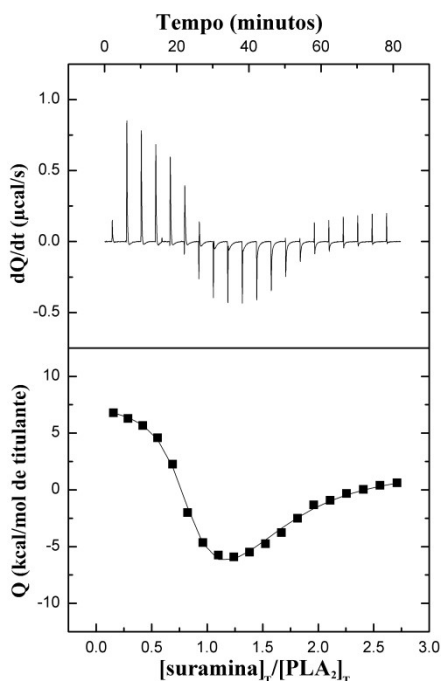


Figura 28: Titulação calorimétrica de suramina em MjTX-II. O painel superior apresenta o termograma (potência térmica pelo tempo) para titulações de 200 μL de 45 μM MjTX-II com 600 μM suramina. O painel inferior mostra o isoterma de ligação (calor integrado normalizado pelo ligante em função da razão molar). Alterações de afinidade e entalpia foram determinadas por um modelo de regressão não-linear considerando-se dois sítios de ligação (linha contínua).

Tabela 5: Parâmetros termodinâmicos globais e específicos da titulação MjTX-II/suramina

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

k_{d1} e k_{d2} , constantes intrínsecas de dissociação para a ligação do primeiro e segundo inibidores. Δh_1 e Δh_2 , entalpias de ligação intrínsecas para o primeiro e segundo evento de ligação. β_1 e β_2 , constantes de associação gerais para o primeiro e segundo evento de ligação. ΔH_1 e ΔH_2 , entalpia da ligação geral dos dois eventos de ligação. α constante de cooperatividade ($=4\beta_2/\beta_1^2$). Δh entalpia de cooperatividade. n_H coeficiente de Hill ($= 2/(1+\alpha^{-1/2})$).

Os parâmetros de ligação específicos de cada sítio foram calculados a partir dos parâmetros gerais de constante de associação: as constantes de dissociação para a ligação do primeiro e segundo eventos e suas correspondentes entalpias (Tabela 4). O primeiro evento de ligação apresentou uma constante de dissociação de 0,6 μM , enquanto o segundo evento de ligação apresentou constante de dissociação de 6,2 μM (redução de 10 vezes na afinidade de ligação). Houve uma considerável diferença na entalpia de ligação: o primeiro evento exibiu entalpia desfavorável (ligação guiada entropicamente), enquanto o segundo evento exibiu

entalpia favorável (ligação guiada entalpicamente, com uma diferença de -23,4 kcal/mol). Considerando a menor afinidade de ligação do segundo evento e sua entalpia de ligação mais favorável, a ligação do segundo evento é acompanhada por uma grande e desfavorável entropia, que pode ser associada com a oligomerização da MjTX-II (tetramerização).

Para melhor estudar o processo de oligomerização, foram realizados experimentos de DLS com as amostras de MjTX-II nativa e MjTX-II/suramina na concentração de 2,5 mg/mL. Para a amostra nativa, temos uma população predominantemente dimérica em solução (polidispersividade de 12,0 %) com raio hidrodinâmico de 2,3 nm. A amostra pré incubada da MjTX-II com suramina mostrou a formação de um oligômero (polidispersividade de 14,9%), com o raio hidrodinâmico calculado de 5,4 nm, sugerindo assim, que a suramina induz a formação de um oligômero.

Além disso, o experimento de cromatografia de exclusão molecular analítica exibiu 3 picos no cromatograma resultante, sendo eles correspondentes a amostra de MjTX-II tetramérica, MjTX-II dimérica e agregados do ligante suramina (Figura 29A). As massas moleculares dos padrões e dos picos obtidos foram calculadas pelo utilizando o coeficiente de partição K_{av} e colocados no gráfico à partir do $\log$ da massa molecular (Figura 29B).

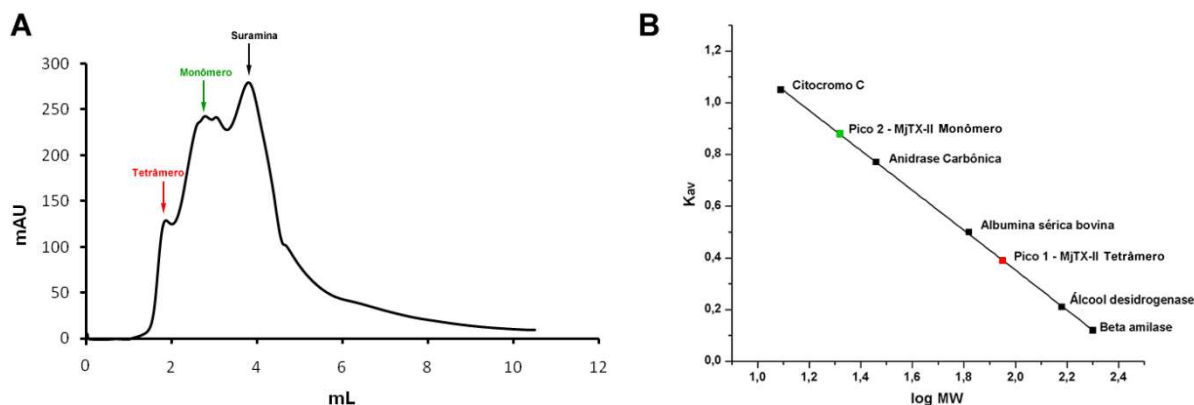


Figura 29: Análise da conformação oligomérica da MjTX-II/suramina por cromatografia de exclusão molecular analítica. **A.** Cromatograma obtido por cromatografia de exclusão molecular analítica da MjTX-II pré incubada com suramina em 50 mM de Tris HCl pH 5,9. A curva mostra a MjTX-II/suramina em diferentes posições no cromatograma, além de ser possível observar um pico correspondente à agregados de suramina. **B.** Curva de calibração determinada usando proteínas padrão mostram diferentes conformações oligoméricas da MjTX-II. As proteínas padrão foram obtidas do kit de calibração de proteínas de baixo peso (Sigma-Aldrich) contendo: Álcool desidrogenase (200 kDa), Albumina de soro bovino (66 kDa), Anidrase carbônica (29 kDa) e Citocromo C (12,4 kDa).

4.4.1. Oligomerização da estrutura MjTX-II/suramina

A maioria das estruturas cristalográficas de Lys49-PLA₂s depositadas no banco de dados estão na conformação dimérica, sendo esta configuração suportada por experimentos de DLS, SAXS e cromatografia de exclusão molecular (Murakami *et al.*, 2007b; Dos Santos *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2010; Fernandes *et al.*, 2014).

Assim como as outras Lys49-PLA₂s, a unidade assimétrica da estrutura cristalográfica da MjTX-II também apresenta um dímero (De Azevedo *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 2005; Salvador, Cavalcante, *et al.*, 2013), bem como estrutura da MjTX-II/suramina apresentada aqui. Porém, a análise da disposição das moléculas na unidade assimétrica e o modo de ligação das moléculas inibidoras, indica que esta interação das moléculas de suramina na superfície da toxina pode auxiliar na formação de um oligômero composto por quatro moléculas, sendo este formado por dois dímeros, como observado na cela unitária.

Para se confirmar a hipótese da formação da estrutura tetramérica na cela unitária induzida pelo inibidor e sua estabilidade, os resultados de dinâmicas moleculares do complexo tetramérico com a molécula inibidora mostram que o complexo fica mais estável até o final da simulação quando comparado ao complexo sem o inibidor.

Além disso, também pelos resultados obtidos por DLS, podemos dizer que a presença da molécula inibidora induz a formação de oligômeros, pois ocorre a alteração do raio hidrodinâmico após a adição da suramina. Os resultados de experimentos de ITC mostraram dois eventos de ligação com cooperatividade negativa caracterizados pelas constantes de dissociação. O primeiro evento com os valores de constante de dissociação maiores e entalpia positiva, são provavelmente correspondentes à ligação da suramina na superfície da toxina e os valores de constante de dissociação menores e entalpia negativa, podem estar relacionados com a interação entre os dímeros, com consequente formação do complexo tetramérico.

4.4.2. Evidências estruturais para a inibição da MjTX-II pela suramina

Pode-se observar na estrutura cristalográfica em alta resolução a interação da molécula inibidora em regiões importantes da toxina (considerando o atual mecanismo miotóxico para estas toxinas - (Fernandes *et al.*, 2013)), propondo um mecanismo de inibição específico para esta toxina.

Como já descrito por dos Santos e colaboradores em 2009, um resíduo do N-terminal (Lys20) e outros dois resíduos básicos do C-terminal (Lys115 e Arg118) são

responsáveis pela expressão da miotoxicidade, sendo recentemente este sítio chamado de sítio de ancoragem à membrana (MDoS), e também complementado por um sítio responsável pela ruptura da membrana (MDiS), composto por resíduos hidrofóbicos do C-terminal (Leu121 e Phe125 para as Lys49-PLA₂s e Leu122 e Phe126 para a MjTX-II, devido a inserção de um resíduo na sequência de aminoácidos) (Fernandes *et al.*, 2013) (Figura 12).

Além do impedimento do contato dos aminoácidos dos sítios MDoS e MDiS com a membrana (Figura 30A e B), podemos adicionar a ocorrência da oligomerização da MjTX-II/suramina induzida pela molécula de suramina como forma de inibição, pois a presença da molécula de suramina na superfície auxilia na formação de oligômeros, os quais deixam os sítios funcionais inacessíveis fisicamente para a interação com a membrana (Figura 30C).

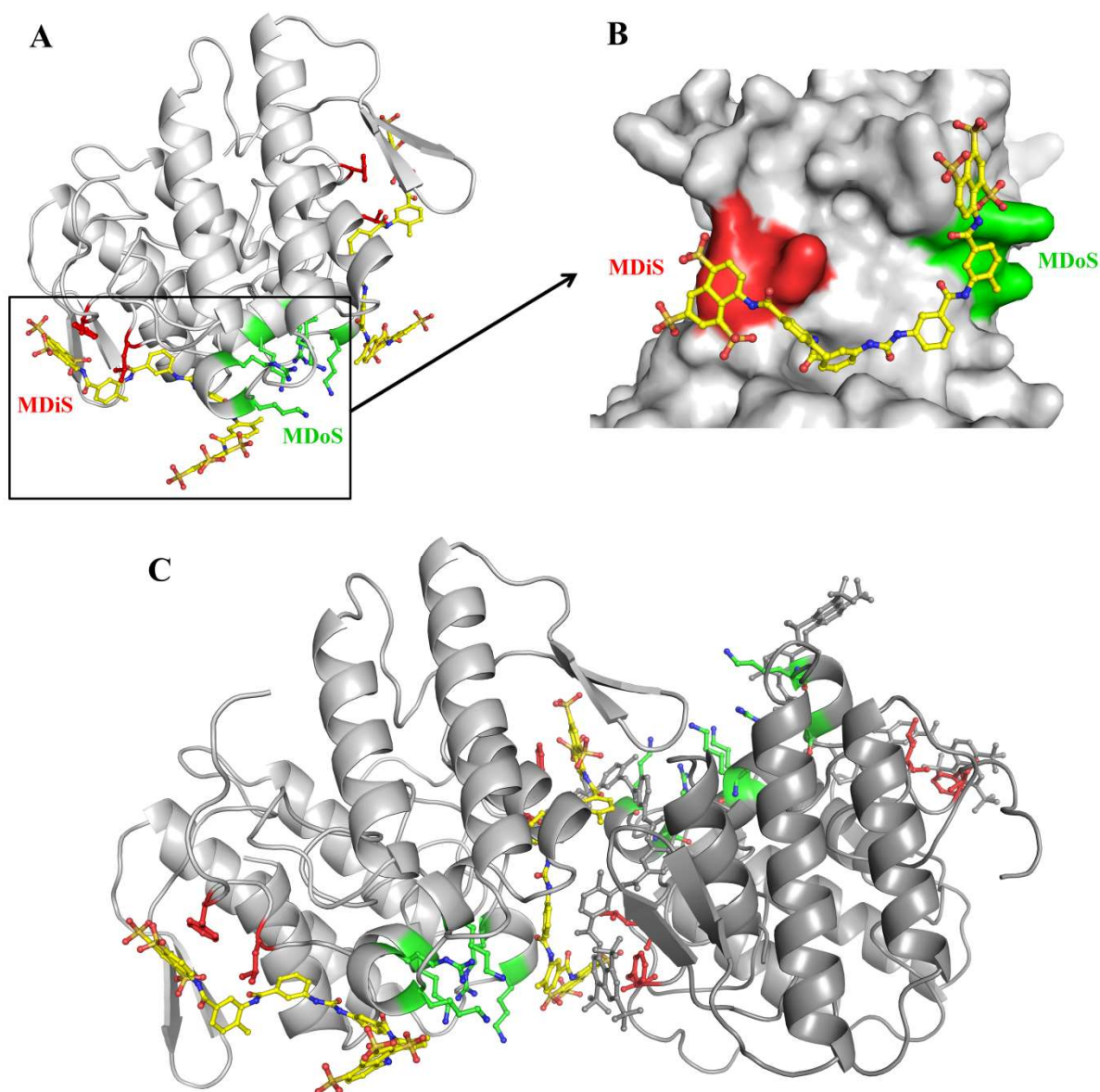


Figura 30: Sítios MDoS (sítio catiônico de docagem na membrana) e MDiS (sítio hidrofóbico para a ruptura da membrana) na estrutura da MjTX-II/suramina, onde estão destacados a molécula inibidora nestes sítios. **A.** Representação em *cartoon* da MjTX-II/suramina com os sítios e molécula desenhados em *sticks* (MDoS - resíduos em cor verde; sítio MDiS - resíduos em cor vermelha). **B.** Visão detalhada da interação entre a suramina e um monômero da MjTX-II (mostrado somente a superfície), destacados o MDoS (verde) e MDiS (vermelho). **C.** Conformação tetramérica do complexo MjTX-II/suramina com o inibidor interagindo com os sítios MDoS (verde) e MDiS (vermelho).

A formação de oligômeros induzidos por suramina também foi reportado para a Ecarpholina S (Zhou *et al.*, 2008), uma Ser49-PLA₂ isolada do veneno de *E. carinatus* (Figura 31). Neste caso, além da inibição da atividade miotóxica, a suramina também induziu a oligomerização da toxina que foi essencial para a inibição, pois a estrutura nativa monomérica tornou-se dimérica na unidade assimétrica e octamérica na cela unitária (Zhou *et al.*, 2008).

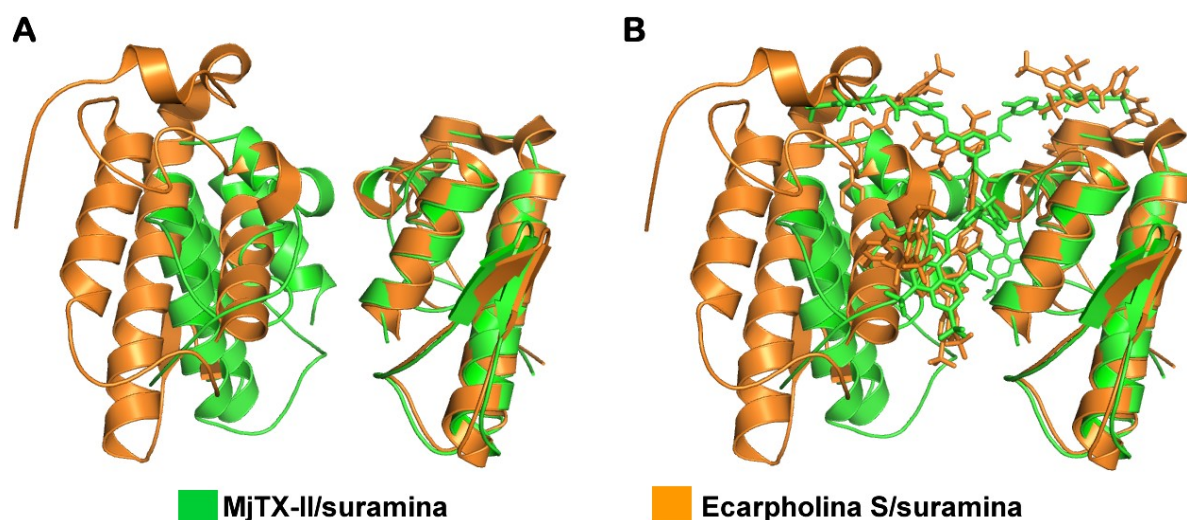


Figura 31: Sobreposição das estruturas de MjTX-II e Ecarpholina S/suramina. **A.** Sobreposição do complexo MjTX-II/suramina com o complexo Ecarpholina S/suramina, mostrando o desvio entre as estruturas cristalográficas. **B.** Moléculas de suramina mostradas em *sticks*, onde é possível observar partes expostas ao solvente, que seriam responsáveis pelo contato com suraminas e moléculas de monômeros adjacentes, auxiliando na formação de oligômeros.

Considerando os resultados obtidos por experimentos de cristalografia e outros métodos biofísicos, o processo de oligomerização que ocorreu com a MjTX-II pode ser sugerido como uma forma de inibição das PLA₂s homólogas pela suramina, onde os sítios responsáveis para a ação das toxinas ficam inacessíveis para a interação toxina-membrana.

4.5. Complexo da toxina MjTX-I com o ligante suramina

Para elucidarmos os mecanismos de interação entre a ligação da MjTX-I e a suramina, recorremos a estudos por cristalografia de raios X e diferentes estudos em solução, os quais mostraram que este ligante causa modificações importantes na estrutura, como a mudança no seu estado oligomérico.

Os cristais do complexo MjTX-I/suramina obtidos (Figura 32) foram submetidos a experimentos de difração de raios X, resultando em um conjunto de dados composto por 121 imagens.

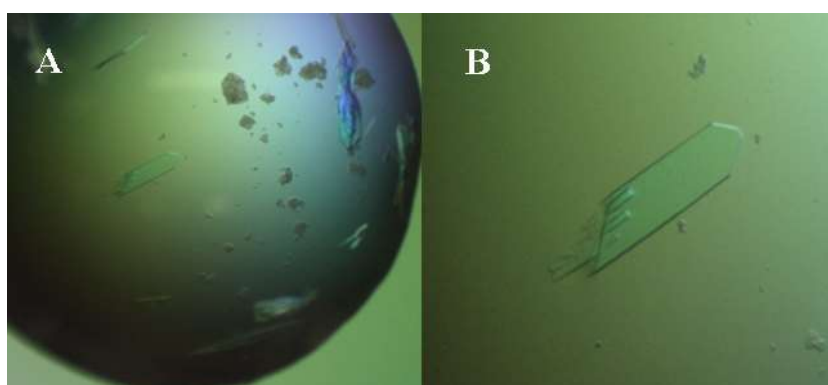


Figura 32: **A.** Monocristais de MjTX-I/suramina; **B.** Detalhe da região com o monocristal de MjTX-I/suramina que foi levado para experimentos de difração de raios X.

Os dados foram processados no grupo espacial $P2_12_12_1$ a 2,14 Å de resolução e a estrutura cristalográfica do complexo MjTX-I/suramina foi resolvida por substituição molecular, usando como modelo o monômero A da estrutura da MjTX-I nativa (PDB *id*: 3T0R), onde foram encontradas duas moléculas na unidade assimétrica na conformação alternativa.

O complexo (composto pelas moléculas de proteína, PEG4000, molécula de suramina e moléculas de solvente) foi refinado e devido à ausência de densidade eletrônica para algumas cadeias laterais, estas foram removidas e não modeladas (Glu86 e Lys69 do monômero A e Lys128 do monômero B). Os valores finais de R_{crist} e R_{free} convergiram para 19,87 % e 24,82 % respectivamente, e o modelo final apresentou 161 moléculas de água, 2 moléculas de PEG4000 (uma localizada próximo a cadeia lateral da His48 do monômero A e a outra próximo a cadeia lateral da lisina 7 do monômero B) e 1 molécula de suramina no canal hidrofóbico (Figura 33).

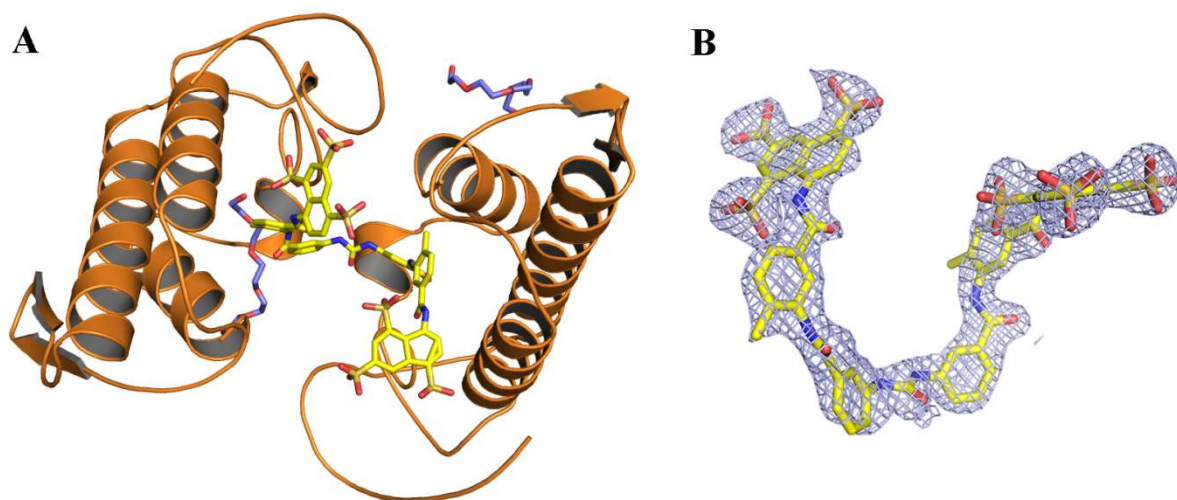


Figura 33: Estrutura cristalográfica da MjTX-I/suramina. **A.** Pode se observar a molécula de suramina (amarelo) entre os dois monômeros da proteína e as moléculas de PEG4000 (azul). **B.** Mapa de densidade eletrônica da molécula de suramina na estrutura da MjTX-I. A molécula em amarelo foi adicionada para facilitar a visualização. Os mapas foram calculados com os coeficientes $|F_{obs}| - |F_{calc}|$ e contorno de $1,0 \sigma$.

A estrutura finalizada foi submetida nos programas *online MolProbity* (Chen *et al.*, 2010) e PDBe PISA (Krissinel e Henrick, 2007), onde este último sugere que a conformação dimérica alternativa é a mais estável e mais provável de ocorrer em solução, baseados nos valores do índice de complexação ($1,0$ - *Complexation signification score* - CSS), área de interface ($637,3 \text{ \AA}^2$) e $\Delta^i G = -24.3 \text{ kcal/mol}$ (indica a energia livre de solvatação ganha na formação da interface. Valores negativos indicam interfaces hidrofóbicas). Os valores de dados de processamento e refinamento da estrutura estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6: Estatísticas de coleta de dados e refinamento estrutural do complexo MjTX-I/suramina.

Cela unitária (Å)	a=48,7; b=60,2; c=102,2
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Resolução (Å)	51,93 – 2,14 (2,21 – 2,14) ^a
Reflexões únicas	16822 (1614) ^a
Completeza (%)	98,18 (95,50) ^a
<i>I</i> / σ (<i>I</i>)	9,61 (3,84) ^a
Multiplicidade	4,6 (4,8) ^a
Moléculas na UA	2
Coeficiente de Matthews V_M (Å ³ Da ⁻¹)	2,73
R_{merge} ^b (%)	12,6 (36,4) ^a
R_{cryst}	19,87
R_{free}	24,81
Número de átomos (não hidrogênios)	
Proteína	1862
Águas	161
Moléculas de suramina	1
Moléculas de PEG	2
Fator de temperatura médio (Å ²)	28,49
Gráfico de Ramachandran (%) ^c	
Favoráveis	95,0
Não favoráveis	0,0

^a Números entre parênteses são para a camada de maior resolução.

^b $R_{merge} = \sum_{hkl} [\sum_i (I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle)] / \sum_{hkl} \langle I_{hkl} \rangle$, onde $I_{hkl,i}$ é a intensidade de uma medida individual da reflexão com os índices de Miller *h*, *k* e *l*, e $\langle I_{hkl} \rangle$ é a média das intensidades da reflexão. Calculado para $I \geq 3\sigma(I)$.

^c Calculado pelo programa *MolProbity*.

A fim de comprovar que há interação entre a suramina e a toxina, foram realizados experimentos de ITC e os dados estão apresentados na Figura 34 e Tabela 7. A titulação apresentou termograma bifásico, o que pressupõe dois eventos distintos de ligação.

