

Estudos estruturais com a BnSP-7 nativa e recombinante: uma fosfolipase A₂ homóloga do veneno de *Bothrops pauloensis*

Lino Fernando Gomes de Lima

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

Prof. Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Estudos estruturais com a BnSP-7 nativa e recombinante: uma
fosfolipase A₂ homóloga do veneno de *Bothrops pauloensis*

Lino Fernando Gomes de Lima

Orientador: Prof. Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes

Co orientador: Dr. Carlos Alexandre Henrique Fernandes

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

**BOTUCATU – SP
2017**

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

Lima, Lino Fernando Gomes de.

Estudos estruturais com a BnSP-7 nativa e recombinante
: uma fosfolipase A2 homóloga do veneno de *Bothrops pauloensis* /

Lino Fernando Gomes de Lima. - Botucatu, 2017

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

Orientador: Marcos Roberto de Mattos Fontes

Coorientador: Carlos Alexandre Henrique Fernandes

Capes: 20901003

1. *Bothrops*. 2. Cobra venenosa - Veneno. 3. Raios X -
Difração. 4. Fosfolipases. 5. Espectroscopia de
fluorescência. 6. Cristalização.

Palavras-chave: BnSP-7; *Bothrops pauloensis*;

Dedicatória

Dedico não só esse trabalho, mas tudo o que tenho e o que sou a Deus e as suas boas obras, agradeço pela dádiva de um novo folego de vida a cada manhã e a força para perseverar. Fico tranquilo em qualquer situação por saber que posso *“lançar sobre Ele toda a ansiedade, porque Ele tem cuidado de nós.”* (I Pe 5:7)

...

Aos meus pais, Marcio e Madalena, que tem por mim um amor genuíno independente do que eu faça ou de quem eu seja. Vocês sempre terão minha gratidão e sempre terão parte fundamental nas minhas conquistas. Obrigado por me dar suporte, por me suportar nos piores dias, por se alegrar comigo nos momentos de alegria. Tenham a certeza que vocês são a essência do meu crescimento pessoal e profissional.

...

A minha amada esposa Jayça Marim. Você que me conhece como ninguém e esteve ao meu lado em mais essa etapa da minha vida, compartilhando comigo não só os momentos felizes, mas as minhas aflições, medos, angustias, sempre com palavras e ações recheadas de amor, afeto e conforto. Você me ensinou a ver a vida com seus olhos de positividade e determinação, a ver a vida de uma forma mais leve, mais bonita, ver que podemos sonhar e batalhar para que esses sonhos se tornem reais e, sem isso, eu não conseguiria ter alcançado mais essa etapa na minha vida. Sei que juntos vamos mais longe.

...

A todos aqueles que de alguma maneira, mais ou menos aparente, porém fundamental, contribuíram para que eu pudesse chegar a esse momento, encerrando esse ciclo e alcançando mais essa etapa na vida. A todos vocês dedico esse trabalho.

Agradecimentos

Não poderia deixar de agradecer à Prof. Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes, primeiramente por ter aceitado um, até então, aluno desconhecido de uma colaboradora de Minas Gerais. Ter sido aceito como parte do seu grupo de pesquisa, possibilitou mudanças na minha vida que vão além do âmbito profissional. Agradeço também pela orientação durante esses anos com dedicação, devoção e paciência. Foram suas contribuições intelectuais, profissionais e pessoais que tornaram esse trabalho possível desde o começo. Parafraseando *Sir Isaac Newton* “*Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro dos gigantes.*” Me exemplo no seu modelo de pessoa e de profissional. Obrigado.

...

Ao Dr. Carlos Alexandre Henrique Fernandes, o Pituta. Sua ajuda, sempre presente, cooperação e comprometimento com esse trabalho foram fundamentais para que este fosse realizado. Obrigado pelo apoio, pela perspicácia que fez encontrar soluções em aparentes “becos sem saída” e pelas muitas horas de esforço e dedicação empregadas nesse trabalho.

...

Ao Dr. Rafael Borges pela valiosa contribuição com as análises computacionais das cavidades e túneis, pelas sugestões e apoio.

...

A MsC Maria Alejandra pela contribuição com os experimentos de *Microscale Thermophoresis* e a Prof. Dra. Maria Isabel e o Laboratório de Telômeros pelo suporte nos experimentos de clonagem e expressão em *Pichia pastoris*.

...

Aos meus colegas do Laboratório de Biologia Molecular Estrutural: Guilherme, Natália, Andrea, Fábio, Antoniel, Thiago e aos ICs por direta ou indiretamente, com as discussões científicas (ou nem tanto!) e companhia, colaborarem para a realização desse trabalho.

...

Ao LNLS (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron) pelo apoio de suas instalações técnicas para coleta de dados de difração de raios X

...

Ao Prof. Dr. Roberto Morato Fernandez (Depto de Física e Biofísica – IBB-UNESP) pelo apoio e colaboração nos experimentos espectroscopia de fluorescência.

...

Ao Prof. Dr. Rafael Guido e Dra. Andressa P. A. Pinto (IFSC – USP) pelo uso do equipamento
Microscale Thermophoresis e pelo apoio.

...

Ao apoio financeiro do CNPq (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais) e
administrativo do programa de pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada e da UNESP).

“A dúvida é o princípio da sabedoria. ”

- Aristóteles

Sumário

RESUMO	17
ABSTRACT	19
CAPÍTULO 1:	21
1.1. Envenenamento ofídico e fosfolipases A ₂ , importantes componentes proteicos encontrados em venenos botrópicos	22
1.2. Inibidores de PLA ₂ like	29
1.3. Clonagem e expressão de toxinas de peçonhas de serpentes.....	32
1.4. Objetivos	34
1.4.1. Objetivo geral	34
1.4.2. Objetivos específicos.....	35
CAPÍTULO 2:	36
2.1. Purificação das amostras e obtenção dos ligantes	37
2.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (SDS-PAGE).....	38
2.3. Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)	38
2.4. Espectroscopia UV-visível e de fluorescência	39
2.5. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	40
2.6. Termoforese em microescala (MST).....	40
2.7. Cristalização, coleta e processamento de dados de raios-X	41
2.8. Determinação da estrutura e refinamento.....	42
2.9. Comparação e caracterização do canal hidrofóbico e dos túneis por análises de bioinformática	43
2.10. Clonagem, expressão e purificação da BnSP-7 recombinante (rBnSP-7).....	44
2.10.1. Eletroforese em gel de agarose.....	44
2.10.2. Obtenção do vetor para expressão da rBnSP-7 em <i>Pichia pastoris</i>	44
2.10.3. Preparo de bactérias (DH5α) competentes para choque térmico com CaCl ₂	45
2.10.4. Transformação de células de <i>Escherichia coli</i> (DH5α)	45
2.10.5. Preparação do DNA plasmidial por lise alcalina (<i>Miniprep</i>)	46

2.10.6. Linearização do plasmídeo pPicZ α A-BnSP7 com enzima de restrição <i>PmeI</i>	47
2.10.7. Preparo das células competentes de <i>P. pastoris</i>	47
2.10.8. Transformação das células competentes de <i>P. pastoris</i> por eletroporação	48
2.10.9. Triagem em pequena escala da expressão heteróloga em <i>P. pastoris</i>	48
2.10.10. Indução em larga escala.....	49
2.10.11. Isolamento da fosfolipase recombinante BnSP-7: Purificação de proteínas produzidas em <i>P. pastoris</i>	50
CAPÍTULO 3:	51
3.1 Resultados	52
3.1.1. Purificação da BnSP-7.....	52
3.1.2. Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)	54
3.1.3. Espectroscopia UV-visível e de fluorescência	55
3.1.4. Termoforese em microescala (MST).....	57
3.1.5. Co-cristalização e estruturas cristalográficas dos complexos BnSP-7/CaA, BnSP-7/CiA e BnSP-7/CuA.....	58
3.1.6. Comparação e caracterização do canal hidrofóbico e dos tuneis	69
3.2. Discussão.....	72
3.2.1. Visão geral das estruturas cristalográficas e ensaios estruturais em solução: comparação estrutural.....	72
3.2.2. Relação entre a interação dos ligantes e os sítios MDiS e MDoS	76
3.2.3. Diferenças estruturais: análise da conformação oligomérica, dos túneis e canal hidrofóbico em diferentes estruturas cristalográficas	80
3.2.4. Relação das diferenças estruturais com as diferenças na ação miotóxica	84
CAPÍTULO 4:	88
4.1 Resultados	89
4.1.1. Clonagem do vetor pPicZ α A-BnSP7 em <i>E. coli</i> DH5 α competentes.....	89
4.1.2. Linearização do vetor pPicZ α A-BnSP7	90
4.1.3. Transformação em <i>P. pastoris</i> KM71H	90
4.1.4. Triagem em pequena escala da expressão heteróloga em <i>P. pastoris</i> e expressão da proteína recombinante em larga escala.....	91

4.1.5. Purificação de proteínas produzidas em <i>P. pastoris</i> por filtração em gel	92
4.1.6. Experimentos de cristalização da fosfolipase A ₂ BnSP-7 recombinante	93
4.2. Discussão.....	94
CAPÍTULO 5:	99
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
ANEXOS.....	114

Lista de figuras

CAPÍTULO 1

Figura 1. Reação de catálise por PLA ₂	23
Figura 2. Estrutura monomérica da PLA ₂ BnSP7.....	25
Figura 3. Sobreposição das estruturas cristalográficas das proteínas miotoxina II de <i>B. asper</i> (em vermelho) e bothopstoxina I de <i>B. jararacussu</i> (em azul). (A) estrutura dimérica “aberta” e (B) estrutura dimérica “fechada”.....	26
Figura 4. Sobreposição das estruturas cristalográficas de Lys49-PLA ₂ s nas conformações de dímero alternativo (verde) e dímero convencional (roxo). ”.....	27
Figura 5. Mecanismo miotóxico de Lys49-PLA ₂ s.	28
Figura 6. Representação molecular do ácido cafeico, ácido cinâmico e ácido <i>p</i> -cumárico.	31

CAPÍTULO 2

Figura 7. Representação esquemática do vetor pPicZαA e detalhe da sequência de nucleotídeos do plasmídeo recombinante clonado pPicZαA-BnSP7.	44
Figura 8. Placa dos transformantes em DH5α.	46

CAPÍTULO 3

Figura 9. Purificação da BnSP-7 a partir do veneno bruto de <i>B. pauloensis</i> em protocolo de cromatográfica em duas etapas.....	53
Figura 10. Função de autocorreção e o ajuste de regularização (erro do ajuste mostrado no inserto) baseada no algoritmo CONTIN das medidas de espalhamento dinâmico de luz da BnSP-7 a 291 K.....	55
Figura 11. Espectroscopia de fluorescência e ultravioleta dos derivados de ácido cinâmico e BnSP-7.	56
Figura 12. Medidas de termoforese (MST) da afinidade de ligação entre a BnSP-7 e os ligantes.	57
Figura 13. Cristais da BnSP-7 nativa isolada do veneno de <i>Bothrops pauloensis</i> na forma nativa e complexada com ligantes.....	59
Figura 14. Representação em <i>cartoon</i> das estruturas diméricas de (A) BnSP-7 nativa; (B) BnSP-7 co-cristalizada com ácido cafeico (BnSP7/CaA), (C) BnSP-7 co-cristalizada com ácido cinâmico (BnSP-7/CiA) e (D) BnSP-7 co-cristalizada com	

ácido <i>p</i> -cumárico (BnSP-7/CuA)	62
Figura 15. Sobreposição de Ca do (A) monomero A e (B) monomero B da BnSP-7 nativa, BnSP-7/CaA, BnSP-7/CiA e BnSP-7/CuA.	63
Figura 16. Sobreposição de Ca dos dímeros das estruturas de (A) BnSP-7 / CaA (violeta), BnSP-7 / CiA (roxo) e BnSP-7 / CuA (ciano); (B) BnSP-7 nativa (verde) e apo-BnSP-7 (vermelho).	65
Figura 17. Contatos hidrofóbicos entre (A) ácido cafeico (CaA); (B) ácido cinâmico (CiA) e (C) ácido <i>p</i> -cumárico (CuA) com a BnSP-7, observado nas estruturas cristalográficas.....	67
Figura 18. Superfície de potencial eletrostático das estruturas cristalográficas da (A) BnSP-7/CaA, (B) BnSP-7/CiA e (C) BnSP-7/CuA.....	68
Figura 19. Sobreposição das estruturas BnSP-7, BnSP-7 / CaA, BnSP-7 / CiA e BnSP-7 / CuA na região MDoS.	73
Figura 20: Sobreposição das estruturas diméricas de PrTX-I (violeta) e BnSP-7 (verde) complexadas com ácido cafeico, detalhando os resíduos (Leu121 e Phe125) que compõem o MDiS de ambas as estruturas.	86

CAPÍTULO 4

Figura 21. (A) Eletroforese da lise alcalina das células de <i>E. coli</i> DH5 α competentes, colônias numeradas de 9 a 14, contendo o vetor <i>pPicZαA-BnSP7</i> em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. (B) Eletroforese da linearização com <i>PmeI</i> do vetor <i>pPicZαA-BnSP7</i> em gel de agarose 1%, mostrando bandas referentes ao material intacto (int.) e linearizado (lin.), corado com brometo de etídeo.	89
Figura 22. Placa dos transformantes em KM71H contendo 100 μ g/ μ L de zeocina.	90
Figura 23. Gel de poliacrilamida a 13%, corado com nitrato de prata referente a triagem em pequena escala da expressão heteróloga em <i>P. pastoris</i> e expressão da proteína recombinante em larga escala.....	91
Figura 24. Purificação da BnSP-7 recombinante.....	92
Figura 25. Cristais da BnSP-7 recombinante, induzido em sistema de expressão em <i>Pichia pastoris</i>	93