A análise das constantes termodinâmicas mostrou dois eventos bastante diferentes em termos termodinâmicos e com constantes de dissociação (K_d) com uma ordem de grandeza de diferença. Estes dois eventos nos dados de calorimetria podem ser distinguidos pela ligação da molécula de suramina na proteína (maior valor da constante de dissociação e

entalpia positiva) e ligação entre as moléculas de proteína induzida pela suramina (menor valor da constante de dissociação e entalpia negativa). Interessantemente, os valores de K_d são bastante similares com a da MjTX-II/suramina (Tabela 5), porém com a ordem dos eventos invertidos (primeiro evento K_d maior e o segundo evento com K_d menor para a MjTX-I e inverso para a MjTX-II). Estes dados podem sugerir que um dos eventos pode estar associado com o processo de dissociação da proteína nativa e o segundo com a ligação do ligante e formação do dímero alternativo. Outra possibilidade seria o processo de ligação da suramina em um monômero da MjTX-I e posteriormente a ligação do outro monômero, causando a oligomerização da toxina.

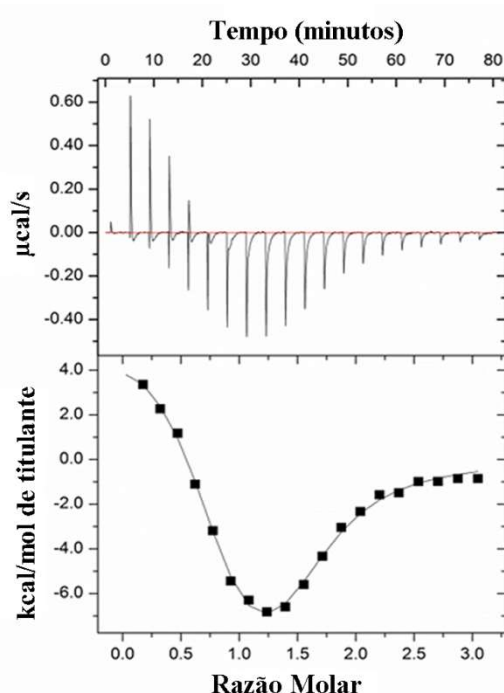


Figura 34: Titulação calorimétrica de suramina em MjTX-I. Painel superior mostra os dados brutos (potência térmica em função do tempo) da titulação de 200 μL de suramina à 750 μM em MjTX-I à 50 μM . Painel inferior mostra a isoterma de ligação (calor integrado normalizado pelo ligante em função da razão molar) e o ajuste dos dados, baseado em um modelo de ajuste não linear (linha contínua).

Tabela 7: Dados termodinâmicos intrínsecos da interação entre suramina e MjTX-I.

	1º Evento	2º Evento
k_d (μM)	$5,95 \pm 0,99$	$0,56 \pm 0,23$
ΔH (kcal/mol)	$-14,80 \pm 2,96$	$5,97 \pm 0,85$
ΔS (cal/mol/deg)	-25,7	48,6

k_d , constante intrínseca de dissociação para a ligação do inibidor (1º evento) e para a formação do complexo (2º evento). ΔH , entalpias de ligação intrínsecas para o primeiro e segundo evento de ligação. ΔS entropia de ligação. n estequiometria.

O estudo de DLS mostrou que ocorre o aumento do raio hidrodinâmico das moléculas de proteína em solução, pois a amostra nativa possui um raio hidrodinâmico de 2,0 nm (amostra com polidispersidade de 13.1 %) e após a incubação da MjTX-I com o ligante suramina na proporção de 1:10 (proteína:ligante), o raio hidrodinâmico passa a ser de 3,4 nm

(polidispersidade de 11,3 %), sugerindo a formação de um oligômero, fato já observado para nos estudos apresentados anteriormente com o complexo MjTX-II/suramina e Ecapholina S/suramina.

Podemos observar na estrutura cristalográfica que a interação entre a molécula de suramina e os monômeros da toxina é estabilizada por 7 ligações de hidrogênio (4 no monômero A e 3 no monômero B - Figura 35).

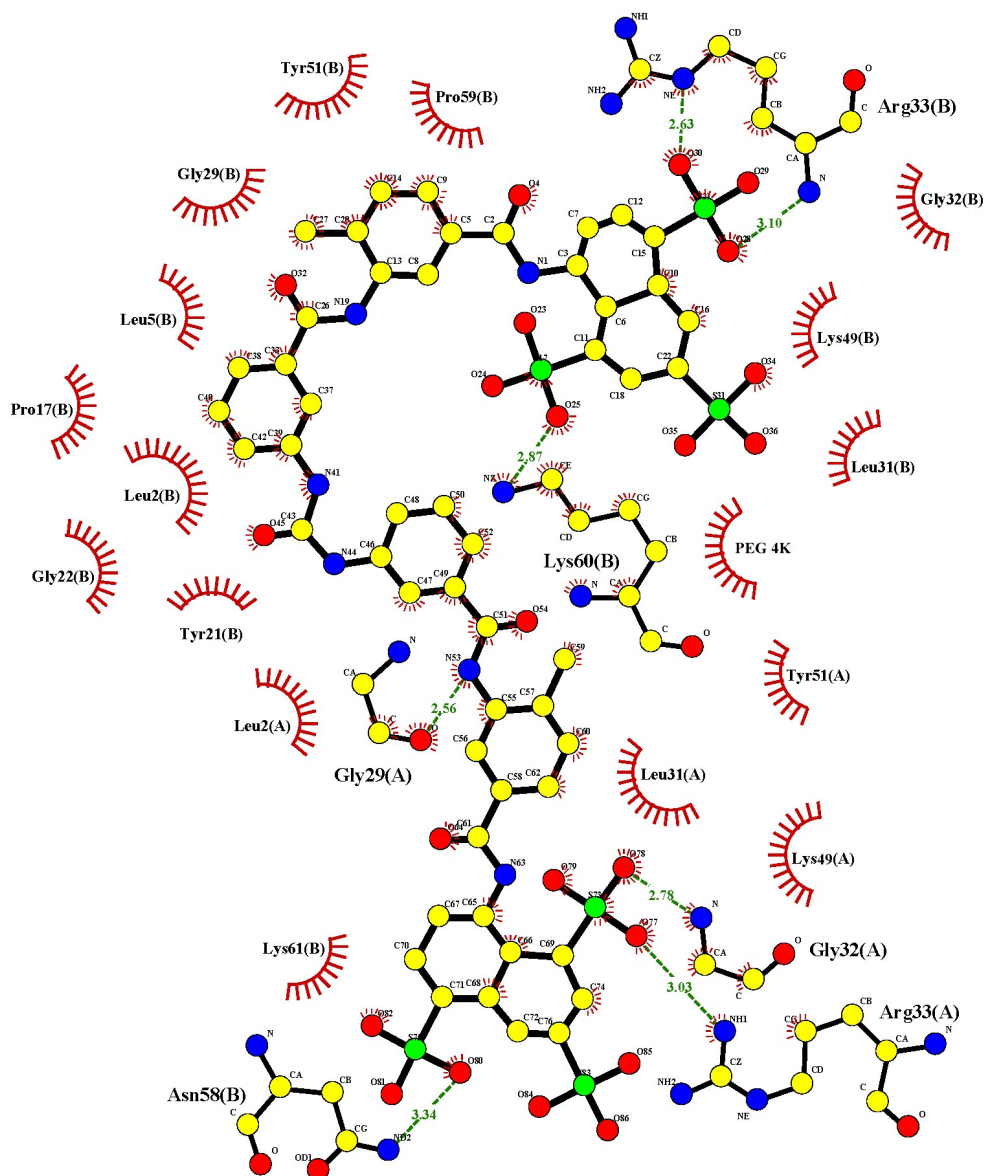


Figura 35: Interação da molécula de suramina na estrutura da MjTX-I. As 4 ligações polares entre os resíduos do monômero A e as 2 do monômero B são mostrados pelas linhas pontilhadas e os contatos hidrofóbicos são mostrados pelo pelos arcos. Figura feita pelo programa *Ligplot* (Wallace *et al.*, 1995).

A menor quantidade de interações entre a suramina e o monômero A pode estar associada a presença de uma molécula de PEG4000 em interação com a His48, que altera as ligações da molécula de suramina. A MjTX-I também apresenta a mutação Tyr119Val (Figura

36), onde a presença da molécula de suramina entre os monômeros auxilia na formação do dímero alternativo e sua estabilização na estrutura da MjTX-I.

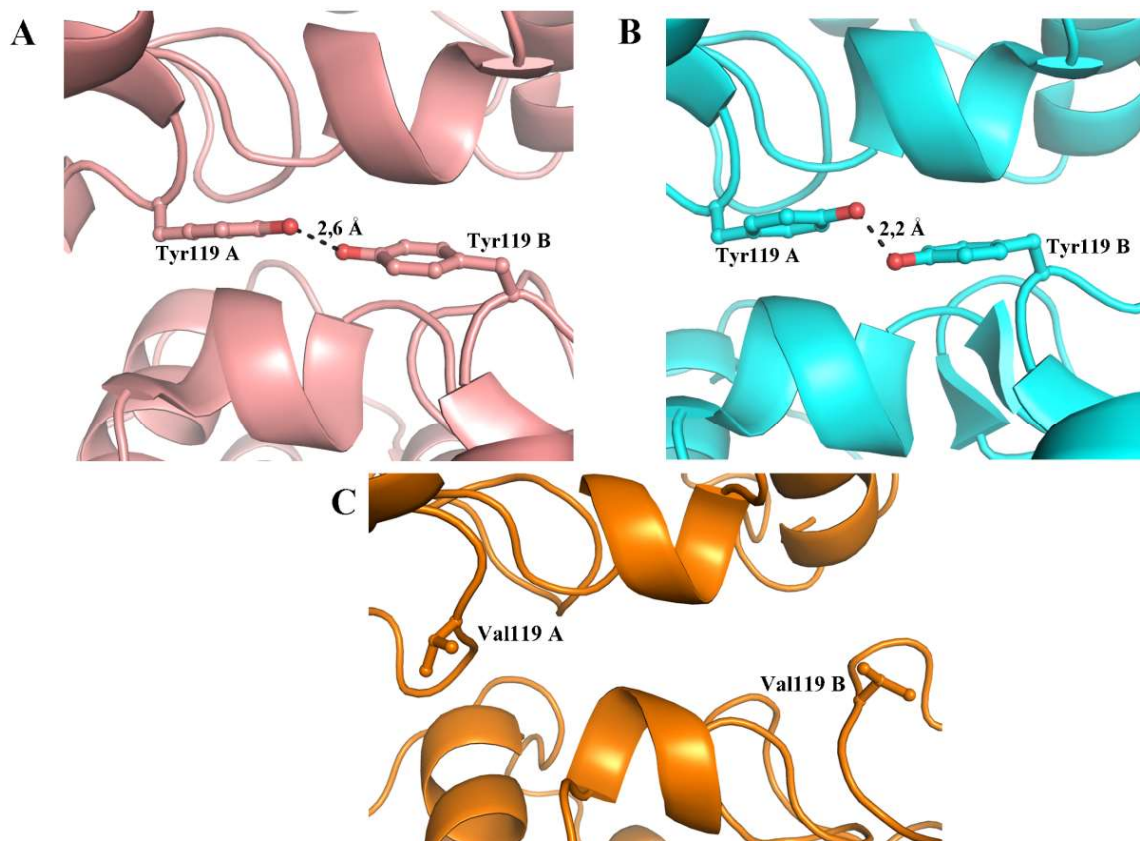


Figura 36: Região destacada da interação entre os resíduos de número 119. **A.** Estrutura cristalográfica da BthTX-I nativa (PDB id: 3IQ3); **B.** Estrutura do complexo PrTX-I/AR (PDB id 3QNL); **C.** Estrutura do complexo MjTX-I/suramina. É possível observar que a mutação Tyr119Val na sequência de aminoácidos da MjTX-I causa modificações estruturais fazendo a toxina perder a ligação Tyr119-Tyr119 que é essencial para a estabilização do dímero alternativo.

A presença deste resíduo na posição 119 é essencial na estabilização do dímero alternativo nas Lys49-PLA₂s presentes em venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, devido a ligação de hidrogênio feita pelas Tyr119 presentes em ambos os monômeros, e assim, auxiliar na expressão da atividade miotóxica (Dos Santos *et al.*, 2009; Marchi-Salvador *et al.*, 2009; Salvador, Cavalcante, *et al.*, 2013). A atividade miotóxica é uma característica das Lys49-PLA₂s descrita por vários autores na literatura (Heluany *et al.*, 1992; Soares *et al.*, 2001; De Oliveira *et al.*, 2003; Oshima-Franco *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2004; Cavalcante *et al.*, 2005; Gallacci *et al.*, 2006; Stabeli *et al.*, 2006; Cavalcante *et al.*, 2007; Randazzo-Moura *et al.*, 2008; Ponce-Soto *et al.*, 2009; Dos Santos, Cardoso, *et al.*, 2011; Salvador, Cavalcante, *et al.*, 2013).

A MjTX-I também apresenta atividade miotóxica, porém há a necessária da amostra estar cinco vezes mais concentrada para se obter o mesmo efeito das outras Lys49-PLA₂s (Salvador, Fernandes, *et al.*, 2013). Este fato se deve provavelmente a mutações em resíduos essenciais para a formação do dímero alternativo (como a Tyr 119) e também de um dos resíduos conservados nos sítios MDoS (Arg118Asp). Porém, a atividade miotóxica não é totalmente perdida devido a alguns resíduos básicos encontrados na porção C-terminal, além da conservação dos resíduos do MDiS (Leu121 e Phe 125) (Figura 37).

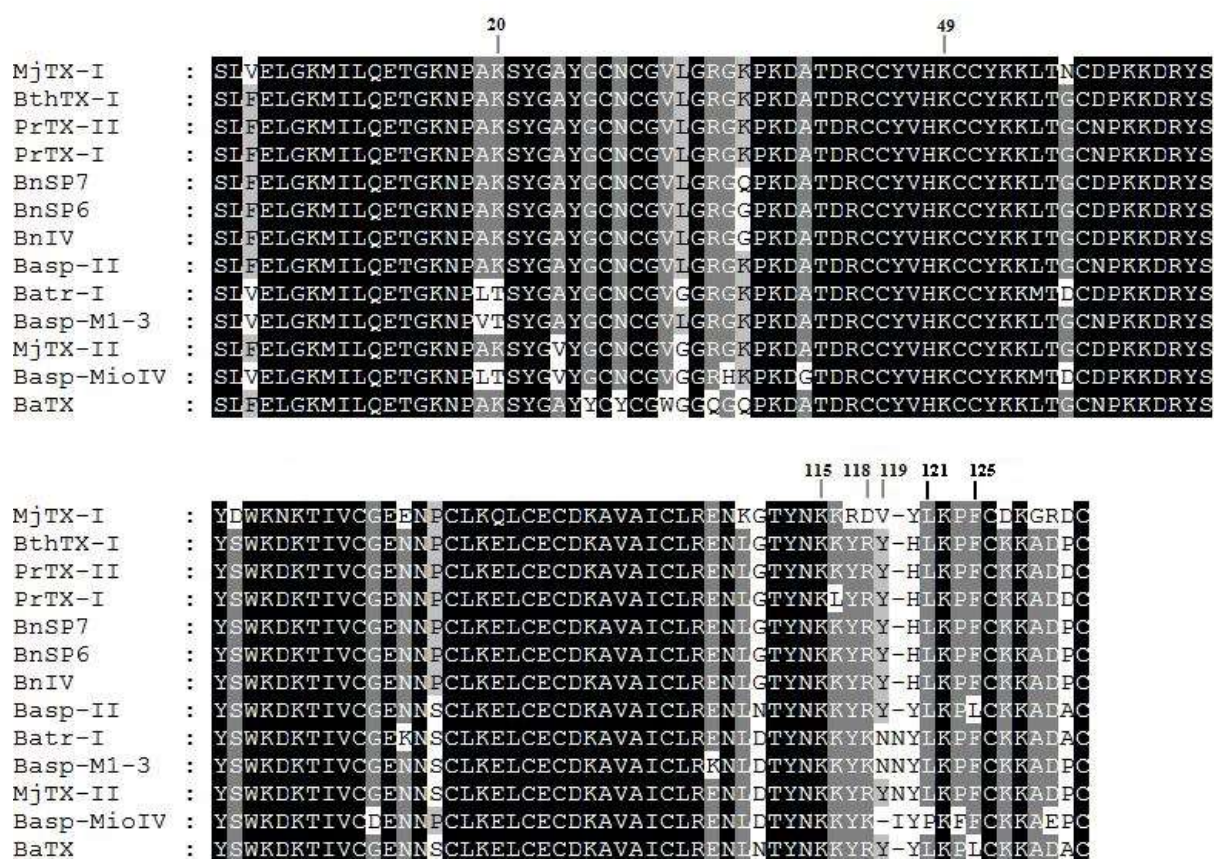


Figura 37: Alinhamento das sequências de aminoácidos das Lys49-PLA₂s isoladas do veneno de serpentes do gênero *Bothrops*. **BaTX:** Lys49-PLA₂ do veneno de *Bothrops alternatus* (NCBI GI: 292630846); **BnIV:** Lys49-PLA₂ isolada do veneno de *Bothrops pauloensis* (NCBI GI: 333361256); **BnSP-6:** Lys49-PLA₂ do veneno de *Bothrops pauloensis* (NCBI GI: 49258448); **BnSP-7:** Lys49-PLA₂ do veneno de *Bothrops pauloensis* (NCBI GI: 239938675); **BthTX-I:** Bothropstoxina-I isolada do veneno de *Bothrops jararacussu* (NCBI GI: 51890398); **MjTX-I:** Miotoxina-I do veneno de *Bothrops moojeni* (NCBI GI: 17368325); **MjTX-II:** Miotoxina-II do veneno de *Bothrops moojeni* (NCBI GI: 62738542); **Myo-II:** Miotoxina-II do veneno de *Bothrops asper* (BaspTX-II) (NCBI GI: 166215047); **PrTX-I:** Piratoxina-I isolada do veneno de *Bothrops pirajai* (NCBI GI: 17433154); **PrTX-II:** Piratoxina-II isolada do veneno de *Bothrops pirajai* (NCBI GI: 17368328).

Como já demonstrado anteriormente, a região C-terminal possui resíduos carregados positivamente e com isso, pode ter ação miotóxica (Lomonte *et al.*, 1994; Kini, 2003). Já que a estrutura nativa da MjTX-I apresenta uma conformação oligomérica distinta quando comparado com outras Lys49-PLA₂s, é sugerido a presença de resíduos básicos na

porção C-terminal da toxina e o sítio MDiS (Figura 38A), que ficariam expostos independentemente da conformação oligomérica ser monomérica, dimérica ou tetramérica (Figura 38B), seriam os responsáveis pela expressão da miotoxicidade desta toxina.

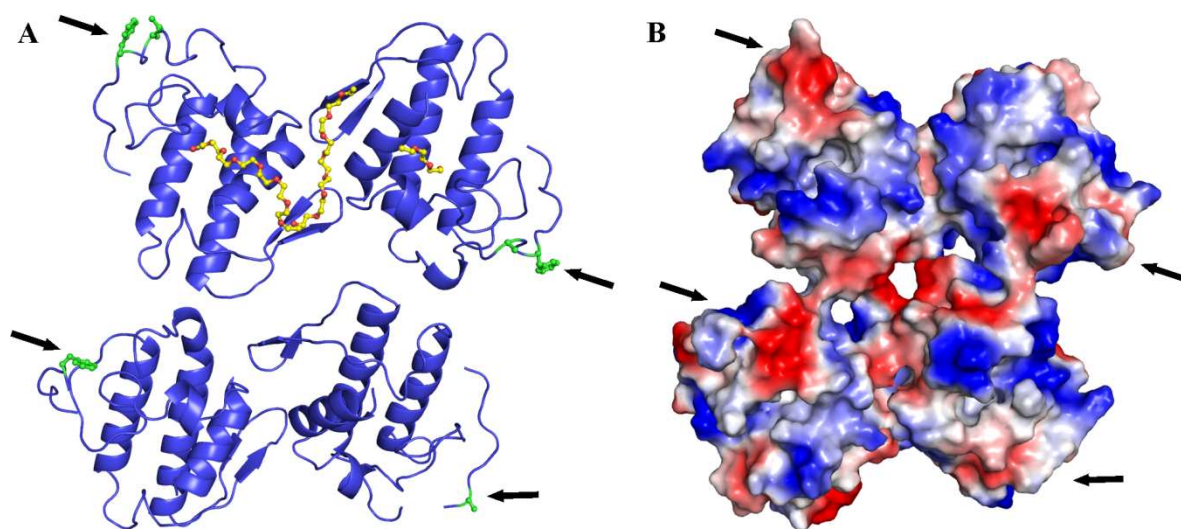


Figura 38: Estrutura cristalográfica da MjTX-I e a superfície de cargas. **A.** Resíduos apontados que compõem o sítio MDiS (coloridos em verde) pelas setas (Leu121 e Phe125). **B.** Superfície de cargas da estrutura da MjTX-I, destacando-se com as setas o local onde se localizam os sítios MDiS da toxina. Também é possível notar a alta quantidade de porções carregadas positivamente na molécula que são mostrados na cor azul (também é possível observar as regiões neutras na cor branca e regiões carregadas negativamente na cor vermelha).

4.5.1. Bases estruturais para a inibição da MjTX-I pela suramina

Estudos mostrados anteriormente e nesta tese mostram que a suramina pode inibir a ação miotóxica de PLA₂s homólogas como a Ecarpholina S, BaspTX-II e MjTX-II. Porém, atualmente, não há dados funcionais que comprovam a eficiência da suramina contra a ação miotóxica da MjTX-I.

Esta proteína pode assumir diferentes estados oligoméricos em solução (monomérica em água ultra pura ou em tampão com baixa força iônica e outros estados oligoméricos em solução tampão) (Salvador, Fernandes, *et al.*, 2013). A estrutura cristalográfica da MjTX-I nativa apresenta quatros moléculas na unidade assimétrica, composta por dois dímeros convencionais, diferentemente do complexo observado na estrutura cristalográfica da MjTX-I/suramina, onde a unidade assimétrica é composta por duas moléculas de toxina na conformação alternativa conectadas por uma molécula de suramina, semelhante ao complexo BaspTX-II/suramina (Figura 39).

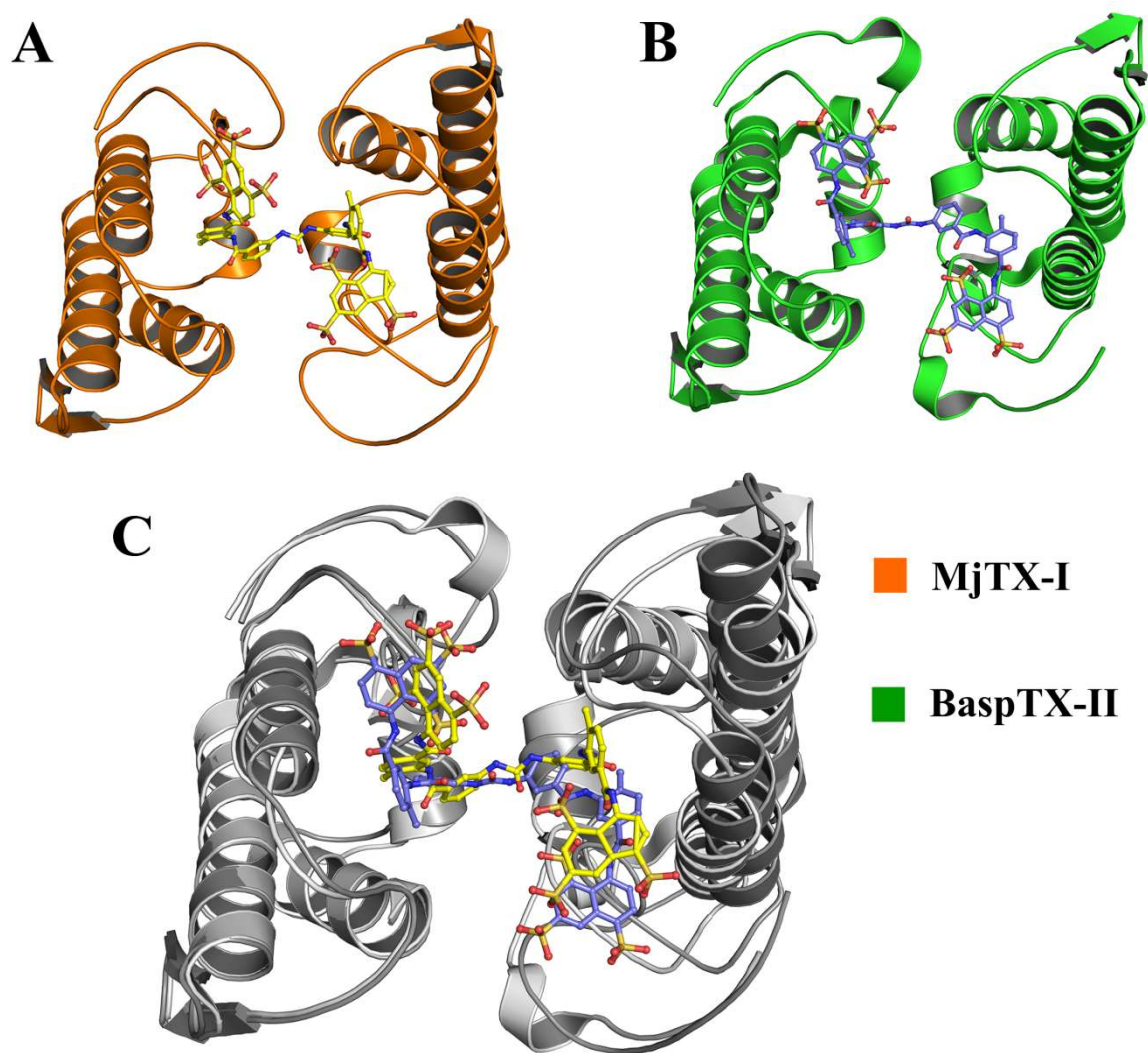


Figura 39: Sobreposição dos complexos MjTX-I/suramina e BaspTX-II/suramina. A. Estrutura cristalográfica do complexo MjTX-I/suramina com a molécula de suramina em amarelo. B. Estrutura cristalográfica do complexo BaspTX-II/suramina com a molécula de suramina em azul. C. Sobreposição das estruturas mostrando que as moléculas de suramina estão em regiões semelhantes..