Lista de tabelas

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Dados de difração de raios-X e estatísticas de refinamento das estruturas cristalográficas.	60
Tabela 2: Análise da área de interface e energia livre de solvatação para ambas as conformações oligoméricas (dímeros grandes e compactos) do BnSP-7.	61
Tabela 3. Desvios médios da sobreposição de C α dos monômeros A e B da BnSP-7 nativa com BnSP-7/CaA, BnSP-7/CiA e BnSP-7/CuA.	64
Tabela 4. Área total e análise físico-química dos aminoácidos das cavidades da estrutura cristalográfica da BnSP-7 nativa (N7nat) e complexada com os ligantes: ácido cinâmico (N7CiA); ácido <i>p</i> -cumárico (N7CuA) e ácido cafeico (N7CaA); bem como de outras PLA ₂ -like proteins depositadas no PDB.	70
Tabela 5. Análise físico-química dos aminoácidos que compõem o canal hidrofóbico (túnel) de ambos os monômeros da estrutura cristalográfica da BnSP-7 nativa (N7nat) e complexada com os ligantes: ácido cinâmico (N7CiA); ácido <i>p</i> -cumárico (N7CuA) e ácido cafeico (N7CaA); bem como de outras PLA ₂ -like proteins depositadas no PDB.	71
Tabela 6: Ângulos de conformação quaternária para estruturas cristalográficas Lys49-PLA ₂ s.	81

Lista de abreviaturas

[θ]	Elipicidade molar residual média;
μF	Microfarads;
Å	Angström;
Å ³	Unidade de volume Angström ao cubo;
AOX1	Álcool oxidase 1;
AOX2	Álcool oxidase 2;
Asp49-PLA ₂ s	Fosfolipases A ₂ catalíticas que possuem um resíduo de ácido aspártico na posição 49;
BMGY	Meio Complexo de glicerol (Buffered Glycerol-complex Medium);
BMMY	Meio Complexo de metanol (Buffered Methanol-complex Medium);
BmooPLA ₂	Fosfolipase A ₂ ácida isolada da peçonha de <i>Bothrops moojeni</i> ;
BnSP-7	Fosfolipase A ₂ Lys49 básica isolada da peçonha de <i>Bothrops pauloensis</i> ;
BPB	Brometo de <i>p</i> -bromofenil;
BthTx-I	Bothropstoxina-I, fosfolipase A ₂ Lys49 básica isolada da peçonha de <i>Bothrops jararacussu</i> ;
Ca ²⁺	Íon cálcio;
CaA	Ácido cafeico (Caffeic acid);
CaCl ₂	Cloreto de cálcio;
CAT	Catalase;
CD	Dicroísmo circular (Circular Dichroism);
CiA	Ácido cinâmico (Cinnamic acid);
CK	Creatina cinase (Creatine kinase);
c-myc	Epítipo responsável pelo reconhecimento por anticorpos específicos;
CuA	Ácido <i>p</i> -cumárico (<i>p</i> -coumaric acid);
C α	Carbono alfa;
DAK	Dihidroxiacetona cinase (Dihydroxyacetone kinase);
DAS	Dihidroxiacetona sintase (Dihydroxyacetone synthase);
DH5 α	Linhagem de <i>Escherichia coli</i> ;
DHA	Dihidroxiacetona (Dihydroxyacetone);
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato (Dihydroxyacetone phosphate);
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico;
DNA	Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid);
DO	Densidade óptica;
DO _{600nm}	Densidade óptica a 600 nanômetros;
D _T	Coeficiente de Difusão Translacional;
DTT	Ditiotreitol;
EcoRI	Enzima de restrição isolada a partir de cepas de <i>Escherichia coli</i> ;
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético (Ethylenediamine tetraacetic acid);
F1,6BP	Frutose-1,6-bisfosfato (Fructose-1,6-biphosphate);
F6P	Frutose-6-fosfato (Fructose-6-phosphate);
FBA	Frutose-1,6-bifosfato aldolase;
FBP	Frutose-1,6-bifosfatase (Fructose-1,6-bisphosphatase);
F _{calc}	Fatores de estrutura calculados após a realização da substituição molecular;
FDH	Formato desidrogenase;
FGH	S-formil glutational hidrolase;
FLD	Formaldeído desidrogenase;

F_{obs}	Fatores de estrutura observados a partir da difração de raios X por um monocristal;
GAP	Gliceraldeído-3-fosfato (Glyceraldehyde-3-phosphate);
GSH	Glutathione;
GTP	Guanosina trifosfato (Guanosine-5'-triphosphate);
HEPES	Ácido 4 - (2-hidroxietil) -1-piperazinoetanossulfônico (4-(2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic acid);
his4	Fenótipo da deficiência da enzima histidina desidrogenase;
His-Tag	Cauda de poli histidina;
HPLC-RP	Cromatografia líquida de alta performance de fase reversa (High-performance liquid chromatography – reverse phase);
kb	Kilobase (1000 pares de base);
kDa	Kilodalton;
LB	Meio Luria-Bertani;
Lys49-PLA₂s	Fosfolipases A ₂ desprovidas de atividade catalítica que possuem um resíduo de lisina na posição 49;
MCS	Sítios de clonagem múltipla (Multiple cloning site);
MDiS	Sítio de desestabilização da membrana (<i>Membrane Disruption-Site</i>);
MDoS	Sítio de <i>docking</i> à membrana (<i>Membrane Docking-Site</i>);
MjTX-II moojeni	Moojenitoxina II, fosfolipase A ₂ Lys49 básica isolada da peçonha de <i>Bothrops moojeni</i> ;
MPD	Hexileno glicol (2-Methyl-2,4-pentanediol);
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro (Messenger ribonucleic acid);
Mut⁺	Fenótipo da utilização de metanol pela enzima álcool oxidase 1
Mut^s	Fenótipo da utilização de metanol pela enzima álcool oxidase 2
MWCO	Limite de massa molecular (Molecular weight cut-off);
Na⁺	Íon sódio;
NaOH	Hidróxido de sódio;
NCBI	Centro Nacional de Informações Biotecnológicas (National Center for Biotechnology Information);
NotI	Enzima de restrição isolada a partir de cepas de <i>Nocardia otitidis</i> ;
ORF	Fase aberta de leitura (Open reading frame);
O_γ	Oxigênio gama;
PDB ID	Código de três letras que identificam uma estrutura cristalográfica depositada no Protein Data Bank;
PDB	Protein Data Bank;
PEG	Polietilenoglicol;
Pi	Fosfato (Phosphate);
PLA₂	Fosfolipases A ₂ (Phosfolipases A ₂ (E.C. 3.1.1.4));
PLA₂-like	Fosfolipases A ₂ desprovidas de atividade catalítica que possuem outro resíduo na posição 49, ao invés de um ácido aspártico;
PmeI	Enzima de restrição isolada a partir de cepas de <i>Pseudomonas mendocina</i> ;
pPicZαA	Vetor de expressão em <i>Pichia pastoris</i> com seleção por Zeocina TM ;
PrTX-I	Piratoxina I, fosfolipase A ₂ Lys49 básica isolada da peçonha de <i>Bothrops pirajai</i> ;
PSA	Persulfato de amônio;
PVDF	Fluoreto de polivinilideno (Polyvinylidene fluoride);
R_{cryst}	Valor de discordância entre os valores dos fatores de estrutura calculados (F _{obs}) e os valores dos fatores de estrutura observados (F _{calc});

R_{free}	Valor de discordância entre os valores dos fatores de estrutura calculados (F_{obs}) e os valores dos fatores de estrutura observados (F_{calc}) calculado usando um subconjunto de reflexões retiradas aleatoriamente (geralmente em torno de 5%) que não são usadas durante o refinamento da estrutura;
R_h	Raio hidrodinâmico;
RNase	Ribonuclease;
SDS	Dodecil sulfato de sódio (Sodium dodecyl sulfate);
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis);
sPLA₂	Fosfolipase A ₂ secretadas (Secreted phospholipases A ₂);
TAE	Tampão tris-acetato-EDTA;
TEMED	Tetrametiletilenodiamina (Tetramethylethylenediamine);
TFA	Ácido trifluoroacético (Trifluoroacetic acid);
TPI	Trifosfato isomerase (Triosephosphate isomerase);
Tris-HCl	Tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreto;
xg	Força centrífuga aplicada "x" vezes maior que a força gravitacional da Terra;
Xu5P	Xilulose-5-fosfato (Xylulose-5-phosphate);
YNB	Meio de base nitrogenada para levedura (Yeast Nitrogen Base);
YPD	Meio contendo extrato de levedura, peptona e dextrose (Yeast Extract Peptone Dextrose);
YPDS	Meio contendo extrato de levedura, peptona, dextrose e sorbitol (Yeast Extract Peptone Dextrose Sorbitol);
Ω	Ohm;
$n \rightarrow \pi^*$	Transições de elétrons n para o estado excitado π^* ;
$\pi \rightarrow \pi^*$	Transições de elétrons π para o estado excitado π^* ;

Resumo

As fosfolipases A_2 -like (PLA₂s-like) estão entre os principais componentes de peçonhas de serpentes envolvidas no processo de envenenamento, particularmente em serpentes do gênero *Bothrops*. Essas toxinas promovem efeitos miotóxicos que não são neutralizados pela soroterapia convencional e podem levar até a perda do membro afetado. Os estudos estruturais, em especial a técnica de cristalografia, são uma ferramenta poderosa na compreensão da relação estrutura-função de moléculas. O presente trabalho teve por objetivo estudar estruturalmente por diferentes técnicas biofísicas (dicroísmo circular, espalhamento de luz dinâmico, Espectroscopia de fluorescência, termoforese de microescala, cristalização, coleta de dados de difração de raios-X, elucidação e análise estrutural) uma Lys-49-PLA₂ da peçonha de *Bothrops pauloensis*, denominada BnSP-7, em suas formas nativa e complexadas com o ácido cinâmico e seus derivados, ácido cafeico e ácido *p*-cumárico. Adicionalmente, a mesma proteína foi estudada em sua forma recombinante. A ORF referente à BnSP-7 foi inserida no vetor a partir dos sítios de restrição *EcoRI* (3' DNA) e *NotI* (5' DNA). Esse inserto foi inserido em um vetor pPicZαA, transformado em *Pichia pastoris* e induzida a expressão. Após purificação da proteína expressa, foram realizados ensaios de cristalização. Nas estruturas da BnSP-7 obtida a partir do veneno de *B. pauloensis*, foram encontrados ligantes na região MDoS nos três complexos elucidados, bem como a análise dos túneis revelou diferenças nas cargas positivas da BnSP-7 em comparação com outras miotoxinas. Os experimentos de termoforese revelaram que os três ligantes se ligaram à BnSP-7 com afinidades variando de 20-300 μM, sendo que a maior afinidade foi observada para o ácido cafeico, seguido pelo ácido *p*-cumárico e pelo ácido cinâmico. Estes dados estão de acordo com o número de interações eletrostáticas observadas nas estruturas cristalográficas. Esses resultados reforçam a importância da região MDoS no mecanismo de ação miotóxica dessas proteínas, além de fornecer dados estruturais para o desenvolvimento de

inibidores mais efetivos contra os efeitos locais do acidente ofídico, não eficientemente tratado pela soroterapia convencional.

Palavras-chave: Expressão heteróloga, Cristalização, difração de raios-X, BnSP-7, *Bothrops pauloensis*

Abstract

Phospholipases A₂-like (PLA₂-like) toxins are among the main components of snake venoms involved in the envenomation process, particularly in snakes from *Bothrops* genus. These toxins promote myotoxic effects that aren't neutralized by conventional serum therapy and may lead to loss of the affected limb. Structural studies, especially the crystallography technique, are powerful tools for understanding of the structure-function relationship of molecules. The aim of this work was structurally study by different biophysical techniques (circular dichroism, dynamic light scattering, fluorescence spectroscopy, microscale thermophoresis, crystallization, X-ray diffraction data, elucidation and structural analysis) a Lys-49-PLA₂ of *Bothrops pauloensis* venom, named BnSP-7, in native form and complexed to cinnamic acid and its derivatives caffeic acid and *p*-coumaric acid. BnSP-7 ORF was inserted into the vector *EcoRI* (3' DNA) and *NotI* (5' DNA) restriction sites. This insert was inserted into pPicZαA vector, transformed into *Pichia pastoris* and induced the expression. After purification of the expressed protein, crystallization assays were performed. BnSP-7 structures complexed to the ligands were performed using *B. pauloensis* venom which these molecules were found interacting to MDoS region for the three complexes. Furthermore, tunnel analyses revealed differences in the positive charges of BnSP-7 compared to other myotoxins which may be related to the specificity of this toxin. Thermophoresis experiments revealed that all three ligands bound to BnSP-7 with affinities ranging from 20-300 μM, in which the highest affinity was observed for caffeic acid, followed by the *p*-coumaric acid and by cinnamic acid. These data are in agreement with the observed number of electrostatic interactions observed in crystallographic structures. These results consolidate the importance of the MDoS region as a mechanism of myotoxic action of these proteins, in addition to providing structural data for the more effective inhibitors development

against the local effects of the snakebite, not efficiently neutralized by conventional serum therapy.