A ligação da molécula de suramina entre os monômeros nas estruturas da BaspTX-II/suramina e MjTX-I/suramina sugere que a molécula de suramina pode inibir de modo semelhante estas duas toxinas, onde ocorre na alteração da carga positiva para negativa na área de reconhecimento da membrana pela toxina (Murakami *et al.*, 2005).

4.6. Inibição de PLA₂s homólogas por diferentes moléculas

Devido a molécula de suramina ser carregada negativamente, ela se liga nas porções positivas das toxinas, como observado nas estruturas da BaspTX-II/suramina e MjTX-I/suramina, onde o inibidor se liga ao N-terminal e ao sítio putativo de ligação de cálcio da proteína, diferentemente da estrutura do complexo MjTX-II/suramina, que o inibidor se encontra na superfície do dímero, em contato com as porções N e C-terminal, contribuindo para ligação de outras moléculas de suramina e proteína e da Ecarpholina S/suramina, onde inibidor se liga as porções N e C-terminal da toxina para formar um complexo oligomérico (Figura 40).

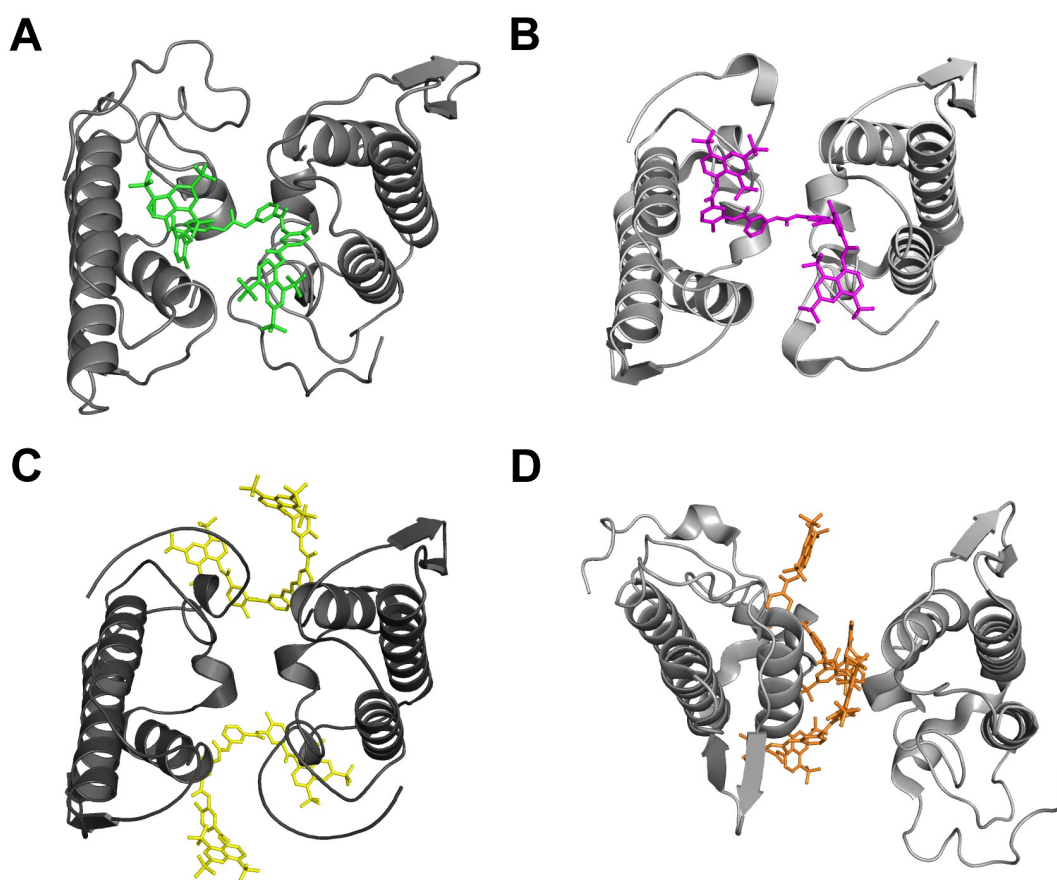


Figura 40: Estruturas de PLA₂s complexadas com suramina e os locais de interação com estas proteínas. **A.** MjTX-I/suramina e **B.** BaspTX-II, ambas com a molécula interagindo no C-terminal e sítio putativo de ligação do íon cálcio. **C.** MjTX-II/suramina com as moléculas inibidoras na superfície da toxina. **D.** Ecarpholina S/suramina com duas moléculas de suramina entre os monômeros com uma porção da molécula exposta para o solvente, contribuindo para a ligação de outras moléculas inibidoras e outras moléculas de proteína.

Na estrutura da MjTX-II/suramina, pode-se observar diferentes tipos de contatos entre o inibidor e a superfície da toxina em ambos monômeros, que ocasiona a formação do complexo tetramérico, principalmente pela interação entre as suraminas.

Tendo como evidência estes dados estruturais e funcionais e dados anteriormente publicados, podemos propor diferentes classes de inibidores para as PLA₂s homólogas: *i*) ligação de inibidores no canal hidrofóbico (como o brometo de *p*-bromofenacil), e restringem o acesso de moléculas no canal hidrofóbico e *ii*) inibidores que se ligam à porção C-terminal MDoS ou MDiS (baseados nos novos mecanismos miotóxicos propostos).

As estruturas cristalográficas dos complexos apresentados neste trabalho possuem dois tipos de inibidores, de classe *i* e *ii*. Para o complexo MjTX-II/AR, temos que a molécula promove o bloqueio da região do MDiS e além de consequentemente pode impossibilitar a ligação de substratos no canal hidrofóbico por meio da alteração na estrutura quaternária da toxina (inibidor de classe *i*); O complexo MjTX-II/suramina apresenta a ligação da molécula inibidora simultaneamente nos sítios MDoS e MDiS da proteína, podendo classificar este inibidor como sendo de classe *ii*; Para o complexo da MjTX-I/suramina, vimos que a molécula de suramina se liga no canal hidrofóbico da toxina, onde podemos supor e propor que o modo de inibição para esta toxina, seria a partir da alteração da interface de interação entre a toxina e a membrana (inibidor de classe *ii*).

Foram caracterizados por meio de estudos funcionais e estruturais as toxinas MjTX-I e MjTX-II com diferentes ligantes/inibidores, isoladas do veneno de *Bothrops moojeni*. Estas toxinas apresentam várias particularidades como mutações, diferenças na estrutura oligomérica e na potência da atividade miotóxica, que podem ser provenientes do processo de evolução sofrido pela serpente (Kini, 1997; 2003; Doley e Kini, 2009; Dos Santos, Cintra-Francischinelli, *et al.*, 2011). A MjTX-I, por exemplo, apresenta a estrutura nativa com diferente conformação oligomérica comparada com outras Lys49-PLA₂s (Marchi-Salvador *et al.*, 2005; Salvador, Fernandes, *et al.*, 2013) e atividade miotóxica significativamente baixa quando comparada com outras Lys49-PLA₂s (Andriao-Escarso *et al.*, 2000; Salvador, Fernandes, *et al.*, 2013). Já a MjTX-II apresenta uma inserção e algumas mutações na região do C-terminal, que alteram parcialmente o modo de interação dos ligantes nesta molécula (Salvador, Cavalcante, *et al.*, 2013).

Temos também que o modo de ativação e inibição da MjTX-II é diferenciado das outras Lys49-PLA₂s, pois a estrutura cristalográfica da toxina na forma nativa dispensa a presença de uma molécula de ácido graxo em seu canal hidrofóbico para a estabilização do dímero e para a ativação alostérica na toxina.

As moléculas de suramina e AR são potenciais inibidores para a atividade miotóxica causada pelas Lys49-PLA₂s de serpentes do gênero *Bothrops*. Primeiramente, as estruturas obtidas a alta resolução deram evidências do modo de inibição da atividade da toxina pelas moléculas de suramina e AR, pois se posicionaram nos sítios funcionais descritos anteriormente para estas toxinas: MDoS (suramina) e MDiS (suramina e AR). Além disso, foi possível observar por estudos de DLS que a molécula de suramina pode induzir a formação de complexos oligoméricos, ocasionando ocultação dos sítios funcionais em ambas toxinas (MjTX-I e MjTX-II).

Baseado nestas evidências, também pode ser proposto o uso das moléculas inibidoras estudadas aqui (suramina e AR) na forma clínica, a fim de se combater os efeitos de mionecrose local induzidos por Lys49-PLA₂s, os quais são possíveis complementos para o tratamento de soroterapia aplicado na ocorrência de acidentes ofídicos causados por serpentes do gênero *Bothrops*.

5.1. Perspectivas futuras

Ainda é necessária melhor análise da conformação oligomérica para os dados do complexo MjTX-I/suramina, onde que para o esclarecimento dos dados de ITC, DLS e estruturais seria interessante realizar experimentos de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS), que irá fornecer evidências sobre a conformação oligomérica da toxina em solução. Para os estudos dos complexos MjTX-II/AR e MjTX-II/ácidos graxos ainda é necessária uma análise mais aprofundada dos dados estruturais, pois ainda há dúvidas em relação ao mecanismo de ação da MjTX-II, já que as alterações estruturais observadas aqui são exclusivas para esta toxina até o momento. O processo de obtenção da PrTX-I de forma recombinante se encontra em fase avançada, bastando apenas aumentar a eficiência do processo de purificação e caracterizar a sequência, estruturalmente e funcionalmente a toxina.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, P. D. et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 66, n. Pt 2, p. 213-21, Feb 2010.
- ANDRILAO-ESCARSO, S. H. et al. Myotoxic phospholipases A₂ in *bothrops* snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**, v. 82, n. 8, p. 755-63, Aug 2000.
- ARNI, R. K. et al. Crystal structure of myotoxin II, a monomeric Lys49-phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of *Cerrophidion (Bothrops) godmani*. **Arch Biochem Biophys**, v. 366, n. 2, p. 177-82, Jun 15 1999.
- ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A₂-a structural review. **Toxicon**, v. 34, n. 8, p. 827-41, Aug 1996.
- ARRUDA, E. Z. et al. Effect of suramin on myotoxicity of some crotalid snake venoms. **Braz J Med Biol Res**, v. 35, n. 6, p. 723-6, Jun 2002.
- BAHNSON, B. J. Structure, function and interfacial allostereism in phospholipase A₂: insight from the anion-assisted dimer. **Arch Biochem Biophys**, v. 433, n. 1, p. 96-106, Jan 1 2005.
- BATTYE, T. G. et al. iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 67, n. Pt 4, p. 271-81, Apr 2011.
- BERENDSEN, H. J. C. et al. Molecular-Dynamics with Coupling to an External Bath. **Journal of Chemical Physics**, v. 81, n. 8, p. 3684-3690, 1984.
- BERENDSEN, H. J. C. P., J. P. M.; VAN GUNSTEREN, W. F.; HERMANS, J. Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration. In: PULLMAN, B. (Ed.). **Intermolecular Forces**. Dordrecht: D. Reidel Publishing Co., 1981. p.331-342.
- BORGSTAHL, G. E. O. How to Use Dynamic Light Scattering to Improve the Likelihood of Growing Macromolecular Crystals. In: DOUBLIÉ, S. (Ed.). **Macromolecular Crystallography Protocols**. Totowa: Humana Press Inc, v.1, 2007. p.109-129.
- BROWN, A. Analysis of cooperativity by isothermal titration calorimetry. **Int J Mol Sci**, v. 10, n. 8, p. 3457-77, Oct 2009.
- BRUNGER, A. T. Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. **Nature**, v. 355, n. 6359, p. 472-5, Jan 30 1992.
- BURCH, T. A.; ASHBURN, L. L. Experimental therapy of onchocerciasis with suramin and hetrazan; results of a three-year study. **Am J Trop Med Hyg**, v. 31, n. 5, p. 617-23, Sep 1951.
- CALIXTO, J. B. et al. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytother Res**, v. 14, n. 6, p. 401-18, Sep 2000.
- CARDOSO, J. L. C. F., F. O. S.; WEN, F. H.; MALAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. **Epidemiologia dos Acidentes por Animais Peçonhentos, Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003.
- CAVALCANTE, W. L. et al. Neutralization of snake venom phospholipase A₂ toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **J Ethnopharmacol**, v. 112, n. 3, p. 490-7, Jul 25 2007.
- CAVALCANTE, W. L.; SILVA, M. D.; GALLACCI, M. Influence of temperature upon paralyzing and myotoxic effects of bothropstoxin-I on mouse neuromuscular preparations. **Chem Biol Interact**, v. 151, n. 2, p. 95-100, Jan 15 2005.
- CHEN, V. B. et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 66, n. Pt 1, p. 12-21, Jan 2010.
- CHERRY, J. K. The treatment of onchocerciasis. **East Afr Med J**, v. 37, p. 550-8, Aug 1960.
- CREGG, J. M. **Methods in Molecular Biology 2nd ed**. New Jersey: Totowa. Humana Press. Pichia Protocols, 2007.
- DA SILVA GIOTTO, M. T. et al. Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: conformational changes in bothropstoxin I, a dimeric Lys49-phospholipase A₂ homologue. **Proteins**, v. 30, n. 4, p. 442-54, Mar 1 1998.

- DE OLIVEIRA, M. et al. Antagonism of myotoxic and paralyzing activities of bothropstoxin-I by suramin. **Toxicon**, v. 42, n. 4, p. 373-9, Sep 15 2003.
- DE OLIVEIRA, R. C. W. Epidemiologia dos Acidentes por Animais Peçonhentos. Animais Peçonhentos do Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos envenenamentos. In: (Ed.). São Paulo: Sarvier, 2009. p.550.
- DEAZEVEDO, W. F. et al. Crystal structure of myotoxin-II: A myotoxic phospholipase A₂ - Homologue from *Bothrops moojeni* venom. **Protein and Peptide Letters**, v. 4, n. 5, p. 329-334, Oct 1997. ISSN 0929-8665.
- DENNIS, E. A. et al. Phospholipase A₂ enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. **Chem Rev**, v. 111, n. 10, p. 6130-85, Oct 12 2011.
- DOLEY, R.; KINI, R. M. Protein complexes in snake venom. **Cell Mol Life Sci**, v. 66, n. 17, p. 2851-71, Sep 2009.
- DOS SANTOS, J. I. et al. Structural and functional studies of a bothropic myotoxin complexed to rosmarinic acid: new insights into Lys49-PLA₂ inhibition. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e28521, 2011.
- DOS SANTOS, J. I. et al. Structural, functional, and bioinformatics studies reveal a new snake venom homologue phospholipase A₂ class. **Proteins**, v. 79, n. 1, p. 61-78, Jan 2011.
- DOS SANTOS, J. I.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. Comparative structural studies on Lys49-phospholipases A₂ from *Bothrops* genus reveal their myotoxic site. **J Struct Biol**, v. 167, n. 2, p. 106-16, Aug 2009.
- DRENTH, J. **Principles of Protein X-ray Crystallography**. New York: Springer-Verlag, 1994. 311.
- DUCRUIX, A. G., R. **Crystallization of Nucleic Acids and Proteins: A practical approach**. New York: Oxford University Press., 1992.
- EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 60, n. Pt 12 Pt 1, p. 2126-32, Dec 2004.
- FERNANDES, C. A. et al. A structure-based proposal for a comprehensive myotoxic mechanism of phospholipase A₂-like proteins from viperid snake venoms. **Biochim Biophys Acta**, v. 1844, n. 12, p. 2265-2276, Sep 30 2014.
- FERNANDES, C. A. et al. Structural bases for a complete myotoxic mechanism: crystal structures of two non-catalytic phospholipases A₂-like from *Bothrops brazili* venom. **Biochim Biophys Acta**, v. 1834, n. 12, p. 2772-81, Dec 2013.
- FERNANDES, C. A. et al. Comparison between apo and complexed structures of bothropstoxin-I reveals the role of Lys122 and Ca²⁺-binding loop region for the catalytically inactive Lys49-PLA₂s. **J Struct Biol**, v. 171, n. 1, p. 31-43, Jul 2010.
- GALLACCI, M. et al. Paralyzing and myotoxic effects of a recombinant bothropstoxin-I (BthTX-I) on mouse neuromuscular preparations. **Exp Toxicol Pathol**, v. 57, n. 3, p. 239-45, Jan 2006.
- GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, n. 11, p. 1405-24, Nov 1995.
- GUTIERREZ, J. M. et al. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 54, n. 7, p. 958-75, Dec 1 2009.
- GUTIERREZ, J. M. et al. Assessing the preclinical efficacy of antivenoms: from the lethality neutralization assay to antivenomics. **Toxicon**, v. 69, p. 168-79, Jul 2013.
- HELUANY, N. F. et al. Effects induced by bothropstoxin, a component from *Bothrops jararacussu* snake venom, on mouse and chick muscle preparations. **Toxicon**, v. 30, n. 10, p. 1203-10, Oct 1992.
- HESS, B. et al. GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4, n. 3, p. 435-447, Mar 2008.
- HOFMANN, A. Spectroscopic techniques: I Spectrophotometric techniques. In: WILSON, K. & WALKER J. (Ed.), **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**, Cambridge University Press, Cambridge, 2010.
- HOGUE, A. R. Preliminary account on neotropical Crotalinae (serpentes - Viperidae). **Mem. Inst. Butantan**, v. 32, p. 109-184, 1965.

- HOLLAND, D. R. et al. The crystal structure of a lysine 49 phospholipase A₂ from the venom of the cottonmouth snake at 2.0-Å resolution. **J Biol Chem**, v. 265, n. 29, p. 17649-56, Oct 15 1990.
- HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. et al. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, v. 26, n. 7, p. 615-27, 1988.
- JANCARIK, J. et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction study of the ligand-binding domain of the bacterial chemotaxis-mediating aspartate receptor of *Salmonella typhimurium*. **J Mol Biol**, v. 221, n. 1, p. 31-4, Sep 5 1991.
- KASTURIRATNE, A. et al. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLoS Med**, v. 5, n. 11, p. e218, Nov 4 2008.
- KELLY, S. M.; JESS, T.J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochim Biophys Acta**, 1751, p. 119-139, 2005.
- KINI, R. M. **Phospholipase A₂ enzyme: structure, function and mechanism**. Chichester: Wiley, 1997.
- KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 827-40, Dec 15 2003.
- KOBE, B. G., T. TEH, T. HEIERHORST, J. K. Crystallization of protein kinases and phosphatases. In: HARDIE, D. G. (Ed.). **Protein phosphorylation: a practical approach**. Oxford: Oxford University Press, 1999. p.127-151.
- KRISSINEL, E.; HENRICK, K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. **J Mol Biol**, v. 372, n. 3, p. 774-97, Sep 21 2007.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 15 1970.
- LIN-SHIAU, S. Y.; LIN, M. J. Suramin inhibits the toxic effects of presynaptic neurotoxins at the mouse motor nerve terminals. **Eur J Pharmacol**, v. 382, n. 2, p. 75-80, Oct 8 1999.
- LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERON, L. An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 885-901, Dec 15 2003.
- LOMONTE, B. et al. Neutralization of *Bothrops asper* venom by antibodies, natural products and synthetic drugs: contributions to understanding snakebite envenomings and their treatment. **Toxicon**, v. 54, n. 7, p. 1012-28, Dec 1 2009.
- LOMONTE, B. et al. Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a lysine 49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. **J Biol Chem**, v. 269, n. 47, p. 29867-73, Nov 25 1994.
- MAGRO, A. J. et al. Influence of quaternary conformation on the biological activities of the Asp49-phospholipases A₂s from snake venoms. **Protein Pept Lett**, v. 16, n. 8, p. 852-9, 2009. ISSN 1875-5305.
- MANCUSO, L. C. et al. Fractionation of *Bothrops pirajai* snake venom: isolation and characterization of piratoxin-I, a new myotoxic protein. **Toxicon**, v. 33, n. 5, p. 615-26, May 1995.
- MARCHI-SALVADOR, D. P. et al. Crystal structure of a phospholipase A₂ homolog complexed with p-bromophenacyl bromide reveals important structural changes associated with the inhibition of myotoxic activity. **Biochim Biophys Acta**, v. 1794, n. 11, p. 1583-90, Nov 2009.
- MARCHI-SALVADOR, D. P. et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of myotoxin I, a Lys49-phospholipase A₂ from *Bothrops moojeni*. **Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun**, v. 61, n. Pt 10, p. 882-4, Oct 1 2005.
- MARCUSSI, S. et al. Snake venom phospholipase A₂ inhibitors: medicinal chemistry and therapeutic potential. **Curr Top Med Chem**, v. 7, n. 8, p. 743-56, 2007.
- MCCOY, A. J. et al. Phaser crystallographic software. **J Appl Crystallogr**, v. 40, n. Pt 4, p. 658-674, Aug 1 2007.
- MCPHERSON, A. **Crystallization of biological macromolecules**. Malabar: Krieger Publishing Company, 1989.
- MCPHERSON, A. **Introduction to Macromolecular Crystallography**. Hoboken: Wiley-Liss, 2003.

- MCREE, D. E. **Practical Protein Crystallography**. San Diego: Academic Press, 1993.
- MOREIRA, L. A. et al. Bee venom phospholipase inhibits malaria parasite development in transgenic mosquitoes. **J Biol Chem**, v. 277, n. 43, p. 40839-43, Oct 25 2002.
- MURAKAMI, M. T. et al. Inhibition of myotoxic activity of *Bothrops asper* myotoxin II by the anti-trypansomal drug suramin. **J Mol Biol**, v. 350, n. 3, p. 416-26, Jul 15 2005.
- MURAKAMI, M. T. et al. Interfacial surface charge and free accessibility to the PLA₂-active site-like region are essential requirements for the activity of Lys49 PLA₂ homologues. **Toxicon**, v. 49, n. 3, p. 378-87, Mar 1 2007a.
- MURAKAMI, M. T. et al. Interfacial surface charge and free accessibility to the PLA₂-active site-like region are essential requirements for the activity of Lys49 PLA₂ homologues. **Toxicon**, v. 49, n. 3, p. 378-387, Mar 1 2007b.
- MURSHUDOV, G. N.; VAGIN, A. A.; DODSON, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 53, n. Pt 3, p. 240-55, May 1 1997. ISSN 0907-4449.
- NAVAZA, J. S., P. AMoRe: An Automated Molecular Replacement Program Package. In: CARTER, C. W. S., R. M. (Ed.). **Methods in Enzymology: Macromolecular Crystallography**. New York: Academic Press, v.276, 1997. p.581-593.
- OOSTENBRINK, C. et al. Validation of the 53A6 GROMOS force field. **Eur Biophys J**, v. 34, n. 4, p. 273-84, Jun 2005.
- OSHIMA-FRANCO, Y. et al. The presynaptic activity of bothropstoxin-I, a myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 95, n. 4, p. 175-82, Oct 2004.
- OTERO, R. et al. Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. **Toxicon**, v. 40, n. 8, p. 1107-114, Aug 2002.
- OTWINOWSKI, Z.; MINOR, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. **Macromolecular Crystallography, Pt A**, v. 276, p. 307-326, 1997.
- OWNBY, C. L. et al. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. **Toxicon**, v. 37, n. 3, p. 411-45, Mar 1999.
- PEROZZO, R.; FOLKERS, G.; SCAPOZZA, L. Thermodynamics of protein-ligand interactions: history, presence, and future aspects. **J Recept Signal Transduct Res**, v. 24, n. 1-2, p. 1-52, Feb 2004.
- PONCE-SOTO, L. A. et al. Neuromuscular activity of BaTX, a presynaptic basic PLA₂ isolated from *Bothrops alternatus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**, v. 150, n. 2, p. 291-297, Aug 2009.
- POTTERTON, L. et al. Developments in the CCP4 molecular-graphics project. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 60, n. Pt 12 Pt 1, p. 2288-94, Dec 2004.
- RANDAZZO-MOURA, P. et al. Structural characterization and neuromuscular activity of a new Lys49 phospholipase A₂ homologous (Bp-12) isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Protein J**, v. 27, n. 6, p. 355-62, Sep 2008.
- RODRIGUES, V. M. et al. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 44, n. 3, p. 305-14, Sep 1 2004.
- SALVADOR, G. H. et al. Structural and functional studies with myotoxin II from *Bothrops moojeni* reveal remarkable similarities and differences compared to other catalytically inactive phospholipases A₂-like. **Toxicon**, v. 72, p. 52-63, Sep 2013.
- SALVADOR, G. H. et al. Structural and phylogenetic studies with MjTX-I reveal a multi-oligomeric toxin-a novel feature in Lys49-PLA₂s protein class. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e60610, 2013.
- SAMBROOK, J.; MACCALLUM, P.; RUSSEL, D. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd ed**. New York: Cold Springs Harbour Press, 2001. 2344p.
- SAMY, R. P. et al. Ethnobotanical survey of folk plants for the treatment of snakebites in Southern part of Tamilnadu, India. **J Ethnopharmacol**, v. 115, n. 2, p. 302-12, Jan 17 2008.