Keywords: Heterologous expression, Crystallization, X-ray diffraction, BnSP-7, *Bothrops pauloensis*

Capítulo 1:

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1. Envenenamento ofídico e fosfolipases A₂, importantes componentes proteicos encontrados em venenos botrópicos

Envenenamento por acidentes ofídicos representa um importante problema de saúde pública, considerando a frequência e mortalidade resultante destes eventos (KASTURIRATNE *et al.*, 2008). A estimativa mundial de acidentes envolvendo picadas de serpente é de 2,5 milhões de casos por ano, com cerca de 100 a 150 mil mortes (WHITE, 2000; CALVETE *et al.*, 2007), especialmente em áreas rurais de regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África, Oceania, América Central e América do Sul (GUTIÉRREZ *et al.*, 2006; HARRISON *et al.*, 2009).

Além disso, alguns dos efeitos locais não são eficientemente neutralizados pela soroterapia convencional e podem causar sequelas e incapacidades permanentes (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1995; GUTIÉRREZ *et al.*, 2006). Neste contexto, o efeito local de miotoxicidade causado por acidentes com serpentes do gênero *Bothrops* (família Viperidae), responsável por cerca de 130 mil acidentes por ano na América Latina, pode causar perda permanente de tecido, incapacidade ou amputação de membros (ARAÚJO, SANTALÚCIA & CABRA, 2003, FNS, 2001).

Acidentes com serpentes do gênero *Bothrops* também são bastante observados na Ásia, principalmente em áreas rurais do Bangladesh, Butão, Índia, Nepal, Paquistão e Sri Lanka. (GUTIÉRREZ *et al.*, 2006, ALIROL *et al.*, 2010). A Índia tem o maior número de óbitos decorrentes de acidentes ofídicos no mundo, com estimativas de 35 mil a 50 mil mortes por ano (KASTURIRATNE *et al.*, 2008). O gênero *Trimeresurus* (Viperidae) é responsável por um elevado número dos acidentes ofídicos, principalmente entre os trabalhadores das plantações do sul da Índia e, embora possa causar poucas mortes, as picadas produzem efeitos locais que podem resultar em sequelas permanentes, aumentando a morbidade nessa região (GOWDA *et al.*, 2006, ALIROL *et al.*, 2010).

As metaloproteases e fosfolipases A₂ (PLA₂s, E.C. 3.1.1.4) são as toxinas responsáveis pela mionecrose local em acidentes ofídicos com serpentes da família Viperidae. Para algumas serpentes desta família, as fosfolipases A₂, são as toxinas mais abundantes em seus venenos, cujos efeitos locais sobre o tecido muscular não são neutralizados pela soroterapia convencional (CALVETE, 2013, LOMONTE *et al.*, 2014).

As PLA₂s desempenham papéis importantes no metabolismo de lipídios, tendo como principais substratos os fosfolipídios de membrana plasmática celular. Hidrolisam especialmente a ligação acil-éster na posição *sn*-2 dos glicerofosfolipídios (ARNI & WARD, 1996; KINI., 2003), liberando lisofosfolipídios e ácidos graxos livres, principalmente, o ácido araquidônico (Figura 1).

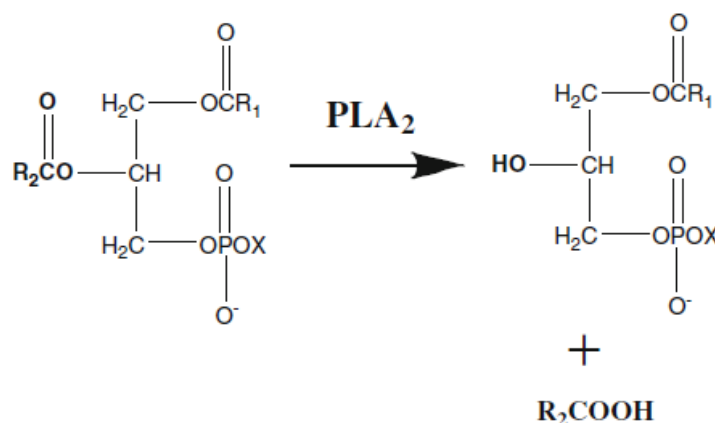


Figura 1. Reação de catálise por PLA₂. O fosfolipídio, representado à esquerda é hidrolisado na posição *sn*-2, liberando um lisofosfolipídio e um ácido graxo, representados à direita. (BURKE e DENNIS, 2009a)

Os produtos derivados da ação de PLA₂s sobre fosfolipídios de membrana representam precursores de moléculas de sinalização que podem exercer uma grande variedade de funções biológicas. Os lisofosfolipídios estão associados no processo de sinalização celular e na remodelagem dos fosfolipídios da membrana, podendo atuar como precursores de mediadores lipídicos, tais como o fator de ativação plaquetária, particularmente relacionado aos processos inflamatórios. Já o ácido araquidônico liberado na ação enzimática das fosfolipases A₂, também

desempenha papel de precursor de lipídeos bioativos (eicosanoides) como as prostaglandinas, tromboxanos, prostaciclina e leucotrienos. Os eicosanoides detêm funções sobre uma variedade de processos fisiológicos e patológicos, atuando na formação de potentes mediadores das respostas imunes e da inflamação, e na percepção da dor (SCHALOSKE & DENNIS, 2006).

As PLA₂s estão distribuídas em 15 grupos (I a XV) pertencentes a cinco categorias de acordo com a origem, sequência de aminoácidos, mecanismos catalíticos, características funcionais e estruturais. Destas, as PLA₂s secretadas (sPLA₂) é o grupo que inclui as PLA₂s encontradas em peçonhas de serpentes (SCHALOSKE & DENNIS, 2006; BURKE & DENNIS, 2009a).

As sPLA₂s são enzimas com massa molecular variável entre 14 e 18 kDa, além de frequentemente possuírem 7 pontes de dissulfeto. Estas enzimas apresentam um resíduo de histidina no sítio ativo e requerem a presença do íon Ca²⁺ que, na ordem de milimolar, é um cofator essencial para a ligação do substrato no sítio catalítico e para o processo enzimático dessas proteínas. (SCHALOSKE & DENNIS, 2006; BURKE & DENNIS, 2009a).

As sPLA₂ estão largamente envolvidas no envenenamento por animais peçonhentos (SOARES *et al.*, 2004; SANTOS-FILHO *et al.*, 2008), sendo que as PLA₂s do grupo IA e IIA são predominantes em peçonhas de serpentes. As enzimas pertencentes aos grupos I e II possuem sequência de aminoácidos e pontes de dissulfeto altamente conservadas, sendo seis delas em posições fixas, unindo os resíduos 27-131, 29-45, 44-109, 51-102, 61-95 e 85-100, e uma sétima, cuja posição é variável (WANG *et al.*, 1996). Existe também um alto grau de homologia na estrutura terciária desses dois grupos, o que inclui três hélices alfa (resíduos 1-12, 37-54 e 90-109) e uma alça de ligação com o cálcio na região dos resíduos 24-30 (SCOTT, 1997). Análises estruturais dessas enzimas revelaram em sua composição cerca de 50% de hélices alfa (DENNIS, 1994) e uma quantidade relativamente pequena de folhas β , localizadas entre as hélices 2 e 3 (resíduos 74-84), a qual é estabilizada pelo N-terminal (SCOTT, 1997) (**Figura 2**).