- SCHEUERMANN, T. H.; BRAUTIGAM, C. A. High-precision, automated integration of multiple isothermal titration calorimetric thermograms: new features of NITPIC. **Methods**, v. 76, p. 87-98, Apr 2015.
- SCHNEIDER, J. Treatment of human African trypanosomiasis. **Bull World Health Organ**, v. 28, n. 5-6, p. 763-86, 1963.
- SOARES, A. M. et al. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops moojeni* (Caissaca) snake venom. **Arch Biochem Biophys**, v. 373, n. 1, p. 7-15, Jan 1 2000.
- SOARES, A. M. et al. Dissociation of enzymatic and pharmacological properties of piratoxins-I and -III, two myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops pirajai* snake venom. **Arch Biochem Biophys**, v. 387, n. 2, p. 188-96, Mar 15 2001.
- SOARES, A. M. et al. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Arch Biochem Biophys**, v. 378, n. 2, p. 201-9, Jun 15 2000.
- SOARES, A. M. et al. A rapid procedure for the isolation of the Lys-49 myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. **Toxicon**, v. 36, n. 3, p. 503-14, Mar 1998.
- SOARES, A. M. et al. Alkylation of myotoxic phospholipases A₂ in *Bothrops moojeni* venom: a promising approach to an enhanced antivenom production. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 36, n. 2, p. 258-70, Feb 2004.
- SOARES, A. M. et al. Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. **Curr Med Chem**, v. 12, n. 22, p. 2625-41, 2005.
- STABELI, R. G. et al. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A₂ homologue: an example of function versatility of snake venom proteins. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 142, n. 3-4, p. 371-81, Mar-Apr 2006.
- TICLI, F. K. et al. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A₂ inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. **Toxicon**, v. 46, n. 3, p. 318-27, Sep 1 2005.
- VAGIN, A.; TEPLYAKOV, A. Molecular replacement with MOLREP. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 66, n. Pt 1, p. 22-5, Jan 2010. ISSN 1399-0047
- WALLACE, A. C.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **Protein Eng**, v. 8, n. 2, p. 127-34, Feb 1995. ISSN 0269-2139
- WATANABE, L. et al. Structural insights for fatty acid binding in a Lys49-phospholipase A₂: crystal structure of myotoxin II from *Bothrops moojeni* complexed with stearic acid. **Biochimie**, v. 87, n. 2, p. 161-7, Feb 2005. ISSN 0300-9084
- WILLIAMS, D. et al. The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. **Lancet**, v. 375, n. 9708, p. 89-91, Jan 2 2010.
- WILLIAMSON, J.; DESOWITZ, R. S. Prophylactic activity of suramin complexes in animal trypanosomiasis. **Nature**, v. 177, n. 4519, p. 1074-5, Jun 9 1956.
- WISEMAN, T. et al. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. **Anal Biochem**, v. 179, n. 1, p. 131-7, May 15 1989.
- ZHOU, X. et al. Structural characterization of myotoxic ecarpholin S from *Echis carinatus* venom. **Biophys J**, v. 95, n. 7, p. 3366-80, Oct 2008.

Produção da toxina PrTX-I na forma recombinante

1. Metodologia utilizada

1.1. Inserção do vetor e expressão da proteína recombinante

O vetor pPicZ α A contendo a ORF (*open reading frame*) para a expressão da PLA₂ PrTX-I foi obtido a partir de síntese gênica pela GeneArt (Life Technologies™). A ORF referente à PrTX-I foi inserida no vetor a partir dos sítios de restrição EcoRI (3' DNA) e NotI (5' DNA) (Figura 1).

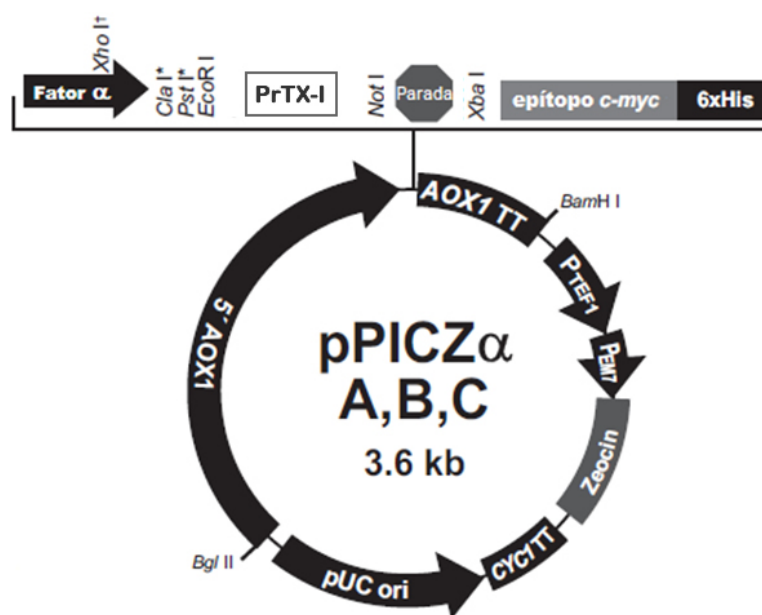


Figura 1: Vetor pPicZ α A contendo a ORF para a expressão da PrTX-I.

Para propagação do vetor pPicZ α A-PrTX-I em células de *Escherichia coli*, foi necessário tornar células da linhagem DH5 α competentes. Este processo foi realizado a partir de um pré-inóculo de bactérias originais, ou seja, que ainda não receberam o plasmídeo. Este pré-inóculo foi cultivado em meio LB, até atingir a densidade óptica (D.O._{600nm}) de aproximadamente 0,4. Em seguida, foi então centrifugado e as células foram ressuspensas em CaCl₂, e deixados em repouso no gelo. Após este procedimento, esta solução é centrifugada novamente e o sobrenadante é descartado, sobrando apenas as células, que são ressuspensas em CaCl₂ e glicerol. Este material é então separado em alíquotas e mantido em freezer com temperatura de -80 °C.

O próximo passo é a transformação das células de *E. coli* DH5 α , que recebem os plasmídios recombinantes. Para isto, a solução permanece incubada a 42 °C e passada

rapidamente para o gelo. Subsequentemente é adicionado meio LB *lowsalt* (Tryptona, extrato de levedura, NaCl e pH ajustado para 7,0 com NaOH) a esta solução, que então é plaqueada em LB *low salt* ágar (Tryptona, extrato de levedura, NaCl, pH ajustado para 7,0 com NaOH e adicionado ágar), contendo antibiótico zeocina. As placas contendo 50, 100 e 200 µL de bactérias transformadas foram preparadas e incubadas a 37 °C.

As colônias crescidas são selecionadas e submetidas à lise alcalina (*Miniprep*), onde o plasmídeo é extraído, seguindo o protocolo de Sambrook e colaboradores (Sambrook *et al.*, 2001). Após este procedimento, o material é quantificado em espectrofotômetro com o comprimento de onda a 260 nm (*NanodropND-1000 spectrophotometer*), sendo posteriormente visualizado em gel de agarose a 1 % pela presença de banda com peso em pares de base compatível com o tamanho do vetor utilizado.

O plasmídeo obtido que contém a sequência da PrTX-I (pPicZαA-PrTX-I) foi linearizado a partir do uso da enzima de restrição PmeI, onde a reação ocorre pela incubação dos plasmídeos a 37 °C seguida da inativação da enzima PmeI, sendo que a confirmação da linearização se dá pela análise em gel de agarose a 1 %. O material linearizado é precipitado e posteriormente centrifugado, onde o *pellet* é quantificado em espectrofotômetro *Nanodrop (ND-1000 spectrophotometer)*.

A inserção do plasmídeo nas células competentes da linhagem KM71H de *P. pastoris* foi realizado segundo protocolo descrito por Cregg (Cregg, 2007), onde as células originais de *P. pastoris* são colocadas em meio YPD (extrato de levedura, peptona, YNB, glicerol e metanol) e incubadas até se D.O._{600nm} de 1,2. Esta cultura é centrifugada e adicionada em meio YPD acrescido de HEPES e ditioneitol (DTT), sendo que após incubação, ocorre novamente a centrifugação e o sobrenadante é descartado, sendo o corpo de fundo ressuspensionado em sorbitol estéril e mantido a temperatura de -20 °C. Após isso, o DNA linearizado é inserido nas células competentes por meio de eletroporação e posteriormente plaqueados 50, 100 e 200 µL das células em placas de petri contendo YPDS ágar com zeocina, onde permanecem incubadas a 30 °C por 4 dias.

Foram selecionadas colônias da transformação em *P. pastoris* e individualmente são inoculadas em tubos com meio BMGY (extrato de levedura, peptona, YNB, biotina, glicerol, fosfato de potássio), que são incubados a 30 °C sob agitação constante. Após 48 h, as culturas são centrifugadas e o sobrenadante é descartado, ressuspensionando as células em meio BMMY (extrato de levedura, peptona, YNB, biotina, metanol, fosfato de potássio pH 6.0) para a indução da expressão. Em seguida, a indução foi mantida a partir a adição de metanol

100% a cada 24 h em concentração final de 0,75%. Foram coletadas alíquotas da indução nos tempos de 0h a 144 h, centrifugadas e analisadas em gel SDS-PAGE a 13%, corado com nitrato de prata para determinação dos níveis de expressão.

As colônias que apresentaram níveis de expressão satisfatórios na triagem, são selecionadas e individualmente realizado pré-inoculo à 30 °C em frascos erlenmeyer contendo meio BMGY. Ao atingir a D.O._{600nm} entre 5 e 6, a cultura é centrifugada e o *pellet* ressuspendido em meio BMMY (extrato de levedura e peptona; tampão fosfato de potássio pH 6,0; YNB; biotina e metanol). A indução foi promovida pela adição de metanol 100% a cada 24 horas para uma concentração final de 0,75%. Foram coletadas alíquotas de 1 ml a cada 24 horas durante os 7 dias de indução que foram submetidas em experimentos de eletroforese em SDS-PAGE a 13 %.

O sobrenadante obtido da indução foi filtrado em filtro Millex[®]HV PVDF, 0,45 µm de Poro (Millipore[®]), concentrado e o tampão alterado para formato de amônio 50 mM, pH 3,5 e fracionado em coluna de gel filtração HiLoad[™] 26/600 Superdex 75, previamente equilibrada com este mesmo tampão. As frações obtidas foram analisadas em SDS-PAGE a 13 %.

1.2. Espectroscopia de dicroísmo circular

A técnica de espectroscopia de dicroísmo circular (CD) se dá pela diferença de absorção de radiação polarizada à direita e à esquerda, causada por moléculas que possuem propriedade de serem opticamente ativas (como as proteínas, que possuem o carbono quiral assimétrico dos aminoácidos). Esta radiação absorvida causa uma mudança no sentido do vetor resultante, que passa a ser elipticamente polarizado (θ) (Figura 2) (Hofmann, 2010).

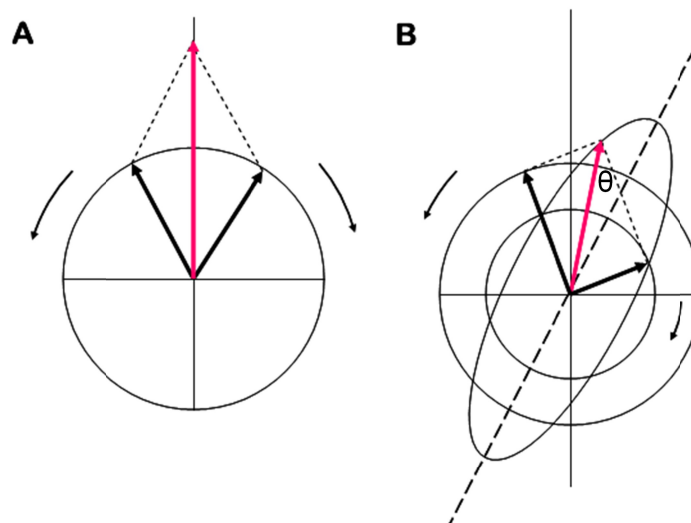


Figura 2: Absorção das radiações circularmente polarizadas em um experimento de dicroísmo circular (CD). **A.** Radiações circularmente polarizadas à esquerda e à direita (preto) que incidem sobre a amostra em um experimento CD e a resultante (vermelho); **B.** Transformação da radiação circularmente polarizada para uma elipticamente polarizada pela absorção diferencial das radiações circularmente polarizadas à esquerda e à direita pela amostra. A elipse é caracterizada por uma diferença do tamanho de seus eixos, sendo θ a elipicidade. Figura adaptada de Hofmann, 2010.

Para proteínas, temos como principal uso desta técnica, a avaliação da estrutura secundária de proteínas nativas ou obtidas de forma recombinante, alterações causadas pela ligação de inibidores, estabilidade das proteínas frente à alteração de temperatura e estabilidade após a adição de ácidos ou bases e agentes desnaturantes. O gráfico obtido pela técnica de CD apresenta valores distintos para cada elemento da estrutura de proteína, sendo que, as hélices- α são mostradas em picos negativos nos comprimentos de onda 190-195 nm e positivos a 208 nm e 222 nm. As folhas β são caracterizadas pela presença de picos negativos entre 215-220 nm e positivos à 195 nm, porém não tão proeminentes quanto as hélices- α . Além disso, temos os elementos desordenados da estrutura, que possuem picos negativos próximos a 195 nm e positivos em 212 nm (Figura 3) (Kelly *et al.*, 2005).

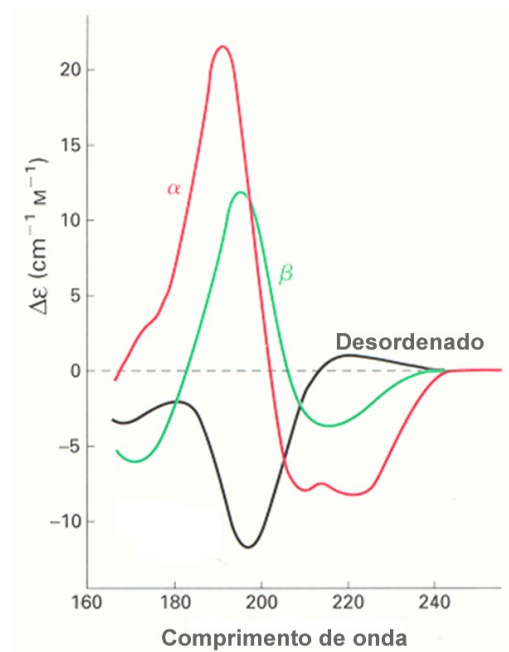


Figura 3: Conformação das estruturas secundárias e o espectro de CD dos elementos estruturais. A linha em verde representa uma folha β , linha em vermelho representa uma hélice- α e a linha preta representa elementos desordenados.

Neste trabalho, foram utilizadas amostras de PrTX-I obtidas na forma recombinante, onde as amostras concentradas à 0,250 mg/mL foram submetidas à experimentos de CD em temperatura de 18 °C.

2. Resultados

O vetor pPicZ α A, contendo o cassete de expressão para a proteína PrTX-I foi clonado, propagado e extraído das células de *E. coli* DH5 α competentes, onde as bandas correspondentes as pares de base de tamanho do vetor utilizado podem ser visualizadas em gel de agarose a 1 % (Figura 4A). O vetor selecionado foi submetido à linearização com enzima PmeI e também visualizado em gel de agarose a 1 % (Figura 4B).

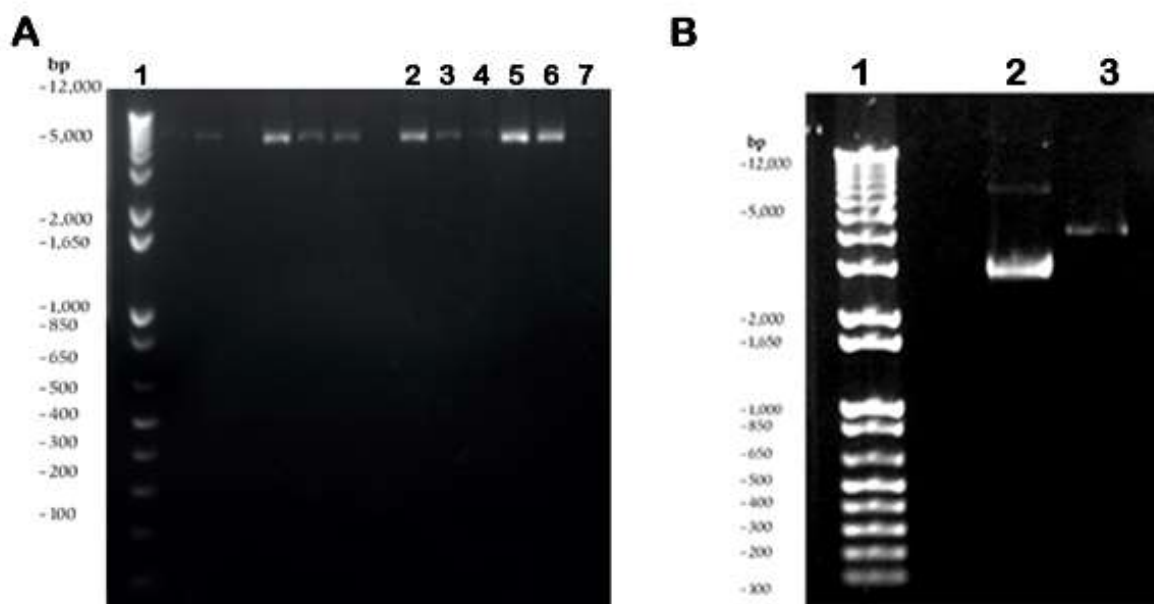


Figura 4: Géis de eletroforese da lise alcalina e linearização. **A.** Eletroforese da lise alcalina das células de *E. coli* DH5α competentes contendo o vetor *pPicZαA-PrTX-I* em gel de agarose 1 %, corado com brometo de etídeo. (1) marcador de pares de base 1 Kb (Invitrogen); (2-7) lise alcalina das colônias 1 a 6. **B.** Eletroforese da linearização com PmeI do vetor *pPicZαA-PrTX-I* em gel de agarose 1 %, corado com brometo de etídeo. (1) marcador de pares de base 1 Kb (Invitrogen); (2) DNA Intacto; (3) DNA Linearizado.

O vetor pPicZαA-PrTX-I linearizado foi integrado no genoma da levedura *P. pastoris* e após a transformação, as células foram cultivadas em meio contendo 100 e 500 µg/mL de zeocina para seleção de colônias resistentes (Figura 5). Não foram encontradas colônias na placa com meio contendo 500µg/mL de zeocina, descartando a possibilidade de possíveis transformantes multiclonos.



Figura 5: Placa dos transformantes em KM71H. O meio contém 100 µg/µL de zeocina, indicando a presença de colônias positivas para o inserto referente a PrTX-I recombinante.

Foram selecionadas 6 colônias para a expressão em tubos de 50 mL e, ao fim do processo, temos como resultado o gel de poliacrilamida a 13 % da Figura 6A, que indica a presença da proteína recombinante em várias colônias, com destaque a colônia 9, selecionada para as induções em larga escala por apresentar uma alta expressão da proteína recombinante (Figura 6B).

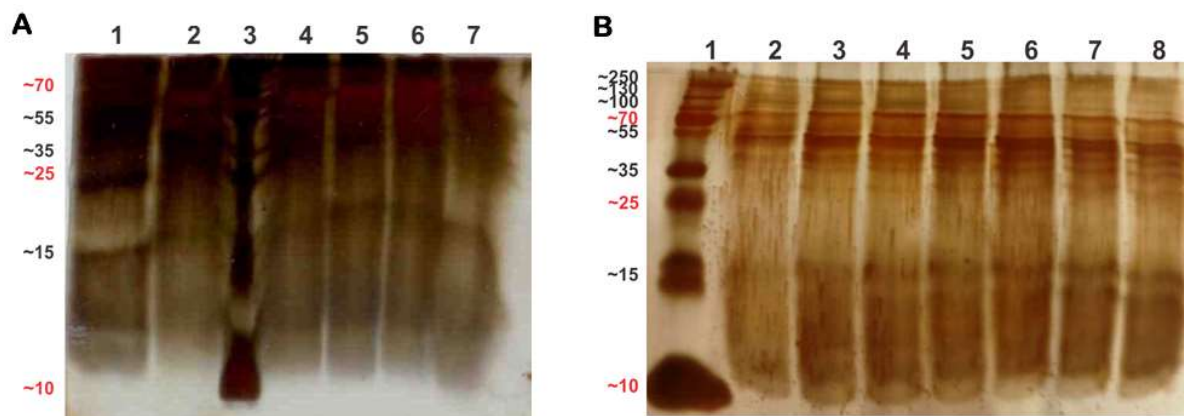


Figura 6: Géis de poliacrilamida a 13 % corados com nitrato de prata **A.** Triagem da expressão da PrTX-I a partir de colônias em relação aos tempos de indução de 144h. (1) Col9; (2) Col10; (3) Padrão de massa molecular; (4) Col11; (5) Col12; (6) Col13; (7) Col14. **B.** Gel mostrando a expressão da proteína PrTX-I pela colônia 9 em relação ao tempo de indução. (1) Padrão de massa molecular; (2) 0 h; (3) 24 h; (4) 48 h; (5) 72 h; (6) 96 h; (7) 120 h; (8) 144 h.

O sobrenadante da indução da expressão foi filtrado, concentrado e submetido a experimentos de purificação em coluna de gel filtração. As frações obtidas foram nomeadas de P1 a P9 (Figura 7A) e analisadas em SDS-PAGE a 13% (Figura 7B), determinando assim as frações P5 e P6 como contendo a proteína recombinante de interesse (Figura 7C).

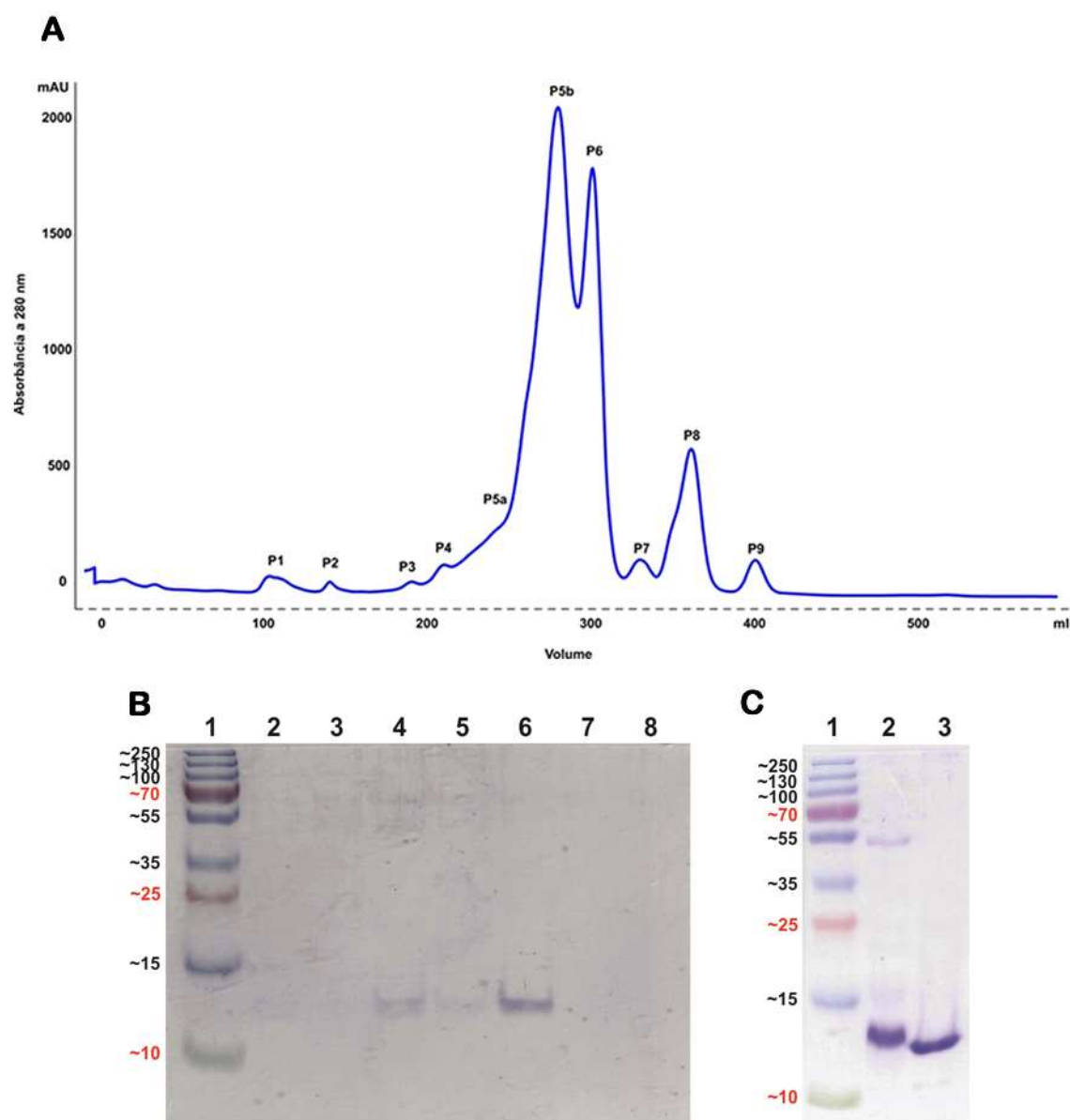


Figura 7: Fracionamento do sobrenadante com a indução da expressão em *P. pastoris* e géis das frações. **A.** cromatograma obtido usando coluna de gel filtração HiLoad™ 26/600 Superdex 75, onde nove frações foram coletadas. **B.** Gel de poliacrilamida a 13 % das frações obtidas por gel filtração corado com *coomassie blue*. (1) Marcador de Massa Molecular; (2) Fração P3; (3) Fração P4; (4) Fração P5a; (5) Fração P5b; (6) Fração P6; (7) Fração P7; (8) Fração P8. **C.** Gel de poliacrilamida a 13 % das frações P5 e P6, concentradas em filtros Vivaspin 3 kDa MWCO (GE), que correspondem à amostras de PrTX-I. (1) Marcador de Massa Molecular; (2) Fração P5; (3) Fração P6.

O pico P6 foi submetido à experimentos de dicroísmo circular (Figura 8) e observou-se que a amostra possui os elementos de estrutura secundária próximas à outras PLA₂s homólogas, porém com algumas diferenças, devido à alta concentração de sais presentes na amostra.

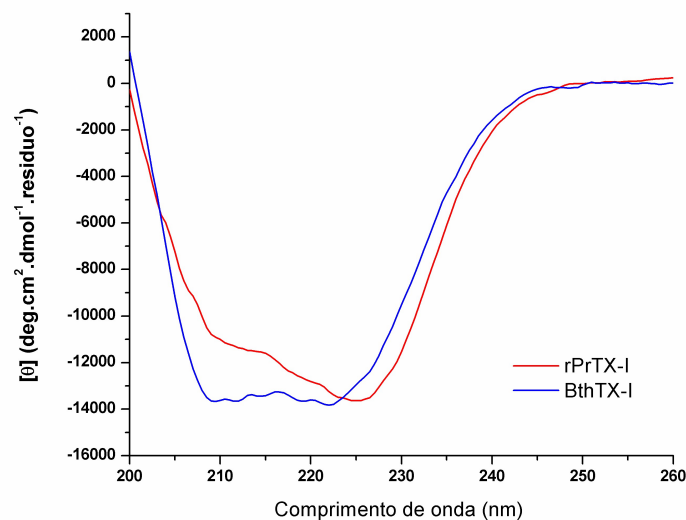


Figura 8: Espectro de CD da PrTX-I recombinante. A linha em vermelho representa a PrTX-I recombinante e a linha em azul representa o espectro de CD da BthTX-I purificada à partir do veneno bruto.

Atualmente, vêm sendo conduzidos experimentos de purificação e espectrometria de massa das amostras de PrTX-I recombinante, para que à partir destas técnicas, poderemos obter amostras com menor quantidade de sais e em maior quantidade para a sua caracterização completa e para que breve, possa-se realizar ensaios miotóxicos com a toxina recombinante junto à junção neuromuscular.

Artigos resultantes do doutorado publicados até o momento.

- 1. Structural and functional studies with a *Bothrops moojeni* myotoxin reveal remarkable similarities and differences compared to other catalytically inactive phospholipases A₂-like**
- 2. Structural and functional evidence for membrane docking and disruption sites on phospholipase A₂-like proteins revealed by complexation with the inhibitor suramin**



Structural and functional studies with mytoxin II from *Bothrops moojeni* reveal remarkable similarities and differences compared to other catalytically inactive phospholipases A₂-like

Guilherme H.M. Salvador^{a,1}, Walter L.G. Cavalcante^{a,b,1}, Juliana I. dos Santos^{a,1}, Márcia Gallacci^b, Andreimar M. Soares^c, Marcos R.M. Fontes^{a,*}

^a Depto. de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, UNESP – Univ Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brazil

^b Depto. de Farmacologia, Instituto de Biociências, UNESP – Univ Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brazil

^c Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas à Saúde, CEBio, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ Rondônia e Departamento de Medicina, Universidade Federal de Rondônia, UNIR, Porto Velho, RO, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 February 2013

Received in revised form 16 May 2013

Accepted 11 June 2013

Available online 25 June 2013

Keywords:

Lys49-phospholipase A₂

Bothrops moojeni venom

Oligomeric assembly

X-ray crystallography

Myographic studies

ABSTRACT

Lys49-phospholipases A₂ (Lys49-PLA₂s) are proteins found in bothropic snake venoms (Viperidae family) and belong to a class of proteins which presents a phospholipase A₂ scaffold but are catalytically inactive. These proteins (also known as PLA₂s-like toxins) exert a pronounced local myotoxic effect and are not neutralized by antivenom, being their study relevant in terms of medical and scientific interest. Despite of the several studies reported in the literature for this class of proteins only a partial consensus has been achieved concerning their functional–structural relationships. In this work, we present a comprehensive structural and functional study with the MjTX-II, a dimeric Lys49-PLA₂ from *Bothrops moojeni* venom which includes: (i) high-resolution crystal structure; (ii) dynamic light scattering and bioinformatics studies in order to confirm its biological assembly; (iii) myographic and electrophysiological studies and, (iv) comparative studies with other Lys49-PLA₂s. These comparative analyses let us to get important insights into the role of Lys122 amino acid, previously indicated as responsible for Lys49-PLA₂s catalytic inactivity and added important elements to establish the correct biological assembly for this class of proteins. Furthermore, we show two unique sequential features of MjTX-II (an amino acid insertion and a mutation) in comparison to all bothropic Lys49-PLA₂s that lead to a distinct way of ligand binding at the toxin's hydrophobic channel and also, allowed the presence of an additional ligand molecule in this region. These facts suggest a possible particular mode of binding for long-chain ligands that interacts with MjTX-II hydrophobic channel, a feature that may directly affect the design of structure-based ligands for Lys49-PLA₂s.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Envenoming by snakebites represents a relevant and neglected global health problem, particularly in tropical

regions (Gutierrez et al., 2006; Harrison et al., 2009; Russell, 1991). Recent estimates indicate that at least 421,000 envenomations and 20,000 deaths related to ophidian accidents occur each year, mainly in Latin America, Asia and Africa (Kasturiratne et al., 2008); however, this same study suggests that these numbers can be as high as 1,841,000 envenomations and 94,000 deaths (Kasturiratne et al., 2008). Even so, the mortality caused by snakebite is

* Corresponding author. Tel.: +55 14 38800271; fax: +55 14 38153744.

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

¹ These authors contributed equally to this work.

much higher than the given by several neglected tropical diseases, such as dengue haemorrhagic fever, leishmaniasis, cholera, schistosomiasis and Chagas disease, which leads the World Health Organization to include the ophidian accidents in the list of neglected tropical diseases (Williams et al., 2010).

Snakes from Viperidae family are found in many parts of the world causing several accidents every year (Gutierrez and Lomonte, 1995; Kasturiratne et al., 2008). Particularly in Brazil, the majority of ophidian accidents occur with the *Bothrops* genus (Viperidae family) (Rosenfeld and Kelen, 1971; Saúde, 2001) that are characterized by pronounced local effects, including hemorrhage, edema, pain and myonecrosis (Gutierrez and Chaves, 1980; Gutierrez and Ownby, 2003; Homsí-Brandeburgo et al., 1988; Mebs et al., 1983; Queiroz and Petta, 1984; Rosenfeld and Kelen, 1971). These local effects are very relevant in terms of medical and scientific interest since the proteins responsible for the toxic process which may lead to permanent tissue loss, disability and, in some cases may require the amputation of the victim's affected limb are not efficiently neutralized by antivenom administration (Gutierrez and Lomonte, 1995).

Phospholipases A₂ (PLA₂s) are enzymes that catalyze the hydrolysis of glycerophospholipids, in a calcium-dependent manner, and represent the most abundant myotoxic components in Viperidae snake venoms (Gutierrez and Ownby, 2003). These proteins can be classified into two groups according to their evolutionary pathway: i) the catalytically active enzymes, such as Asp49-, Asn49- and Gln49-PLA₂s and ii) the catalytically inactive PLA₂ variants (Lys49-, Arg49-, and some Asp49-PLA₂s) (dos Santos et al., 2011b). In this latter group, the most studied toxins are the basic and homodimeric Lys49-PLA₂s that induce noticeable local myonecrosis by means of a calcium-independent mechanism (Lomonte and Rangel, 2012). In addition, Lys49-PLA₂s exhibit some effects found exclusively *in vitro*, as the blockade of neuromuscular transmission in isolated preparations, which has been directly associated to their ability in destabilizing cell membranes (Gallacci and Cavalcante, 2010; Correia-de-Sa et al., 2013). Although these toxins are not able to block neuromuscular transmission *in vivo*, it may be a useful experimental approach to investigate both the mechanism of action and the structural–activity relationship of the myotoxic Lys49-PLA₂s.

In this work we report structural and functional studies with a basic Lys49-PLA₂ from *Bothrops moojeni*, known as Myotoxin II or MjTX-II. *B. moojeni* snakes are found in central and southeastern part of the Brazil and also in some parts of Argentina, Paraguay and Bolivia, living mainly in “cerrado” and “araucaria forests” ecosystems (Borges and Araujo, 1998). Their study have clinical and scientific importance because of the number of accidents caused by these snakes due to their aggressive behavior, their large size compared to other snakes from the same genus and because their adaptive capacity against environmental changes (Melgarejo, 2003). MjTX-II has 122 amino acids, molecular weight of approximately 13.5 kDa (Lomonte et al., 1990; Watanabe et al., 2005), and presents myotoxic activity that is characterized by increase of serum

creatine kinase and morphologic changes in mice muscles when studied *in vivo* and *in vitro* (Stabeli et al., 2006; Cavalcante et al., 2007). In addition, it was demonstrated that this protein presents antimicrobial, antitumoral and antiparasitic effects, having therefore potential to therapeutical applications (Stabeli et al., 2006).

Although the crystal structure of MjTX-II had been reported in the literature in 1997 (de Azevedo et al., 1997), the article just presents the comparison of this structure with BaspTX-II (myotoxin II from *Bothrops asper*) that was the only Lys49-PLA₂ structure known at that data. Furthermore, the authors did not deposit the coordinates of MjTX-II structure in PDB data bank making any comparison with other structures impossible. In 2005, the structure of the complex formed between MjTX-II and stearic acid was solved (Watanabe et al., 2005), revealing the ligand binding sites and comparing it to PrTX-II/fatty acid structure that was solved in 2001 (Lee et al., 2001). Since then, several structures of native and complexed Lys49-PLA₂s have been solved revealing some consensual features of these proteins (e.g. homodimeric conformation) but bringing many controversial and intriguing issues (e.g. biological assembly, myotoxic site, the role of Lys122 residue) (Murakami et al., 2005; dos Santos et al., 2009; Fernandes et al., 2010; Marchi-Salvador et al., 2009; dos Santos et al., 2011b). Then, in this article we try to definitively address these issues for Lys49-PLA₂s in general and to highlight some specific characteristics of MjTX-II which may be very important considering the medical and scientific importance of Lys49-PLA₂s proteins for the establishment of myonecrosis.

2. Materials and methods

2.1. Crystallization, X-ray data collection and data processing

A lyophilized sample of MjTX-II was dissolved in ultrapure water at a concentration of 11 mg mL⁻¹. MjTX-II crystals were obtained by the hanging-drop vapor-diffusion method (Ducruix and Giegé, 1992) in which 1 µl protein solution and 1 µl reservoir solution were mixed and equilibrated against 500 µl of the precipitant solution. Single crystals were obtained using a solution containing 20% (v/v) 2-propanol, 20% (w/v) polyethylene Glycol 4000 and 1.0 M Sodium Citrate pH 5.6. The crystals measured 0.30 × 0.25 × 0.15 mm after growing approximately one month at 291 K.

X-ray diffraction data were collected using wavelength of 1.423 Å at a synchrotron-radiation source (MX2 beamline – Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, LNLS, Campinas, Brazil) using a MAR CCD imaging-plate detector (MAR Research™). The crystals submitted to X-ray diffraction experiments were held in appropriate nylon loops and flash-cooled in a stream of nitrogen at 100 K without cryoprotectant. The best data set was collected with a crystal-to-detector distance of 75 mm and an oscillation range of 1° resulting in 104 images collected. The data were processed at 1.92 Å resolution using the HKL program package (Otwinowski and Minor, 1997) showing the crystals belong to P2₁2₁2₁ space group and that they are isomorphous to the crystals of MjTX-II complexed to stearic

acid (Watanabe et al., 2005). X-ray diffraction data processing and refinement statistics are shown in Table 1.

2.2. Structure determination and refinement

The crystal structure was solved by the Molecular Replacement Method using the program MOLREP (Vagin and Teplyakov, 1997) from CCP4 package v.6.1.13 (Potterton et al., 2004) and atomic coordinates of MjTX-II/stearic acid complex (monomer A with the stearic acid ligand omitted was used - PDB access code 1XXS) (Watanabe et al., 2005). Rounds of crystallographic refinement with CNS v.1.3 (Brunger et al., 1998) and manual modeling using the program Coot v.0.7 (Emsley and Cowtan, 2004) were used to improve the model, considering R_{cryst} and free R-factors. Polyethylene glycol (PEG) 4000, isopropanol and solvent molecules were added by CNS v.1.3 and Coot v.0.7 programs. Due to the lack of electron density in some regions of the model, the following amino acid side chains were not modeled: monomer A - Lys16, Lys36, Lys70, Glu86, Asn88 and Lys128; monomer B - Lys16, Lys57, Lys69, Lys70 and Lys128. The final model was checked in MolProbity program (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>) (Chen et al., 2010). The coordinates were deposited in the Protein Data Bank with identification code 4KF3.

2.3. Comparative analysis

Molecular comparisons of the structures were performed using the Coot v.0.7 program (Emsley and Cowtan, 2004) with only C_α coordinates. The structures of MjTX-II/stearic acid (PDB ID 1XXS) (Watanabe et al., 2005), BaspTX-II (PDB ID 1CLP) in its native form (Arni et al., 1995)

and complexed to suramin (PDB ID 1Y4L) (Murakami et al., 2005), BthTX-I (PDB ID 3HZD), BthTX-I/PEG4000 (PDB ID 3IQ3), BthTX-I/BPB (PDB ID 3HZW), PrTX-I/BPB (PDB ID 2OK9) (Fernandes et al., 2010), BthTX-I/ α - tocopherol (PDB ID 3CXI), PrTX-I (PDB ID 2Q2J), PrTX-I/ α - tocopherol (PDB ID 3CYL) (dos Santos et al., 2009), PrTX-I/Rosmarinic acid (PDB ID 3QNL) (dos Santos et al., 2011a), PrTX-II/fatty acid (PDB ID 1QLL) (Lee et al., 2001), BnSP-6 and BnSP-7 (PDB ID 1PC9 and 1PA0 respectively) (Magro et al., 2003) and BnIV/Myristic acid (PDB ID 3MLM) (Delatorre et al., 2011) were used in the comparative analysis.

All the structural figures were generated using the Pymol program (DeLano, 2002). Analysis of the quaternary assemblies and interfacial contacts of the crystallographic models were performed using the online interactive tool PISA (Krissinel and Henrick, 2007) available at the European Bioinformatics Institute server (<http://www.ebi.ac.uk>).

2.4. Dynamic light scattering

Dynamic light scattering (DLS) experiments were executed at 283 K using a DynaPro TITAN™ (Wyatt Technology™) device. One hundred measurements were acquired with the protein dissolved in ultra-pure water at 3.5 mg mL⁻¹ concentration. Analyses of these data were performed with Dynamics v.6.10 program (Wyatt Technology™).

2.5. Myographic study

Adult male Swiss mice (20–25 g) were killed by exsanguination after cervical dislocation. The mouse phrenic nerve-diaphragm muscle was removed and mounted vertically under a tension of 5 g in a conventional isolated organ bath chamber containing 15 ml of Ringer solution, with the following composition (mol/l): NaCl, 135; KCl, 5; MgCl₂, 1; CaCl₂, 2; NaHCO₃, 15; Na₂HPO₄, 1; glucose, 11. This solution was gassed with O₂ (95%) + CO₂ (5%) and kept at 35 ± 2 °C. The preparation was attached to an isometric force transducer (Grass, FT03) coupled to a signal amplifier (Gould Systems, 13-6615-50). The recordings were made on a computer through data acquisition system (Gould Sytems, Summit ACQuire and Summit DataViewer). The preparation was stabilized for at least 45 min before the toxin addition. Indirect contractions were evoked by supramaximal strength pulses (0.2 Hz; 0.5 ms; 3 V), delivered by an electronic stimulator (Grass S88K) and applied on the phrenic nerve by suction electrode. Direct contractions were evoked by supramaximal pulses (0.2 Hz; 5 ms; 13 V) through a bipolar electrode positioned on opposite sides of the muscle. Experiments of direct contractions were performed in the presence of D-tubocurarine (5 µg/ml) previously to toxin addition. The amplitudes of indirect and direct twitches were evaluated during 90 and 120 min respectively and the time required to reach 50% paralysis ($t_{1/2}$) was determined in each situation.

2.6. Electrophysiological study

The mouse phrenic diaphragm muscle was removed and fixed in an isolated organ bath chamber containing 5 ml of Ringer solution. The resting membrane potentials

Table 1
X-ray data collection and refinement statistics for the MjTX-II crystallographic structure.

Unit cell (Å)	$a = 50.0$; $b = 62.2$; $c = 86.0$
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Resolution (Å)	50.00–1.92 (1.99–1.92) ^a
Unique reflections	19571 (2036) ^a
Completeness (%)	92.4 (97.6) ^a
$I/\sigma(I)$	10.4 (2.0) ^a
Redundancy	3.9 (3.7) ^a
Molecules in ASU	2
Matthews coefficient V_M (Å ³ Da ⁻¹)	2.5
R_{merge}^b (%)	11.0 (41.9) ^a
R_{cryst}	22.8
R_{free}	25.7
Number of non-hydrogen atoms	
Protein	1916
Waters	186
PEG molecules	4
Isopropanol molecules	6
Mean B-factor (Å ²) ^c	
Overall	56.12
Ramachandran plot (%) ^d	
Residues were in favored	96.7
Residues were in allowed	3.3

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

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

^c Calculated with CNS program.

^d Calculated with MolProbity program.

(MP) and miniature endplate potentials (MEPP) were measured by standard microelectrode techniques (Fatt and Katz, 1951). The glass microelectrodes were filled with 3 M KCl and introduced intracellularly in the muscle fibers with a micromanipulator (Leitz). Microelectrodes were attached to a preamplifier (World Precision Instruments, Electro 70s) coupled to an amplification system (Biopac Systems, MP450) and monitored on an oscilloscope (Tektronix, 2232) and on a computer with a data acquisition and analysis system (AcqKnowledge®, version 3.8.2). The resting MP was recorded at times 5, 15, 30, 60 and 90 min and MEPPs at 5, 30, 60 and 90 min after MjTX-II administration. Recording sites were rejected if the membrane potential was less than -65 mV on the initial impalement.

2.7. Ethics

Institutional Animal Care and Use Committee (Institute of Biosciences – Sao Paulo State University – UNESP) approved this study under the number 033/05. Animal procedures were in accordance with the guidelines for animal care prepared by the Committee on Care and Use of Laboratory Animal Resources, National Research Council, USA.

2.8. Statistical analysis

Results are expressed as mean $\pm$ S.E. Data were analyzed by ANOVA complemented by the Tukey–Kramer test. Values of $P < 0.05$ were considered significant.

3. Results and discussion

3.1. Overall crystallographic structure

The crystal structure of MjTX-II was solved at 1.92 Å resolution revealing an asymmetric unit containing two monomers. As shown in Table 1, the refinement of the model converged to a final R_{cryst} of 22.8% and an R_{free} of 25.7%. The final model is constituted by 1916 non-hydrogen protein atoms, 186 water, four polyethylene glycol 4000 (PEG4K) and six isopropanol molecules. The overall stereochemical quality of the final MjTX-II structure was judged as satisfactory since 96.7% and 100% of the total number of amino acid residues are located in the favored and allowed regions of the Ramachandran plot respectively, according to their ϕ/ψ angle combinations. MjTX-II structure is stabilized by seven disulfide bridges and preserves the classical secondary structure elements found in this group of proteins, i.e., an N-terminal α -helix, a “short” helix, a non-functional Ca^{2+} -binding loop, two anti-parallel α -helices (2 and 3), two short strands of anti-parallel β -sheet (known as β -wing), and a C-terminal loop (Fig. 1A). MjTX-II structure presents four PEG4K molecules interacting with it (Fig. 2): (i) two PEG4K (PEG 1 and 2) molecules are found inside of the hydrophobic channels (one molecule in each protein protomer), displaying hydrogen bond with Gly30 and also other interactions with “active site” residues; (ii) one PEG4K (PEG 3) molecule interacts at the same time with the residues Lys49 and Tyr52 from both

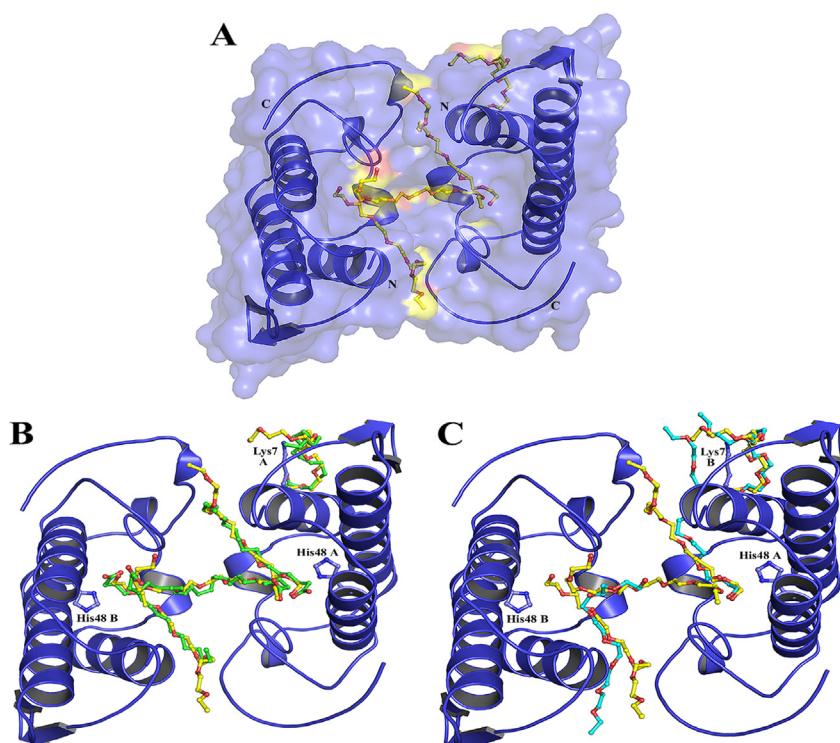


Fig. 1. Crystal structure of MjTX-II (A) and its superposition with MjTX-II/stearic acid (B) and with BthTX-I/PEG4K (C). The protein is represented in cartoon and ligand molecules are shown in sticks: in yellow, PEG4K from MjTX-II structure, in green, stearic acid molecules from MjTX-II/stearic acid structure and in cyan, PEG4K from BthTX-I/PEG4K structure. Drawn using PyMol program (DeLano, 2002). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

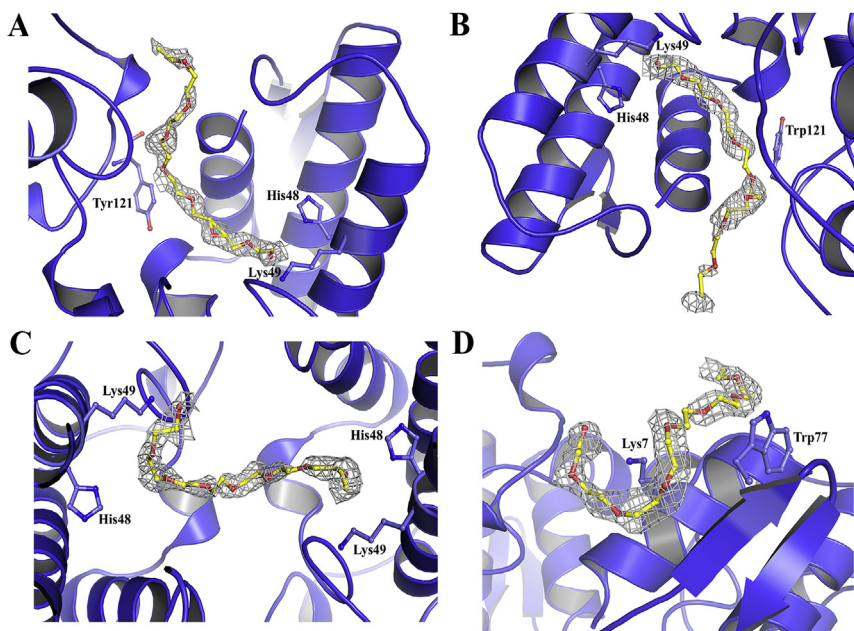


Fig. 2. Electron density difference maps for PEG4K molecules from the MjTX-II structure: (A) PEG4K (1) in the hydrophobic channel region of monomer A; (B) PEG4K (2) in the hydrophobic channel region of monomer B; (C) PEG4K (3) in the hydrophobic channel region connecting the monomers and (D) PEG4K (4) around Lys7 residue from monomer A. The maps were calculated with coefficients $|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$ and contoured at 1.0 standard deviations. The ligands molecules were not considered for electron density maps calculation but are drawn for clarity. Drawn using PyMOL program (DeLano, 2002).

monomers and (iii) one PEG4K (PEG 4) molecule interacts with Lys7, Trp77 and several other residues of monomer A (Fig. 3).