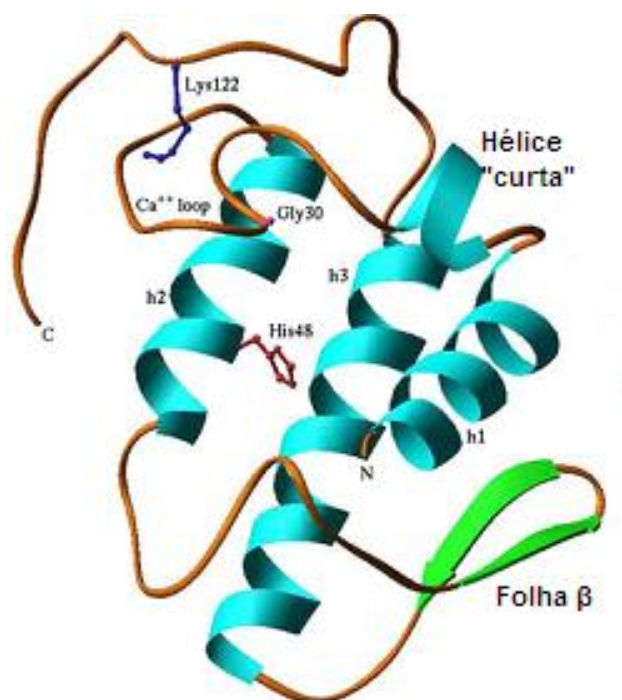


Figura 2. Representação em *Cartoon* da estrutura monomérica da PLA₂BnSP-7. α -hélices estão indicadas na cor azul e folhas β indicadas na cor verde por setas. Gly30, His48 e Lys122 do sítio ativo estão representados em modelo de bola-bastão (adaptado de CARSON, 1997).

As PLA₂s do grupo IIA podem ser subdivididas em catalíticas e não-catalíticas, onde Asp49-PLA₂s apresentam alta atividade catalítica enquanto que as proteínas PLA₂-like não apresentam atividade catalítica devido a mutações em sua estrutura primária que impedem a coordenação do íon Ca²⁺. As proteínas PLA₂-like mais estudadas são as Lys49-PLA₂s, que são incapazes de coordenar o íon Ca²⁺ devido as mutações nos resíduos Tyr28→Asn e Asp49→Lys (HOLLAND *et al.*, 1990; FERNANDES *et al.*, 2010). Porém, apesar de não apresentarem atividade catalítica, essas toxinas podem promover efeitos miotóxicos, a partir da desestabilização de membrana no tecido muscular.

Vários estudos têm mostrado que a região C-terminal, que inclui o segmento dos resíduos 115-129 é responsável pela atividade miotóxica das Lys49-PLA₂s, por conta da combinação de resíduos carregados positivamente e resíduos hidrofóbicos (NÚÑEZ, ANGULO & LOMONTE,

2001; CHIOATO *et al.*, 2007). Também é descrito que esta ação está diretamente relacionada com a forma dimérica das PLA₂-Lys49 em solução (FRANCIS *et al.*, 1991; DA SILVA GIOTTO *et al.*, 1998; DE OLIVEIRA *et al.*, 2001).

Estudos com a BthTx-I, uma PLA₂-Lys49 da peçonha de *Bothrops jararacussu*, sugeriam que a interface dos monômeros formaria uma "dobradiça" que resulta nas formas "aberta" e "fechada" do dímero (**Figura 3**), sendo que essa transição provocaria uma mudança de posição da região C-terminal (DA SILVA GIOTTO *et al.*, 1998). Essa conformação ficou conhecida como dímero convencional (dímero largo), pois se acreditava que de fato esse seria o dímero biológico.

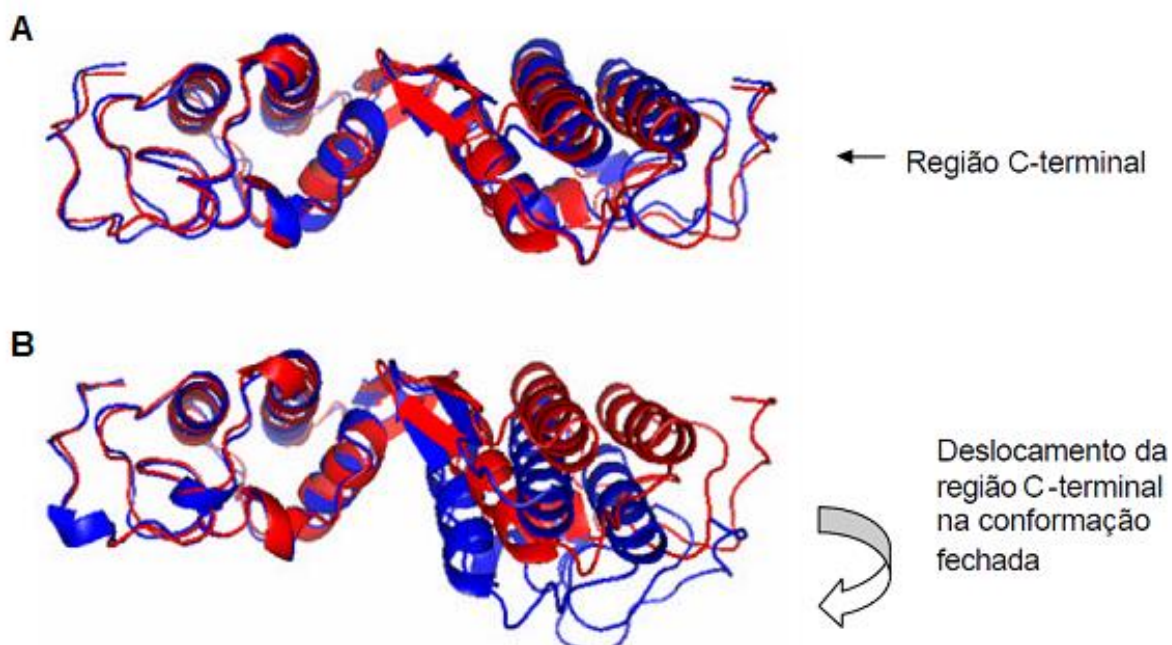


Figura 3. Sobreposição das estruturas cristalográficas das proteínas miotoxina II de *Bothrops asper* (em vermelho) e bothopstoxina I de *Bothrops jararacussu* (em azul). **(A)** estrutura dimérica “aberta” e **(B)** estrutura dimérica “fechada”. O movimento dos monômeros resulta no deslocamento da região C-terminal em uma distância de 13 Å em relação à conformação aberta (adaptado de ARAGÃO, 2005).