Dynamic light scattering experiments indicates a mean hydrodynamic radius (R_H) of 2.3 nm with a polydispersity of 12.0%. This R_H value corresponds to a molecular weight of approximately 23 kDa and is, thus, equivalent to a dimer. These results are in agreement with other literature data for Lys49-PLA₂s since electrophoresis, spectroscopic (Arni et al., 1999; da Silva Giotto et al., 1998), crystallographic (Arni and Ward, 1996; dos Santos et al., 2009; Magro et al., 2003; Murakami et al., 2005), small angle X-ray scattering (Murakami et al., 2007) and dynamic light scattering (Fernandes et al., 2010) experiments demonstrates that both Lys49-PLA₂s are dimeric in solution.

In addition, the inspection of unit-cell packing showed that there are two possible dimeric configurations for the MjTX-II structure. The first possibility is similar to the so-called “conventional dimer” and the second one is similar to the “alternative dimer” (Murakami et al., 2005). In the conventional dimer, the monomers are stabilized by interactions between the tips of β -wings and the residues of the N-terminal helices (Arni and Ward, 1996) while in the alternative dimer they are stabilized by contacts between the putative calcium-binding loops and C-termini forming a connection route between the “active sites” of both monomers (dos Santos et al., 2009). Examination of the unit-cell packing using PISA software (Krissinel and Henrick, 2007) points the alternative dimeric configuration is the most probable to occur in solution. According to this analysis, MjTX-II/PEG4K crystallographic structure presents an interfacial area of $552.6 \text{ \AA}^2$, $G_{\text{int}} = -9.8 \text{ kcal/mol}$ and $G_{\text{diss}} = 0.145 \text{ kcal/mol}$. Furthermore, this choice is also

supported by previous small angle X-ray scattering experiments (Murakami et al., 2007) and functional aspects of Lys-PLA₂s myotoxins (dos Santos et al., 2009; Murakami et al., 2005).

3.2. Comparison between MjTX-II and MjTX-II complexed to stearic acid structures

The crystal structure of MjTX-II co-crystallized with stearic acid (a fatty acid) has been previously solved (Watanabe et al., 2005) and evidenced six stearic acid molecules interacting with the protein: two of them in each hydrophobic channel (two molecules in each protomer) and other two in the dimeric interface interacting with Lys7 residue. Contrasting with the co-crystallized structure (MjTX-II/stearic acid), the native MjTX-II (this study) only presents four PEG4K molecules: three of them are inside the hydrophobic channels and the fourth one interacts with Lys7 residue (Fig. 1A). However, the comparison of both structures reveals that all ligands occupy similar positions: (i) PEG 1 and PEG 2 occupy the same sites that two stearic acids from the MjTX-II/stearic acid complex (inside of the hydrophobic channels) (Fig. 1B); (ii) PEG 3 is at the hydrophobic channels entrance (N-terminal face of the dimeric structure), connecting both protomers of the dimeric structure and is located approximately at the same position that two stearic acids molecules in the MjTX-II complexed structure (Fig. 1B); (iii) PEG 4 occupies approximately the same position of two stearic acids in the dimeric interface of MjTX-II/stearic acid structure which presents 50% occupancy values and are sited in a tail-to-tail conformation (Fig. 1B) (Watanabe et al., 2005). Due to the alternative dimeric configuration adopted for the native

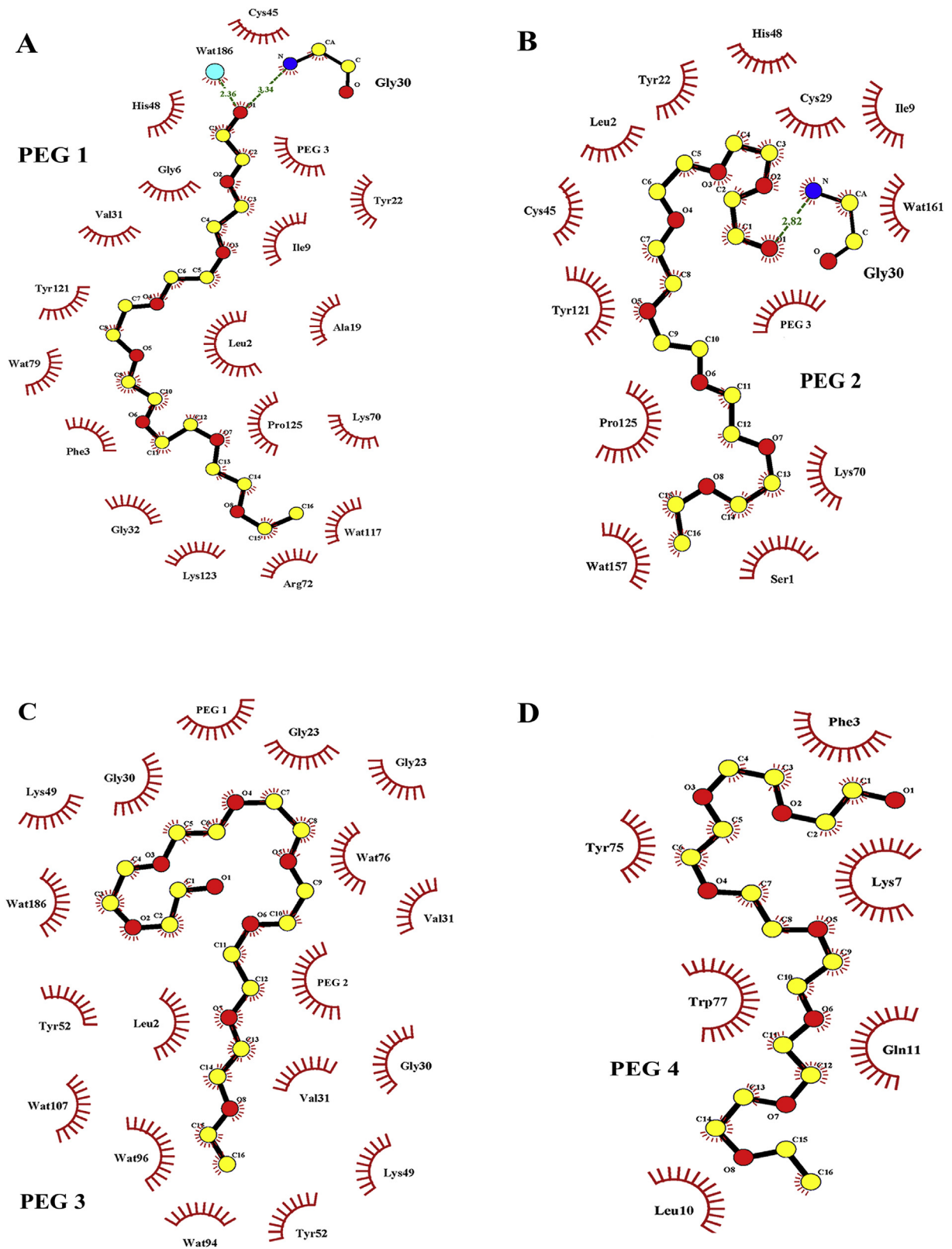


Fig. 3. Interaction of PEG4K molecules in MjTX-II structure. (A) and (B) represents the interactions of PEG4K (1 and 2) molecules that occupies the hydrophobic channel of the structure. (C) Hydrophobic interactions of PEG4K (3) molecule that connects both monomers. (D) Hydrophobic interactions of PEG4K (4) molecule in the protein surface (around Lys7 from monomer A). Drawn using Ligplot program (Wallace et al., 1995).

MjTX-II only one PEG ligand with 100% occupancy was modeled at this site. Therefore, despite the differences between both ligands (PEG4K and stearic acid), both structures are essentially identical as evidenced by the root-mean-square deviation (r.m.s.d.) of 0.52 Å for their C_α atoms superposition. Important regions for this toxin biological functions (e.g. the active site, Ca^{2+} -binding loop, C-termini (dos Santos et al., 2009; Fernandes et al., 2010; Magro et al., 2003)) are conserved indicating that PEG4K may structurally simulate a fatty acid molecule bound to toxin's hydrophobic channels since its backbone is structurally similar to the protein substrate (Watanabe et al., 2005). For this reason, we can state that the MjTX-II structure may represent the protein in its active state (attached to the membrane) (dos Santos et al., 2009).

3.3. Comparison of MjTX-II and other Lys49-PLA₂ structures

Several myotoxic Lys49-PLA₂s in the apo and complexed forms have been solved (Arni et al., 1999; dos Santos et al., 2011a; dos Santos et al., 2009; Fernandes et al., 2010; Lee et al., 2001; Magro et al., 2003; Marchi-Salvador et al., 2009; Murakami et al., 2005, 2007; Watanabe et al., 2005). Table 2 shows a structural comparison between the monomers of MjTX-II and the same analysis for several other apo and complexed Lys49-PLA₂s. As previously observed (dos Santos et al., 2009), all complexed structures present lower r.m.s.d. values compared to their respective apo structures. In other words, there is a clear structural pattern for Lys49-PLA₂s whose apo and complexed states can also be distinguished by the “two angle” model previously suggested (dos Santos et al., 2009). Applying this model to MjTX-II structure, the aperture and torsional angles between its monomers are 55° and 25°, respectively. These values are in agreement to those calculated for MjTX-II/stearic acid structure (52° and 20°) and are also similar to values found for other complexed Lys49-PLA₂s (Table 3) (dos Santos et al., 2009).

In 2001, Lee and colleagues solved the PrTX-II/fatty acid structure and suggested an important role played by Lys122. According to the authors, Lys122 interacts with the

main chain carbonyl of Cys29 causing hyperpolarization of the Cys29/Gly30 peptide bond and, consequently, increases the affinity of the toxin for fatty acids (Lee et al., 2001). This hypothesis suggested that Lys49-PLA₂s are enzymes that are able to hydrolyze phospholipids but fail to release the products of its action. The fatty acid would stay retained in the hydrophobic channel of the toxin consequently inhibiting it, therefore explaining why Lys49-PLA₂s toxins do not display significant catalytic activity. In contrast with this hypothesis, Fernandes and colleagues (Fernandes et al., 2010) performed a very comprehensive study using 16 different dimeric Lys49-PLA₂s and showed that Lys 122 is a very flexible residue that may adopt random configurations even though it usually interacts with different negative charged sites. Despite the highlighted absence of pattern for Lys122 interaction, PrTX-II complexed to fatty acid and MjTX-II complexed to stearic acid structures are two observed exceptions (Lee et al., 2001; Watanabe et al., 2005). The Lys122 side chain interacts with main chain carbonyl of Cys29 in both monomers of these dimeric complexes indicating that the phenomena just occur when fatty acids are present in the hydrophobic channels (Fernandes et al., 2010). Interesting, the results presented here for the MjTX-II can clarify this issue. As discussed in the item 3.2, the structure of MjTX-II presents PEG4K molecules in its hydrophobic channels at the same regions where fatty acids are found in the MjTX-II/stearic acid structure. Therefore, this finding suggests that the Cys29-Lys122 interaction is not exclusive for Lys49-PLA₂s-fatty acid bound structures.

Additionally, comparison between BthTX-I/PEG4K (Fernandes et al., 2010) and MjTX-II/PEG4K (this work) structures reveals important features of MjTX-II in comparison to BthTX-I and other bothropic Lys49-PLA₂s myotoxins. Despite the high sequential and structural similarity between MjTX-II and BthTX-I (they share 95% of identity), and the presence of two PEG4K molecules in the hydrophobic channels of both structures, their superposition clearly demonstrates the ligand way of binding at these proteins are somewhat different (Fig. 1C). The reason seems to be the insertion of the residue Asn120 and the Leu32Gly mutation since these characteristics apparently shifts the orientation of PEG molecules inside the hydrophobic channel by modification of the channel ends. Interestingly, Asn120 insertion and Leu32Gly mutation are only found in MjTX-II when comparing this protein to all the other bothropic Lys49-PLA₂s whose structures are solved to date (Fig. 4). Therefore, the Asn120 insertion is probably the responsible for the binding of the interchain PEG 3 molecule since this insertion leads to a distortion of the protein protomers (Table 3). This evidence is enhanced by the fact that other Lys49-PLA₂s toxins that presents 121 amino acids do not bind this interchain PEG4K or PEG3350 (Fernandes et al., 2010) whereas MjTX-II (122 residues) allow a PEG4K interaction at this region. It is important to highlight that bothropic Lys49-PLA₂s that do not have structures solved yet but present mutations and/or insertions at the positions 32 and 120 are known (Fig. 4); however their structural characteristics upon ligand binding will just be evidenced when these structures are elucidated.

Table 2

Superposition between Lys49-PLA₂s monomers (root mean square deviation of C_α atoms).

Protein (PDB id)	r.m.s.d. (Å)
MjTX-II/PEG4000	0.23
MjTX-II/Stearic acid (1XXS)	0.26
BaspTX-II/Suramin (1Y4L)	0.68
BthTX-I/ α -tocopherol (3CXI)	0.76
PrTX-I/ α -tocopherol (3CYL)	0.82
BthTX-I/BPB (3HZW)	0.67
PrTX-I/BPB (2OK9)	0.47
BthTX-I/PEG4000 (3IQ3)	0.79
PrTX-I/Rosmarinic acid (3QNL)	0.32
BnIV/Myristic acid (3MLM)	0.55
PrTX-II/Fatty acid (1QLL)	0.25
BaspTX-II (1CLP)	0.60
BnSP-6 (1PC9)	0.96
BnSP-7 (1PA0)	0.96
PrTX-I (2Q2J)	1.04
BthTX-I (3HZD)	1.05

Table 3Torsional angles (θ_T), aperture angles (θ_A) and hydrogen bonds at the interface of Lys49-PLA₂s from *Bothrops* genus.

Protein (PDB id)	θ_T (torsional angle) ^a	θ_A (aperture angle) ^a	Hydrogen bonds at the interfaces ^b		
			Monomer A	Monomer B	Distance Å
MjTX-II	55°	25°	Ala19 [N]	Tyr121 [OH]	2.88
MjTX-II/Stearic acid (1XXS)	52°	20°	Asn17 [ND2]	Tyr121 [OH]	2.29
			Tyr121 [OH]	Asn17 [ND2]	2.36
			Tyr121 [OH]	Ala19 [N]	2.58
			Ala19 [N]	Tyr 121 [OH]	3.64
BaspTX-II/Suramin (1Y4L)	51°	15°	–	–	–
BthTX-I/ α -tocopherol (3CXI)	40°	11°	Tyr119 [O]	Asn17 [ND2]	2.84
			Tyr 119 [OH]	Tyr119 [OH]	2.57
PrTX-I/ α -tocopherol (3CYL)	41°	12°	Tyr119 [O]	Asn17 [ND2]	2.84
			Tyr119 [OH]	Tyr119 [OH]	2.48
BthTX-I/BPB (3HZW)	53°	22°	Tyr119 [OH]	Asn17 [ND2]	3.25
			Tyr119 [OH]	Tyr119 [OH]	3.09
PrTX-I/BPB (2OK9)	41°	29°	Tyr119 [O]	Asn17 [ND2]	2.82
			Tyr119 [OH]	Tyr119 [OH]	2.16
BthTX-I/PEG4000 (3IQ3)	41°	29°	Tyr119 [O]	Asn17 [ND2]	2.82
			Tyr119 [OH]	Tyr119 [OH]	2.56
PrTX-I/Rosmarinic acid (3QNL)	43°	23°	Tyr119 [O]	Asn17 [ND2]	3.16
			Tyr119 [OH]	Tyr119 [OH]	2.18
			Asn17 [ND2]	Tyr119 [O]	3.22
			Tyr119 [OH]	Tyr119 [OH]	2.42
BnlV/Myristic acid (3MLM)	41°	27°	Tyr119 [O]	Asn17 [ND2]	2.49
PrTX-II/fatty acid (1QLL) ^c	81°	23°	Tyr119 [OH]	Tyr119 [OH]	3.09
BaspTX-II (1CLP) ^d	44°	22°	Tyr119 [OH]	Tyr119 [OH]	2.35
			Tyr119 [OH]	Lys20 [NZ]	3.86
BnSP-6 (1PC9)	60°	6°	Tyr119 [O]	Asn17 [ND2]	2.51
BnSP-7 (1PA0)	60°	6°	Lys69 [NZ]	Val31 [O]	2.74
			Tyr119 [O]	Asn17 [ND2]	2.68
PrTX-I (2Q2J)	60°	7°	Val31 [O]	Lys69 [NZ]	2.57
			Asn17 [ND2]	Tyr 119 [O]	2.91
			Asn17 [ND2]	His120 [O]	3.36
BthTX-I (3HZD)	60°	14°	Val31 [O]	Lys69 [NZ]	2.72

^a Torsional and aperture angles were calculated according to the proposal of dos Santos et al., 2009.^b Hydrogen bonds were inferred using the online interactive tool PISA (http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/cgi-bin/piserver).^c PrTX-II/fatty acid (PDB id 1QLL) crystallographic structure do not follow the torsional/aperture angle pattern for complexed structures as pointed by dos Santos et al., 2009.^d BaspTX-II (PDB id1CLP) crystallographic structure was deposited as an apo structure but according to dos Santos et al., 2009 it can be a complex.

The C-termini of Lys49-PLA₂s toxins has been pointed as containing their myotoxic site (Arni and Ward, 1996; Magro et al., 2003; Ward et al., 2002). Afterward, dos Santos and colleagues reviewed several native and complexed Lys49-PLA₂s and proposed that Arg118, Lys20 and Lys115 residues constitute these toxins myotoxic site (dos Santos et al., 2009). In the same study, the authors propose a two-step mechanism for Lys49-PLA₂s which allow the destabilization of biological membranes. The first step of the mechanism would be the interaction of the Lys20, Lys115 and Arg118 of these proteins with the phospholipid head group region (dos Santos et al., 2009); subsequently, a quaternary rearrangement takes place in Lys49-PLA₂s monomers allowing long-chain hydrophobic portions of membrane phospholipids to be inserted into the hydrophobic channel of the toxin (dos Santos et al., 2009; dos Santos et al., 2011a). Therefore, the hydrophobic channel was demonstrated to be involved in one of the steps required for Lys49-PLA₂s action mechanism (dos Santos et al., 2009; dos Santos et al., 2011a). It is also interesting to highlight that if the alternative dimer is considered as biological dimer, the myotoxic sites from both monomers are aligned at the same plane (side by side) for the complexed structures (active state) and an interchain Tyr119–Tyr119 hydrogen bond is formed (Table 3) which increasing the toxin potency (dos Santos et al., 2009). The

sequence alignment of bothropic Lys49-PLA₂s (Fig. 4) shows that the residues of the myotoxic site (Lys20, Lys115 and Arg118) and Tyr119 are conserved in MjTX-II, however, the interchain Tyr119–Tyr119 hydrogen bond is not present in its dimeric interface (these residues are at a distance of 4.7 Å). Analyzing MjTX-II sequence (Fig. 4) it is possible to observe that the C-terminal region of this toxin presents some particularities as an insertion of a residue at position 120 and a mutation at position 121 (His→Tyr) if compared to other bothropic Lys49-PLA₂s whose structures are known. Therefore, Asn120 insertion may be the responsible for a diversion of this region as evidenced by the lack of Tyr119–Tyr119 hydrogen bond which is probably compensated by the creation of two new hydrogen bonds with the participation of Tyr121 residue (Table 3).

Then, taking into account these facts (Asn120 insertion and mutations of residues 32 and 121) and their consequences to PEG4Ks mode of binding, it is reasonable to suggest that MjTX-II may require specific or modified inhibitors when compared to molecules that are able to inhibit bothropic Lys49-PLA₂s by interaction with their hydrophobic channels. This is due to the different profile of ligand binding presented at this region (Fig. 1C.) and may have implications when considering structure-based ligand design for Lys49-PLA₂s.

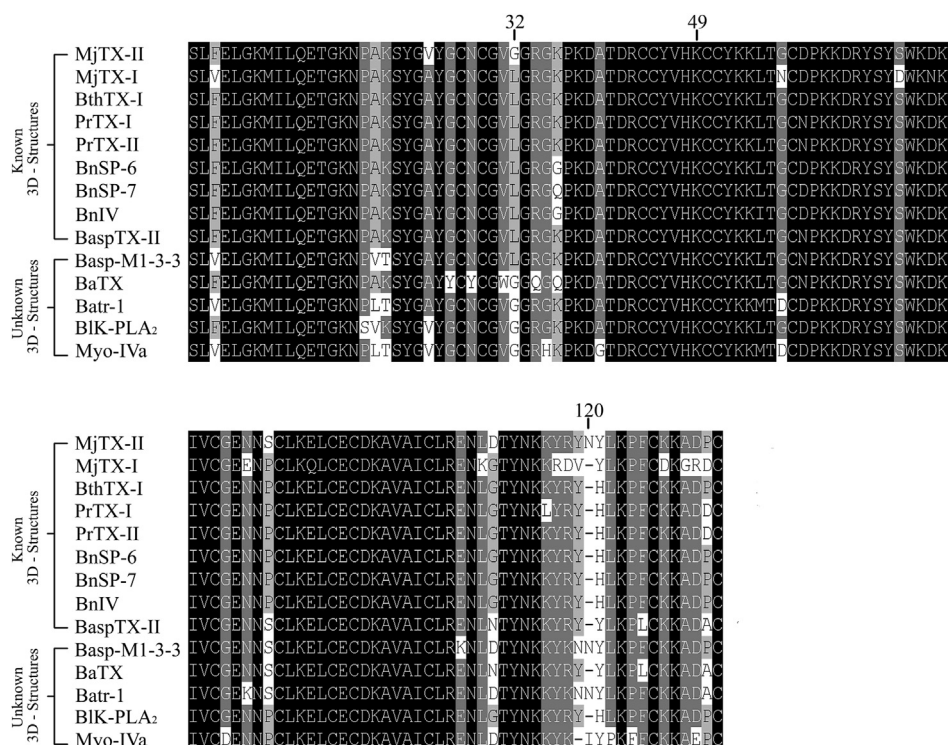


Fig. 4. Amino acid sequence alignment of Lys49-PLA₂s from *Bothrops* genus. The natural substitution Gly32 and the Asn120 insertion are highlighted. NCBI GI entry codes for the proteins represented are BnIV (*Bothrops pauloensis*): 333361256, BnSP-6 (*Bothrops pauloensis*): 49258448, BnSP-7 (*Bothrops pauloensis*): 239938675, BthTX-I (*Bothrops jararacussu*): 51890398, MjTX-II (*Bothrops moojeni*): 62738542; BaspTX-II (*Bothrops asper*): 166215047, PrTX-I (*Bothrops pirajai*): 17433154, PrTX-II (*Bothrops pirajai*): 17368328, Basp-M1-3-3 (*Bothrops asper*): 17433168, BaTX (*Bothrops alternatus*): 292630846, Batr-1 (*Bothrops atrox*): 82201805, BIK-PLA2 (*Bothrops leucurus*): 353678055, Myo-IVa (*Bothrops asper*): 166216293.

3.4. The crystal structure of MjTX-II and the biological dimer of Lys49-PLA₂ structures

As discussed in the last two sections, MjTX-II structure was solved in the oligomeric assembly known as “alternative dimer” given that it has higher probability of occurrence in solution due to bioinformatic analyses and also due to several experimental and functional reasons (dos Santos et al., 2011a; dos Santos et al., 2009; Fernandes et al., 2010; Marchi-Salvador et al., 2009; Murakami et al., 2005, 2007). However, as discussed in a recent review in this field (Lomonte and Rangel, 2012), this subject is still controversial for some authors.