Contudo, dos Santos *et al.* (2009), propuseram uma nova conformação, chamado de dímero alternativo (ou dímero compacto), na qual, a partir da análise estrutural comparativa de

variantes de Lys49-PLA₂s, foi demonstrado dois padrões diferentes de conformação oligomérica que estão relacionados com a presença ou a ausência de ligantes no canal hidrofóbico (**Figura 4**). Além disso, foi proposto um “sítio miotóxico”, responsável pela miotoxicidade, que seria composto pelos resíduos Lys20, Lys115 e Arg118, devido ao fato da porção C-terminal estar na interface dimérica. Também é sugerido a importância do resíduo Tyr119 no perfil miotóxico dessas toxinas, estabilizando a conformação oligomérica (DOS SANTOS *et al.*, 2009).

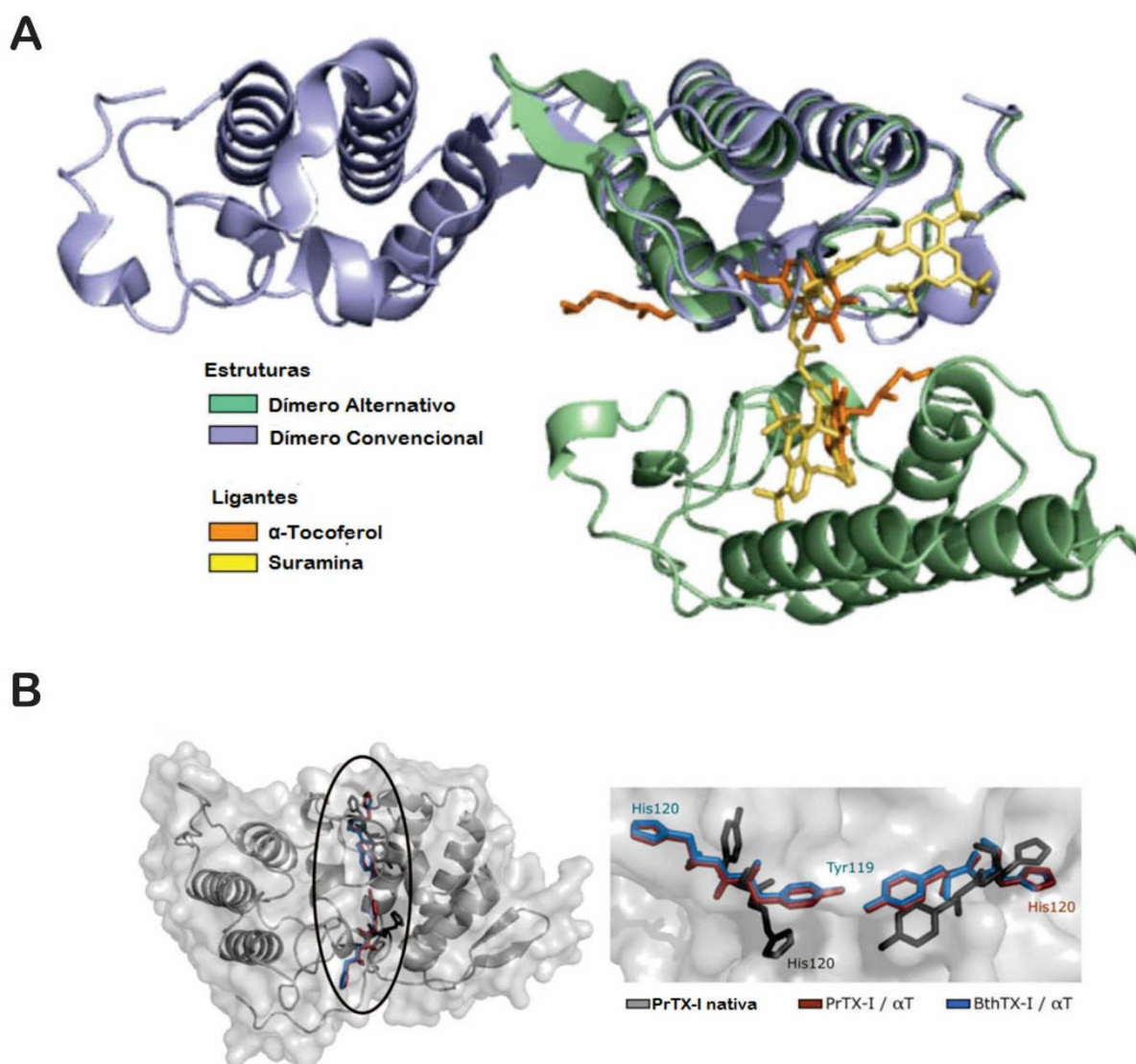


Figura 4. (A) Sobreposição das estruturas cristalográficas de Lys49-PLA₂s nas conformações de dímero alternativo (verde) e dímero convencional (roxo). Os ligantes α-tocoferol (laranja) e suramina (amarelo) são mostrados interagindo com o dímero alternativo. **(B)** Sobreposição de três estruturas de Lys49-PLA₂s, mostrando a localização

de Tyr119 a partir de ambos os monômeros em cada estrutura e o detalhe da ligação de hidrogênio intermolecular presente nas estruturas complexadas com α -tocoferol. Esta ligação ocorre após a reorientação da região C-terminal induzida pela interação com o ligante (adaptado de DOS SANTOS *et al.*, 2009).

Recentemente, com base em estudos estruturais e funcionais, foi proposto um mecanismo miotóxico para estas proteínas (**Figura 5**), que envolve uma transição alostérica, além de dois locais distintos para interação com a membrana, incluindo resíduos da região C-terminal: i) MDoS (Membrane-Docking Site) formado pelas Lys20; Lys115 e Arg118 e; ii) MDiS (Membrane-Disruption Site) formado pelos resíduos Leu121 e Phe125 (FERNANDES *et al.*, 2013; 2014).