Although no experiment was able to definitively prove the correct assembly adopted by Lys49-PLA₂s toxins, MjTX-II structure added an important experimental evidence for the choice of the alternative dimer as the probable quaternary assembly found in solution for these proteins. As shown in the Fig. 2, the PEG 3 binds simultaneously to both monomers of the protein. This mode of binding is only possible for the alternative dimeric conformation because if the conventional dimer had been used to solve this structure a large portion of the ligand would be exposed to the solvent which is energetically unfavorable. Similar results were also obtained for PrTX-I/ α -tocopherol and BaspTX-II/suramin structures (dos Santos et al., 2009; Murakami et al., 2005), leading these authors to choose the alternative assembly when solving both complexed structures.

3.5. Functional studies

Myographic studies show that MjTX-II (1.0 μ M) produced an irreversible and time-dependent blockade of both directly ($t_{1/2} = 40.0 \pm 2.3$ min, $n = 7$) and indirectly ($t_{1/2} = 32.1 \pm 4.8$ min, $n = 5$) evoked twitches (Fig. 5A and B). The present findings were consistent with those already described for other Lys49-PLA₂s (Cavalcante et al., 2007; Gallacci et al., 2006; Randazzo-Moura et al., 2008; Rodrigues-Simioni et al., 1995; Soares et al., 2000, 2001; Stabeli et al., 2006). Statistical comparison of the indirectly evoked contractions $t_{1/2}$ of the MjTX-II with those of other Lys49 PLA₂s, such as PrTX-I from *Bothrops pirajai* ($t_{1/2} = 49.0 \pm 6.9$ min, $n = 8$) and BthTX-I from *Bothrops jararacussu* ($t_{1/2} = 40.3 \pm 3.5$ min, $n = 6$), obtained at same experimental conditions, indicates that these toxins have similar potency (Cavalcante et al., 2007). In contrast, MjTX-II presents a more potent neuromuscular blockade when compared to MjTX-I from *B. moojeni*, since at 1.0 μ M this toxin depressed in only about 20% the twitches amplitude after 90 min of contact with the preparation (Salvador et al., 2013). Then, these results indicate MjTX-II has similar or superior neuromuscular blockade action compared to other Lys49-PLA₂s.

It has been suggested that *in vitro* neuromuscular blockade effect observed for Lys49-PLA₂s may be a consequence of their membrane depolarizing activity (Gallacci and Cavalcante, 2010). In order to clarify this issue, we

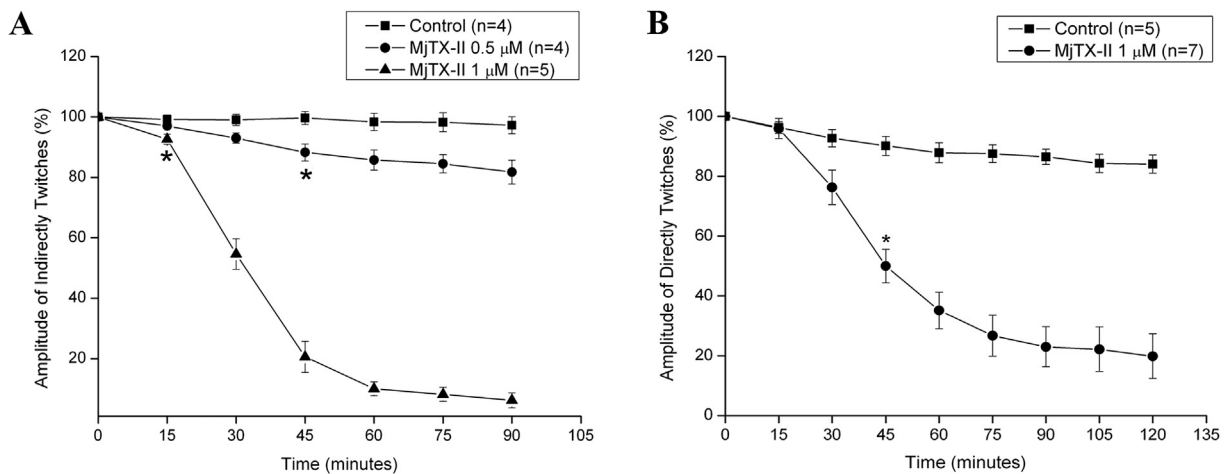


Fig. 5. Effect of MjTX-II on indirectly (A) and directly (B) evoked twitches in mice phrenic-diaphragm preparations. The ordinate represents the % amplitude of twitches relative to the initial amplitude. The abscissa indicates the time (min) after the addition of MjTX-II to the organ bath. Vertical bars represent the SEM, *indicates the point from which there are significant differences relative to control ($P < 0.05$).

performed an electrophysiological study to evaluate membrane depolarizing activity induced by MjTX-II. This technique measures the resting membrane potential of the sarcolemma and has been used as a more direct and sensitive method to assess the initial events in myotoxicity (Aragao et al., 2009). The results show a progressive increase in the resting membrane potential of skeletal muscle fibers from 15 min onwards (Fig. 6) and the increase of the frequency of miniature endplate potentials after 5 min (data not shown), probably as a consequence of the cell depolarization. Taken together, these results show a direct effect of MjTX-II increasing the permeability of the skeletal muscle fibers plasma membrane.

Although the Lys49-PLA₂ mechanism of action is not yet fully elucidated, several studies point the sarcolemma

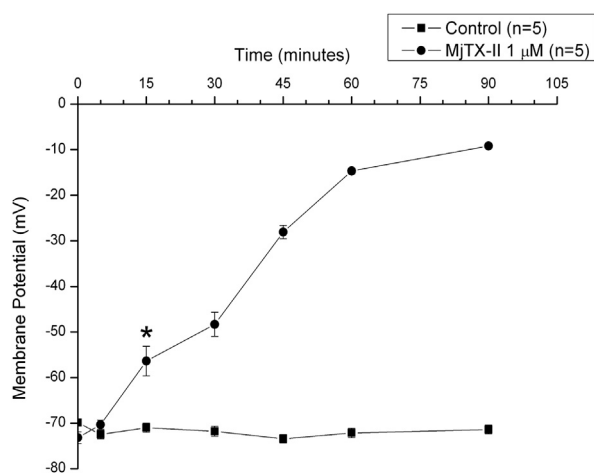


Fig. 6. The resting membrane potential of mice diaphragm muscle preparations under MjTX-II action. The ordinate represents the resting membrane potential (mV) and the abscissa indicates the time (min) after the addition of MjTX-II to the organ bath. The data were grouped as mean $\pm$ SEM ($P < 0.05$). *indicates the point from which there are significant differences relative to control ($P < 0.05$).

as the initial target of these myotoxins (Gutierrez and Lomonte, 1995; Lomonte et al., 2003; Lomonte and Rangel, 2012). A recent study suggests Arg118, together with Lys20 and Lys115, are the residues responsible for protein-membrane anchorage initial steps (dos Santos et al., 2009; dos Santos et al., 2011a). After the establishment of these electrostatic interactions, the protein undergoes a quaternary rearrangement that allows hydrophobic portions of membrane phospholipids to be inserted in the protein hydrophobic channels, therefore culminating with membrane destabilization (dos Santos et al., 2011a). The first consequence of this destabilization is the loss of ionic permeability regulation, leading to a reduction of the resting membrane potential, inactivation of sodium channels and blockade of both directly and indirectly evoked contractions (Gallacci and Cavalcante, 2010). In addition, the disruption of the muscle fiber membranes induced by Lys49-PLA₂ also promotes an increase of cytosolic calcium concentration, initiating a complex series of degenerative mechanisms that culminates with the muscle cell damage (Gutierrez and Ownby, 2003; Lomonte and Rangel, 2012; Montecucco et al., 2008).

4. Conclusions

In this article, we fully characterize functionally and structurally the Lys49-PLA₂ MjTX-II from *B. moojeni*. Despite the fact that this class of proteins has been extensively studied, several issues regarding the function-structure relationships are still need to be clarified, as highlighted by a recent review in this field (Lomonte and Rangel, 2012). This requirement is probably due to the high evolutionary pressure process by which snake venom molecules are submitted, since proteins with few natural amino acid mutations may present different oligomeric configurations, variable toxic potency or even different functions when compared to their ancestral toxins (Doley and Kini, 2009; dos Santos et al., 2011b; Kini, 1997, 2003). An interesting example is the MjTX-I, other myotoxic Lys49-PLA₂ from *B.*

moojeni that presents unusual oligomeric characteristics and displays lower myotoxic activity when compared to all other bothropic Lys49-PLA₂s that have already been structurally and functionally characterized (Andriao-Escarso et al., 2000; Salvador et al., 2013).

As demonstrated in this work, MjTX-II also presents some particularities if compared to other Lys49-PLA₂s which seem to influence the mode of ligand binding along the toxin hydrophobic channel, a feature that may directly affect the design of structure-based ligands for Lys49-PLA₂s.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) – Projeto NanoBiotec, Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal (BIONORTE/CNPq/MCT), Instituto Nacional para Pesquisa Translacional em Saúde e Ambiente na Região Amazônica (INCT-INPeTAM/CNPq/MCT) e Instituto Nacional para Pesquisa em Toxinas (INCT-Tox), Secretary of Development of Rondonia State (SEPLAN/PRONEX/CNPq).

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest with this work.

References

- Andriao-Escarso, S.H., Soares, A.M., Rodrigues, V.M., Angulo, Y., Diaz, C., Lomonte, B., Gutierrez, J.M., Giglio, J.R., 2000. Myotoxic phospholipases A₂ in *bothrops* snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothrotoxins from *Bothrops jararacussu*. *Biochimie* 82, 755–763.
- Aragao, E.A., Randazzo-Moura, P., Rostelato-Ferreira, S., Rodrigues-Simioni, L., Ward, R.J., 2009. Shared structural determinants for the calcium-independent liposome membrane permeabilization and sarcolemma depolarization in Bothrotoxin-I, a Lys49-PLA₂ from the venom of *Bothrops jararacussu*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 2588–2593.
- Arni, R.K., Fontes, M.R., Barberato, C., Gutierrez, J.M., Diaz, C., Ward, R.J., 1999. Crystal structure of myotoxin II, a monomeric Lys49-phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of *Cerrophidion (Bothrops) godmani*. *Arch. Biochem. Biophys.* 366, 177–182.
- Arni, R.K., Ward, R.J., 1996. Phospholipase A₂—a structural review. *Toxicon* 34, 827–841.
- Arni, R.K., Ward, R.J., Gutierrez, J.M., Tulinsky, A., 1995. Structure of a calcium-independent phospholipase-like myotoxic protein from *Bothrops asper* venom. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 51, 311–317.
- Borges, R.C., Araujo, A.F.B., 1998. Seleção de habitat em duas espécies de jararaca (*Bothrops moojeni* Hoge e *B. neuwiedi* Wagler) (Serpentes, Viperidae). *Revista Brasileira de Biologia* 58, 591–601.
- Brunker, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T., Warren, G.L., 1998. Crystallography & NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 54, 905–921.
- Cavalcante, W.L., Campos, T.O., Dal Pai-Silva, M., Pereira, P.S., Oliveira, C.Z., Soares, A.M., Gallacci, M., 2007. Neutralization of snake venom phospholipase A₂ toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. *J. Ethnopharmacol.* 112, 490–497.
- Chen, V.B., Arendall 3rd, W.B., Headd, J.J., Keedy, D.A., Immormino, R.M., Kapral, G.J., Murray, L.W., Richardson, J.S., Richardson, D.C., 2010. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 12–21.
- Correia-de-Sa, P., Noronha-Matos, J.B., Timoteo, M.A., Ferreirinha, F., Marques, P., Soares, A.M., Carvalho, C., Cavalcante, W.L., Gallacci, M., 2013. Bothrotoxin-I reduces evoked acetylcholine release from rat motor nerve terminals: radiochemical and real-time video-microscopy studies. *Toxicon* 61C, 16–25.
- da Silva Giotto, M.T., Garratt, R.C., Oliva, G., Mascarenhas, Y.P., Giglio, J.R., Cintra, A.C., de Azevedo Jr., W.F., Arni, R.K., Ward, R.J., 1998. Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: conformational changes in bothrotoxin I, a dimeric Lys49-phospholipase A₂ homologue. *Proteins* 30, 442–454.
- de Azevedo, W.F., Ward, R.J., Lombardi, F.R., Giglio, J.R., Soares, A.M., Fontes, M.R.M., Arni, R.K., 1997. Crystal Structure of Myotoxin-II: a myotoxic phospholipase A₂-homologue from *Bothrops moojeni* Venom. *Protein Pept. Lett.* 4, 329–334.
- Delano, W.S., 2002. The PyMOL Molecular Graphics System. Delano Scientific, San Carlos.
- Delatorre, P., Rocha, B.A., Santi-Gadelha, T., Gadelha, C.A., Toyama, M.H., Cavada, B.S., 2011. Crystal structure of Bn IV in complex with myristic acid: a Lys49 myotoxic phospholipase A₂ from *Bothrops neuwiedi* venom. *Biochimie* 93, 513–518.
- Doley, R., Kini, R.M., 2009. Protein complexes in snake venom. *Cell Mol. Life Sci.* 66, 2851–2871.
- dos Santos, J.L., Soares, A.M., Fontes, M.R., 2009. Comparative structural studies on Lys49-phospholipases A₂ from *Bothrops* genus reveal their myotoxic site. *J. Struct. Biol.* 167, 106–116.
- dos Santos, J.L., Cardoso, F.F., Soares, A.M., Dal Pai Silva, M., Gallacci, M., Fontes, M.R., 2011a. Structural and functional studies of a bothropic myotoxin complexed to rosmarinic acid: new insights into Lys49-PLA₂ inhibition. *PLoS One* 6, e28521.
- dos Santos, J.L., Cintra-Francischinelli, M., Borges, R.J., Fernandes, C.A., Pizzo, P., Cintra, A.C., Braz, A.S., Soares, A.M., Fontes, M.R., 2011b. Structural, functional, and bioinformatics studies reveal a new snake venom homologue phospholipase A₂ class. *Proteins* 79, 61–78.
- Ducruix, A., Giegé, R., 1992. Crystallization of Nucleic Acids and Proteins: a Practical Approach. Oxford University Press, New York.
- Emsley, P., Cowtan, K., 2004. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 60, 2126–2132.
- Fatt, P., Katz, B., 1951. An analysis of the end-plate potential recorded with an intracellular electrode. *J. Physiol.* 115, 320–370.
- Fernandes, C.A., Marchi-Salvador, D.P., Salvador, G.M., Silva, M.C., Costa, T.R., Soares, A.M., Fontes, M.R., 2010. Comparison between apo and complexed structures of bothrotoxin-I reveals the role of Lys122 and Ca²⁺-binding loop region for the catalytically inactive Lys49-PLA₂s. *J. Struct. Biol.* 171, 1–31.
- Gallacci, M., Cavalcante, W.L., 2010. Understanding the in vitro neuromuscular activity of snake venom Lys49 phospholipase A₂ homologues. *Toxicon* 55, 1–11.
- Gallacci, M., Oliveira, M., Dal Pai-Silva, M., Cavalcante, W.L., Spencer, P.J., 2006. Paralyzing and myotoxic effects of a recombinant bothrotoxin-I (BthTX-I) on mouse neuromuscular preparations. *Exp. Toxicol. Pathol.* 57, 239–245.
- Gutierrez, J.M., Chaves, F., 1980. Proteolytic, hemorrhagic and myonecrotic effects of the venoms of Costa Rican snakes from the genera *Bothrops*, *Crotalus* and *Lachesis* (author's transl). *Toxicon* 18, 315–321.
- Gutierrez, J.M., Lomonte, B., 1995. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* 33, 1405–1424.
- Gutierrez, J.M., Ownby, C.L., 2003. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon* 42, 915–931.
- Gutierrez, J.M., Theakston, R.D., Warrell, D.A., 2006. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. *Plos Med.* 3, e150.
- Harrison, R.A., Hargreaves, A., Wagstaff, S.C., Faragher, B., Laloo, D.G., 2009. Snake envenoming: a disease of poverty. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3, e569.
- Homs-Brandeburgo, M.I., Queiroz, L.S., Santo-Neto, H., Rodrigues-Simioni, L., Giglio, J.R., 1988. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothrotoxin. *Toxicon* 26, 615–627.
- Kasturiratne, A., Wickremasinghe, A.R., de Silva, N., Gunawardena, N.K., Pathmeswaran, A., Premaratna, R., Savioli, L., Laloo, D.G., de Silva, H.J., 2008. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *Plos Med.* 5, 1591–1604.
- Kini, R.M., 1997. Phospholipase A₂ Enzyme: Structure, Function and Mechanism. Wiley, Chichester.
- Kini, R.M., 2003. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. *Toxicon* 42, 827–840.
- Krissinel, E., Henrick, K., 2007. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.* 372, 774–797.
- Lee, W.H., da Silva Giotto, M.T., Marangoni, S., Toyama, M.H., Polikarpov, I., Garratt, R.C., 2001. Structural basis for low catalytic activity in Lys49

- phospholipases A₂-a hypothesis: the crystal structure of piratoxin II complexed to fatty acid. *Biochemistry-US* 40, 28–36.
- Lomonte, B., Angulo, Y., Calderon, L., 2003. An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon* 42, 885–901.
- Lomonte, B., Gutierrez, J.M., Furtado, M.F., Otero, R., Rosso, J.P., Vargas, O., Carmona, E., Rovira, M.E., 1990. Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. *Toxicon* 28, 1137–1146.
- Lomonte, B., Rangel, J., 2012. Snake venom Lys49 myotoxins: from phospholipases A₂ to non-enzymatic membrane disruptors. *Toxicon* 60, 520–530.
- Magro, A.J., Soares, A.M., Giglio, J.R., Fontes, M.R., 2003. Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A₂: quaternary structure and inhibition mechanism insights. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311, 713–720.
- Marchi-Salvador, D.P., Fernandes, C.A., Silveira, L.B., Soares, A.M., Fontes, M.R., 2009. Crystal structure of a phospholipase A₂ homolog complexed with *p*-bromophenacyl bromide reveals important structural changes associated with the inhibition of myotoxic activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1794, 1583–1590.
- Mebs, D., Ehrenfeld, M., Samejima, Y., 1983. Local necrotizing effect of snake venoms on skin and muscle: relationship to serum creatine kinase. *Toxicon* 21, 393–404.
- Melgarejo, A.R., 2003. Serpentes Peçonhentos no Brasil, Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. Sarvier, São Paulo, pp. 33–61.
- Montecucco, C., Gutierrez, J.M., Lomonte, B., 2008. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A₂ myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. *Cell Mol. Life Sci.* 65, 2897–2912.
- Murakami, M.T., Arruda, E.Z., Melo, P.A., Martinez, A.B., Calil-Elias, S., Tomaz, M.A., Lomonte, B., Gutierrez, J.M., Arni, R.K., 2005. Inhibition of myotoxic activity of *Bothrops asper* myotoxin II by the anti-trypanosomal drug suramin. *J. Mol. Biol.* 350, 416–426.
- Murakami, M.T., Vicoti, M.M., Abrego, J.R., Lourenzoni, M.R., Cintra, A.C., Arruda, E.Z., Tomaz, M.A., Melo, P.A., Arni, R.K., 2007. Interfacial surface charge and free accessibility to the PLA₂-active site-like region are essential requirements for the activity of Lys49 PLA₂ homologues. *Toxicon* 49, 378–387.
- Otwinowski, Z., Minor, W., 1997. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Macromol. Crystallogr. Pt A* 276, 307–326.
- Potterton, L., McNicholas, S., Krissinel, E., Gruber, J., Cowtan, K., Emsley, P., Murshudov, G.N., Cohen, S., Perrakis, A., Noble, M., 2004. Developments in the CCP4 molecular-graphics project. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 60, 2288–2294.
- Queiroz, L.S., Petta, C.A., 1984. Histopathological changes caused by venom of urutu snake (*Bothrops alternatus*) in mouse skeletal muscle. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 26, 247–253.
- Randazzo-Moura, P., Ponce-Soto, L.A., Rodrigues-Simioni, L., Marangoni, S., 2008. Structural characterization and neuromuscular activity of a new Lys49 phospholipase A₂ homologous (Bp-12) isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Protein J.* 27, 355–362.
- Rodrigues-Simioni, L., Prado-Franceschi, J., Cintra, A.C., Giglio, J.R., Jiang, M.S., Fletcher, J.E., 1995. No role for enzymatic activity or dantrolene-sensitive Ca²⁺ stores in the muscular effects of bothropstoxin, a Lys49 phospholipase A₂ myotoxin. *Toxicon* 33, 1479–1489.
- Rosenfeld, G., Kelen, E.M., 1971. Measurement of the coagulation activity of snake venoms: importance to scientific research and therapeutic application. *Rev. Paul. Med.* 77, 149–150.
- Russell, F.E., 1991. Venomous arthropods. *Vet. Hum. Toxicol.* 33, 505–508.
- Salvador, G.H.M., Fernandes, C.A.H., Magro, A.J., Marchi-Salvador, D.P., Cavalcante, W.L.G., Fernandez, R.M., Gallacci, M., Soares, A.M., Oliveira, C.L.P., Fontes, M.R.M., 2013. Structural and phylogenetic studies with MjTX-i reveal a multi-oligomeric toxin – a novel feature in Lys49-PLA₂s protein class. *PLoS One* 8, e60610.
- Saúde, F.N.d., 2001. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. MS/FUNASA, Brasília.
- Soares, A.M., Andraio-Escarso, S.H., Angulo, Y., Lomonte, B., Gutierrez, J.M., Marangoni, S., Toyama, M.H., Arni, R.K., Giglio, J.R., 2000. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops moojeni* (Caissaca) snake venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 373, 7–15.
- Soares, A.M., Andraio-Escarso, S.H., Bortolotto, R.K., Rodrigues-Simioni, L., Arni, R.K., Ward, R.J., Gutierrez, J.M., Giglio, J.R., 2001. Dissociation of enzymatic and pharmacological properties of piratoxins-I and -III, two myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops pirajai* snake venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 387, 188–196.
- Stabeli, R.G., Amui, S.F., Sant'Ana, C.D., Pires, M.G., Nomizo, A., Monteiro, M.C., Romão, P.R., Guerra-Sa, R., Vieira, C.A., Giglio, J.R., Fontes, M.R., Soares, A.M., 2006. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A₂ homologue: an example of function versatility of snake venom proteins. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 142, 371–381.
- Vagin, A., Teplyakov, A., 1997. MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Crystallogr.* 30, 1022–1025.
- Wallace, A.C., Laskowski, R.A., Thornton, J.M., 1995. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng.* 8, 127–134.
- Ward, R.J., Chioato, L., de Oliveira, A.H., Ruller, R., Sa, J.M., 2002. Active-site mutagenesis of a Lys49-phospholipase A₂: biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis. *Biochem. J.* 362, 89–96.
- Watanabe, L., Soares, A.M., Ward, R.J., Fontes, M.R., Arni, R.K., 2005. Structural insights for fatty acid binding in a Lys49-phospholipase A₂: crystal structure of myotoxin II from *Bothrops moojeni* complexed with stearic acid. *Biochimie* 87, 161–167.
- Williams, D., Gutierrez, J.M., Harrison, R., Warrell, D.A., White, J., Winkel, K.D., Gopalakrishnakone, P., 2010. The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. *Lancet* 375, 89–91.



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

Guilherme H. M. Salvador, Thiago R. Dreyer, Walter L. G. Cavalcante, Fábio F. Matioli, Juliana I. dos Santos, Adrian Velazquez-Campoy, Márcia Gallacci and Marcos R. M. Fontes

Acta Cryst. (2015). **D71**, 2066–2078



IUCr Journals
CRYSTALLOGRAPHY JOURNALS ONLINE

Copyright © International Union of Crystallography

Author(s) of this paper may load this reprint on their own web site or institutional repository provided that this cover page is retained. Republication of this article or its storage in electronic databases other than as specified above is not permitted without prior permission in writing from the IUCr.

For further information see <http://journals.iucr.org/services/authorrights.html>

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

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

Received 6 May 2015

Accepted 31 July 2015

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

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

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

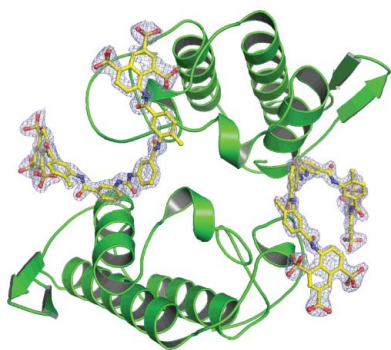
Supporting information: this article has supporting information at journals.iucr.org/d

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

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

1. Introduction

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



© 2015 International Union of Crystallography

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

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

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

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

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

2. Experimental procedures

2.1. Toxin isolation and suramin

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

2.2. Dynamic light scattering

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

2.3. Isothermal titration calorimetry

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

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

2.4. Functional studies

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

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

2.5. Crystallization and X-ray data collection

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

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

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

2.6. Structure determination and refinement

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

2.7. Comparative analysis

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

2.8. Molecular-dynamics simulations

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

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

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

3. Results

3.1. *In vitro* myotoxicity

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

3.2. Dynamic light scattering

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

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

3.3. Interaction between MjTX-II and suramin

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

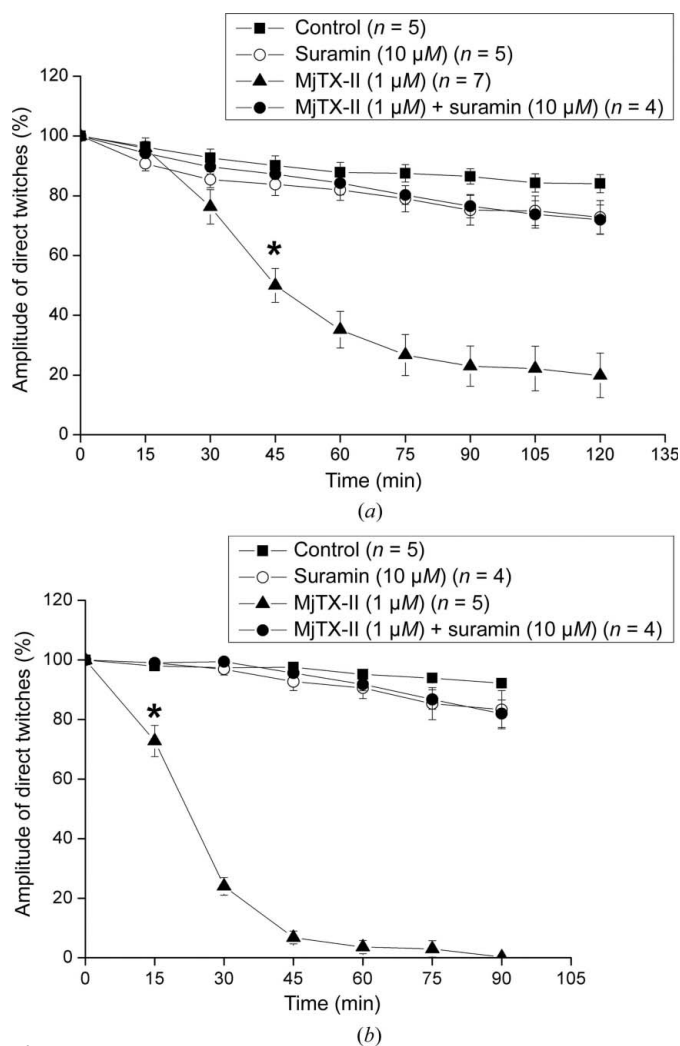


Figure 1
Effects of MjTX-II and the product of its pre-incubation with suramin on (a) directly and (b) indirectly evoked twitches in mouse phrenic diaphragm preparations. The ordinate represents the percentage of twitches relative to the initial amplitude. The abscissa indicates the time (in minutes)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

Table 1

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

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

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

Table 2

X-ray data-collection and refinement statistics.

Values in parentheses are for the highest resolution shell.

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

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

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

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

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

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

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

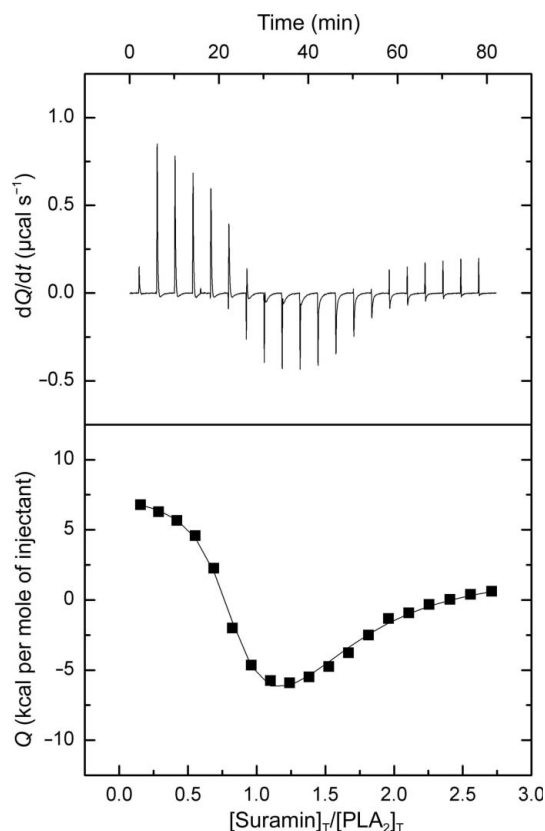


Figure 2

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

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

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

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

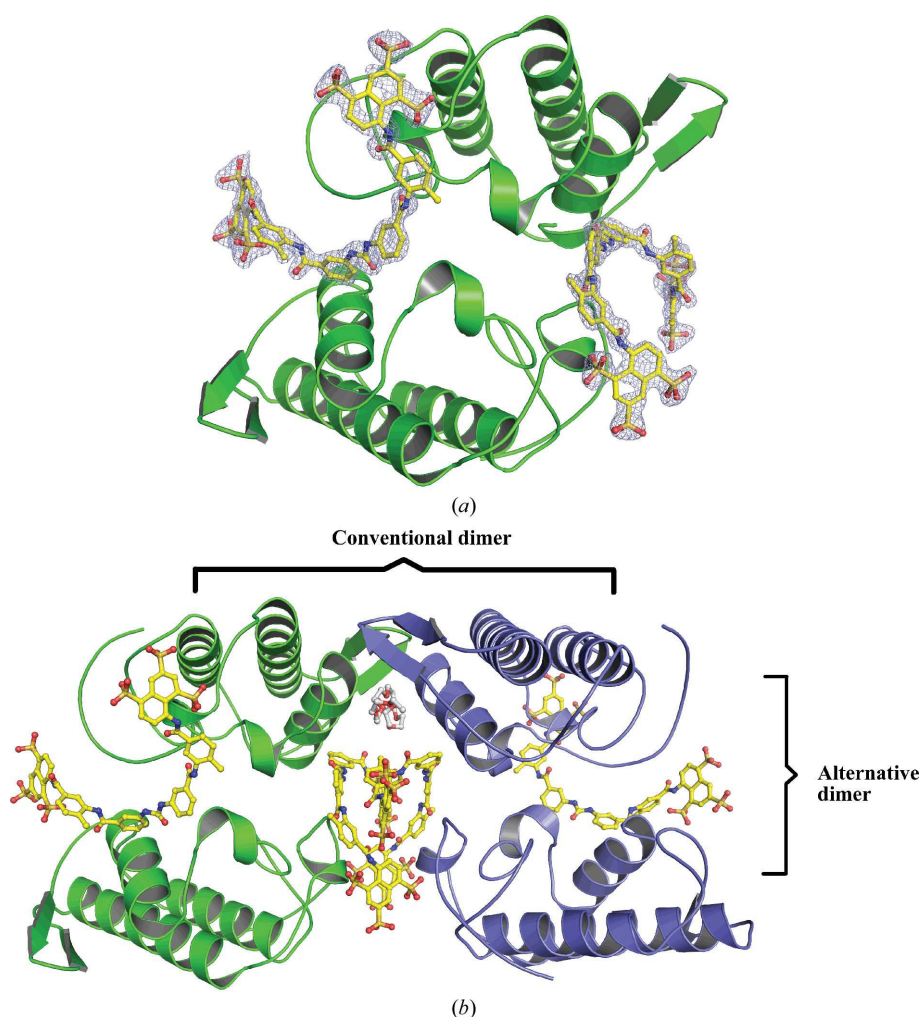


Figure 3
Crystal structure of the MjTX-II–suramin complex. (a) The overall structure of the MjTX-II–suramin complex is depicted as a ribbon diagram. Suramin molecules (yellow) are illustrated as stick representations. The electron-density map (coefficients $|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$) of the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

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

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

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

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

3.6. Comparison between PLA₂-like toxins complexed with suramin

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

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

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

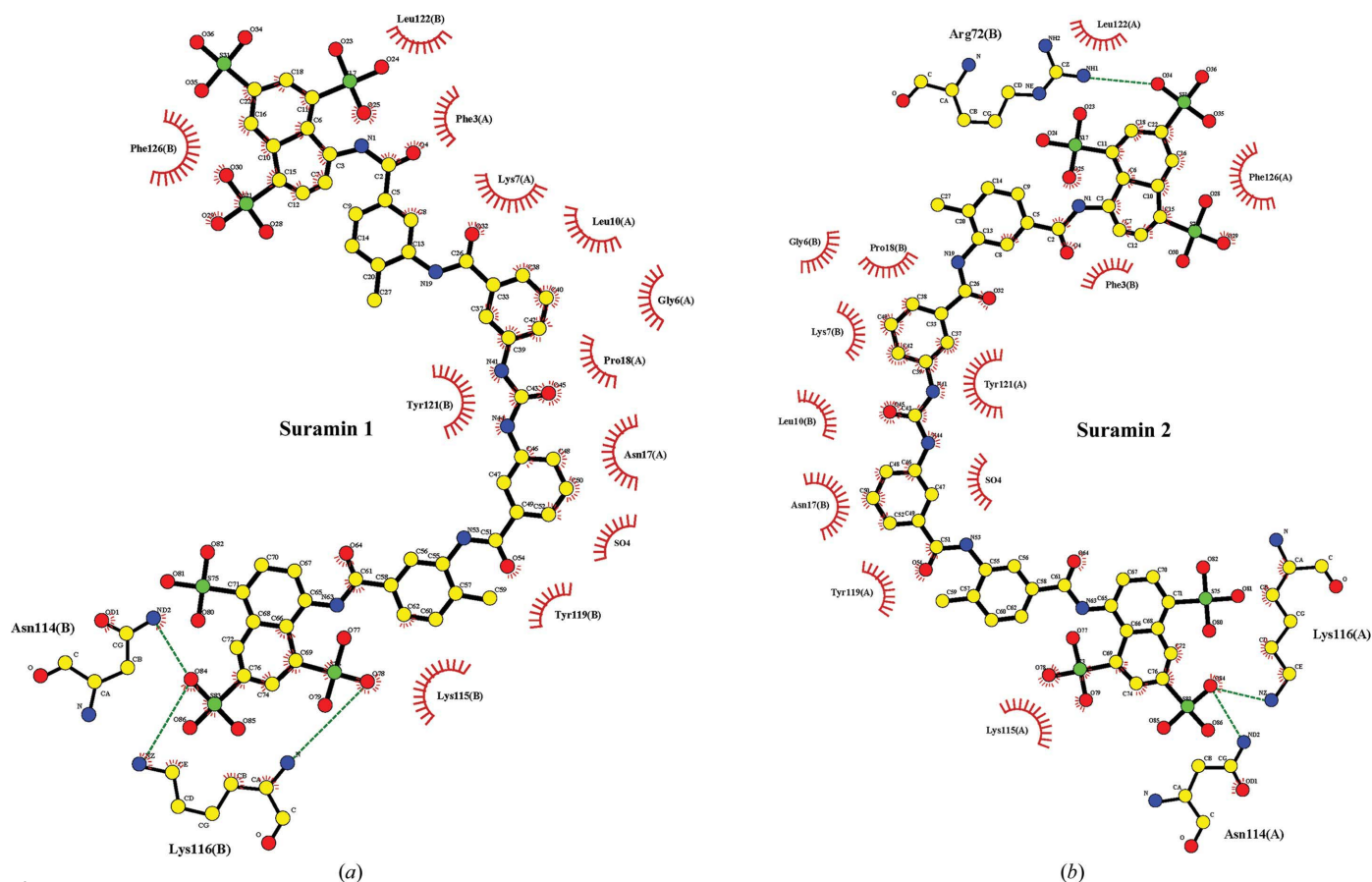


Figure 4

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

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

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

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

3.7. Molecular-dynamics studies

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

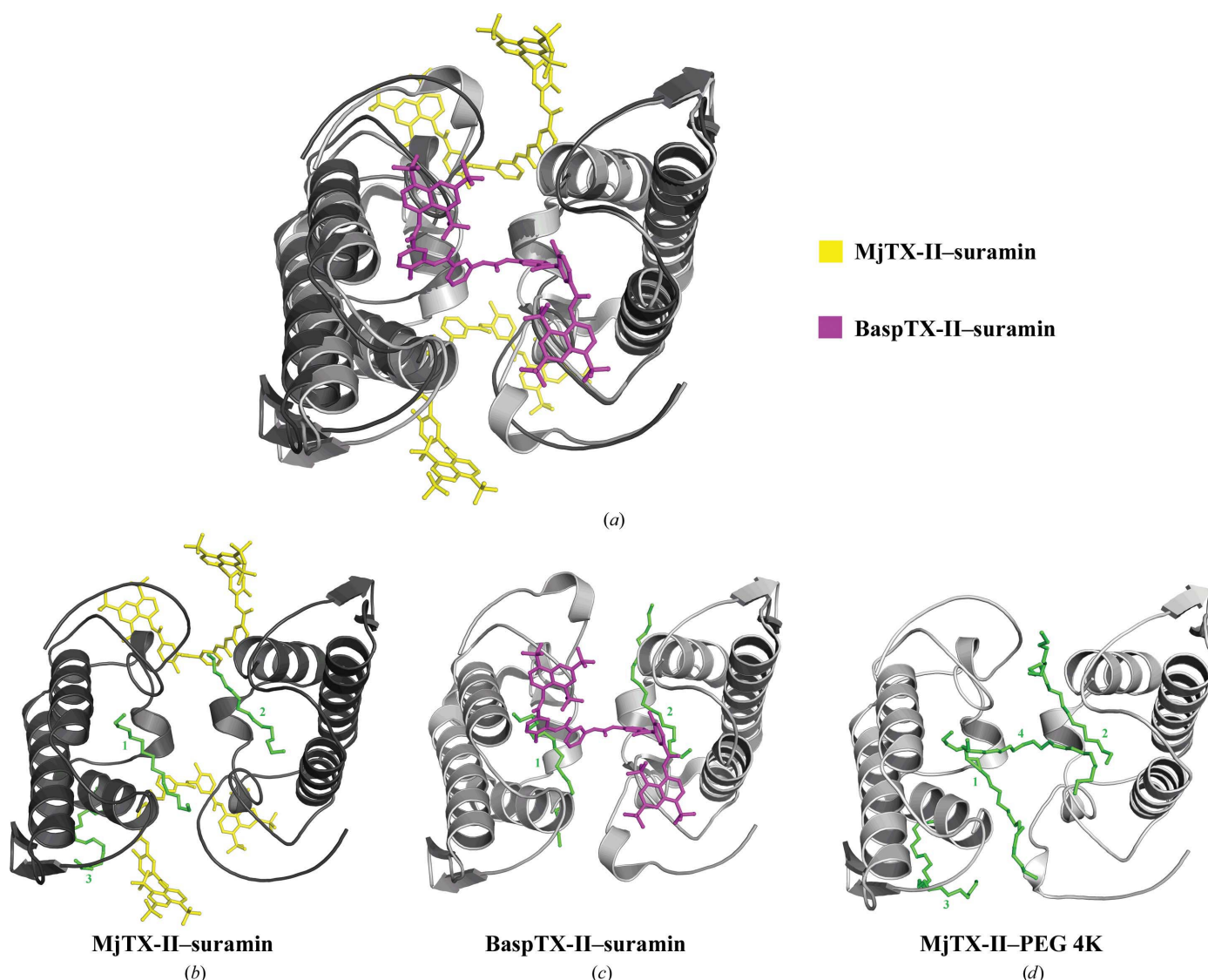


Figure 5

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

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

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

4. Discussion

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

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

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

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

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

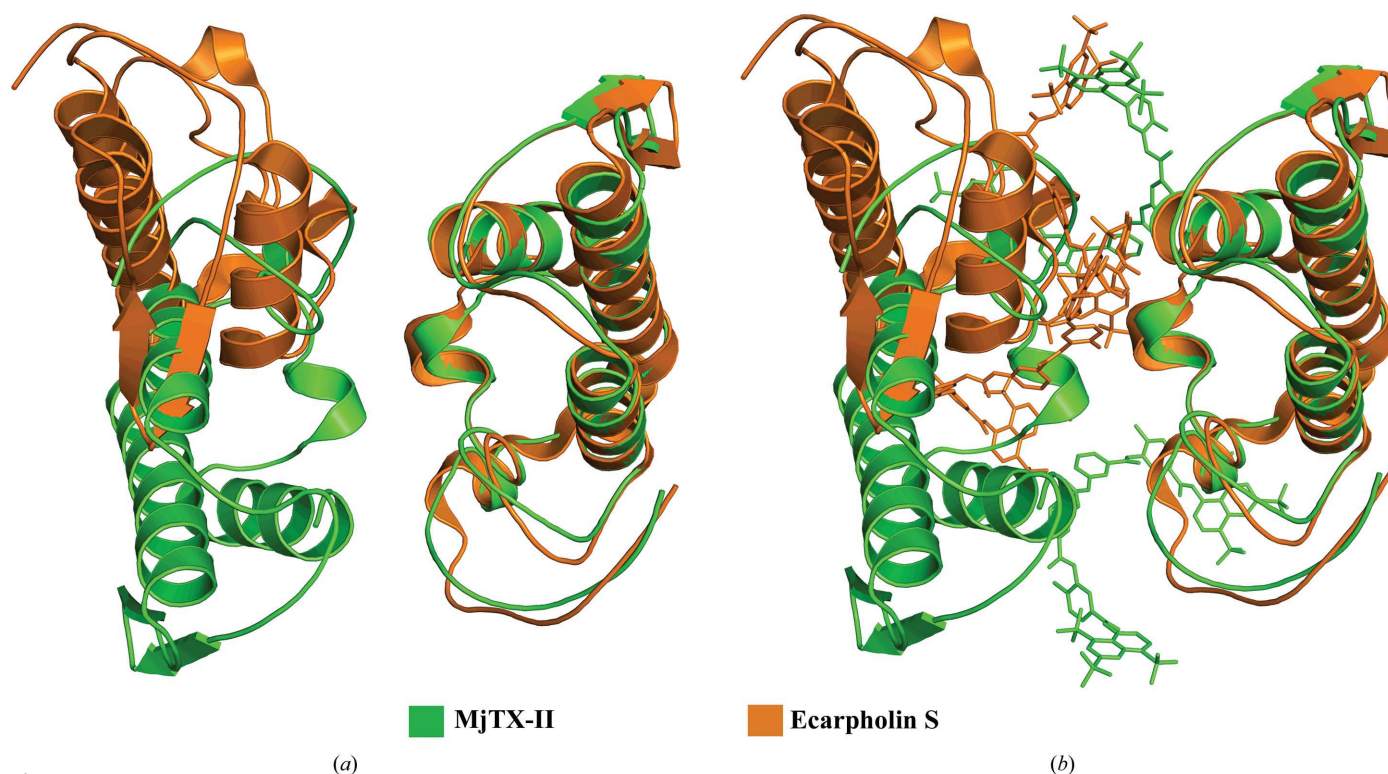


Figure 6

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

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

4.2. Oligomerization of the MjTX-II–suramin complex

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

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

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

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

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

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

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

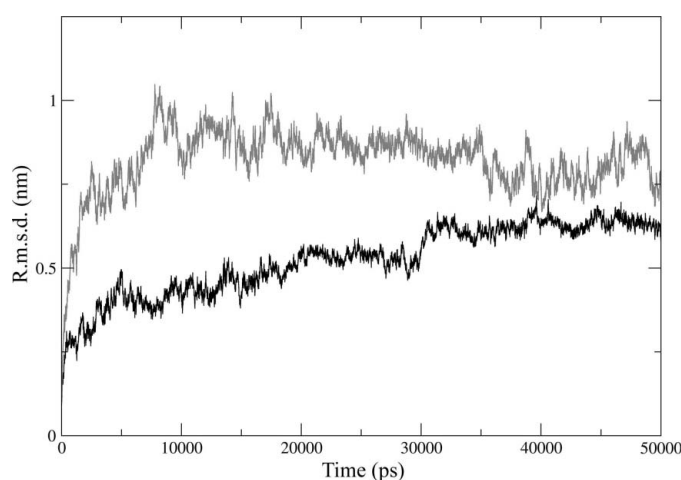


Figure 7
Average backbone r.m.s.d. during 50 ns molecular-dynamic simulations of the tetrameric assembly of MjTX-II with (black) and without (grey) suramin ligands. The simulations demonstrated that the bound assembly (in black) presents a lower average r.m.s.d. value and a lower level of r.m.s.d. fluctuations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

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

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

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

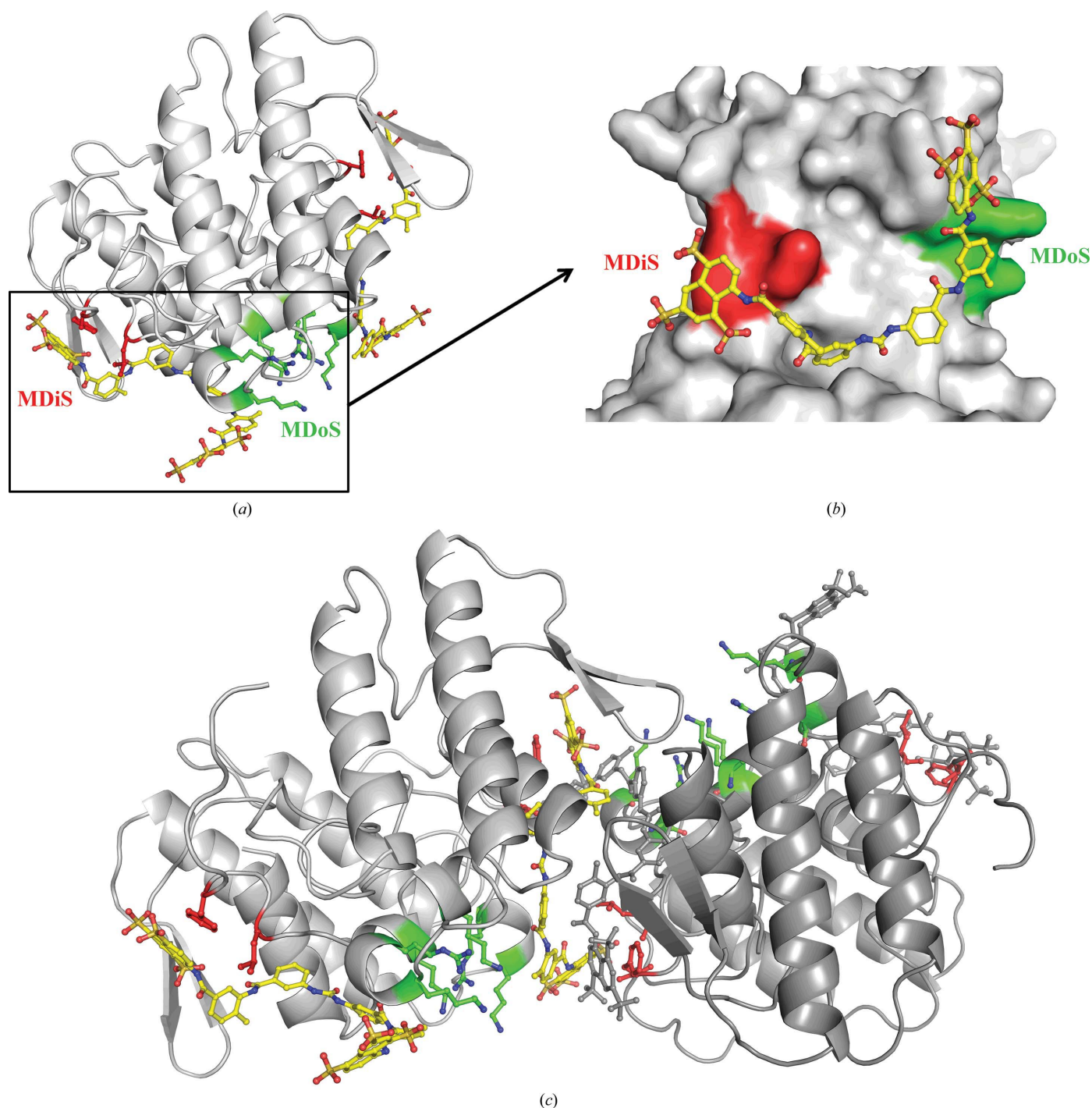


Figure 8
MDoS (cationic membrane-docking site) and MDiS (hydrophobic membrane-disruption site) in the MjTX-II–suramin structure, highlighting the interaction between the inhibitor and these sites. (a) Cartoon representation of the asymmetric unit of the crystal structure of the MjTX-II–suramin complex with the inhibitor interacting with MDoS (residues in green) and MDiS (residues in red). Suramin and the MDoS and MDiS residues are shown in ball-and-stick representation. (b) Detailed view of the interaction between a suramin molecule and a monomer of MjTX-II, highlighting the MDiS (red) and MDoS (green) regions. The protein is represented as a surface and the suramin ligand is shown in ball-and-stick representation. (c) Tetrameric conformation of the MjTX-II–suramin complex with the inhibitor interacting with the MDiS (red) and MDoS (green) regions.

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

4.4. Inhibitory mechanism of PLA₂-like toxins

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

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

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

5. Conclusions

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

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

Acknowledgements

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

References

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

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