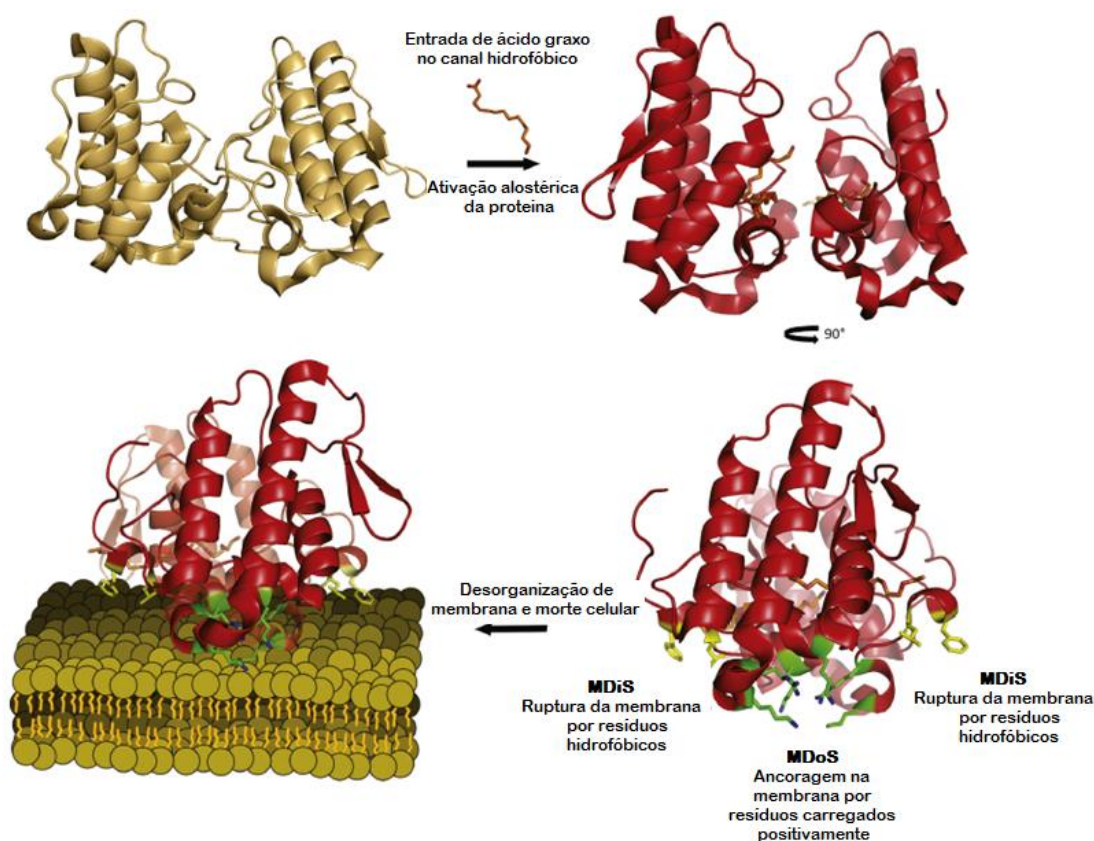


Figura 5. Mecanismo miotóxico de Lys49-PLA₂s. A entrada de um ácido graxo no canal hidrofóbico da proteína leva a uma ativação alostérica pela reorientação do dímero. Na forma ativa, o MDoS e MDiS, ficam alinhados no mesmo plano, expostos ao solvente. A região MDoS estabiliza a proteína na membrana pela interação entre resíduos

carregados e a porção hidrofílica do fosfolípídeo. Subsequentemente, a região MDiS desestabiliza a membrana pela penetração de resíduos hidrofóbicos, causando a morte celular. (adaptado de FERNANDES *et al.*, 2014)

A BnSP-7 é uma importante Lys49-PLA₂ isolada a partir da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (RODRIGUES *et al.*, 1998; SOARES *et al.*, 2000b), serpente que popularmente é conhecida como jararaca pintada e atualmente é denominada *Bothrops pauloensis* (CARRASCO, 2012). Esta enzima foi descrita como uma proteína cataliticamente inativa com massa molecular em torno de 14 kDa e estrutura semelhante à de outras miotoxinas Lys49-PLA₂s. Possui em sua composição de aminoácidos muitos resíduos básicos e hidrofóbicos, com elevado grau de identidade com outras proteínas desta subclasse. Esta toxina possui um ponto isoelétrico de 8,8 e pode induzir necrose em fibras musculares de ratos (RODRIGUES *et al.*, 1998; SOARES *et al.*, 2000b.; MAGRO *et al.*, 2003). Além disso, essa proteína induz miotoxicidade evidenciada também por aumento nas taxas de creatina quinase (CK) plasmática, bloqueio da contração neuromuscular e citotoxicidade em células bacterianas (SOARES *et al.*, 2000b), contudo a ação miotóxica da BnSP-7 é menor em comparação com outras Lys49-PLA₂ já estudadas (TOYAMA *et al.*, 2001).

Estruturalmente, essa enzima assemelha-se a estrutura de outras miotoxinas Lys49-PLA₂, com a presença de sete pontes dissulfeto e elementos de estrutura secundária conservados. A estrutura consiste em uma hélice-alfa N-terminal, um loop de ligação Ca²⁺, duas hélices (2 e 3), uma folha-β antiparalela e região C-terminal (MAGRO *et al.*, 2003).

1.2. Inibidores de PLA₂ like

No processo de envenenamento ofídico, esses efeitos miotóxicos não são efetivamente neutralizados pela soroterapia convencional, o que pode conduzir a permanente perda tecidual e consequente amputação do membro afetado (GUTIERREZ & LOMONTE, 1995). Nos países em

desenvolvimento, a medicina popular emprega várias espécies de plantas no tratamento do envenenamento ofídico, especialmente nas comunidades onde o acesso imediato à soroterapia é difícil, como por exemplo grupos indígenas (SOARES *et al.*, 2005).

Vários grupos indígenas utilizam extratos de plantas para tratamento ofídico. Assim, nos últimos anos, têm sido investigados os efeitos dos compostos de plantas sobre picadas de serpentes, através do isolamento e caracterização destes constituintes ativos e a elucidação dos possíveis mecanismos de ação desses compostos (TICLI *et al.*, 2005; MORS *et al.*, 2000; SOARES *et al.*, 2005; FERNANDES *et al.*, 2015). Além disso, estudos com modificações químicas em resíduos específicos de PLA₂ e consequente análise dos efeitos na atividade enzimática e farmacológica permitem importantes avanços na compreensão das relações estrutura-função desses compostos.

Com relação às Lys49-PLA₂s, a alquilação do resíduo His48 foi capaz de reduzir cerca de 50% da atividade miotóxica, 85-90% da citotoxicidade, e 15-20% da atividade edematogênica, além de diminuir significativamente a letalidade, contudo, sem alteração expressiva da ruptura de lipossomos. (ANDRIÃO-ESCARSO *et al.*, 2000; SOARES *et al.*, 2000b; DOS SANTOS *et al.*, 2007, 2010). Recentes estudos estruturais têm demonstrado que há diversas classes de ligantes que tem a potencialidade de inibir Lys49-PLA₂s, tais como α -tocoferol, ou capacidade de inibição, como ácido rosmarínico, ácido cafeico, brometo de *p*-bromofenacila entre outros (DOS SANTOS *et al.*, 2009, 2011, FERNANDES *et al.*, 2010, SHIMABUKU *et al.*, 2011).

Entre estes compostos, destacam-se os derivados do ácido cinâmico, tais como o ácido cafeico, ácido *p*-cumárico além do próprio ácido cinâmico (**Figura 6**). Estas moléculas são largamente encontradas em várias espécies na natureza como aquelas do gênero *Polygonum*, *Prestonia coalita*, *Strychnos nux-vomica*, *Taraxacum officinale* e *Vernonia condensata* e apresentam reatividade bioquímica relevante (MORS *et al.*, 2000).

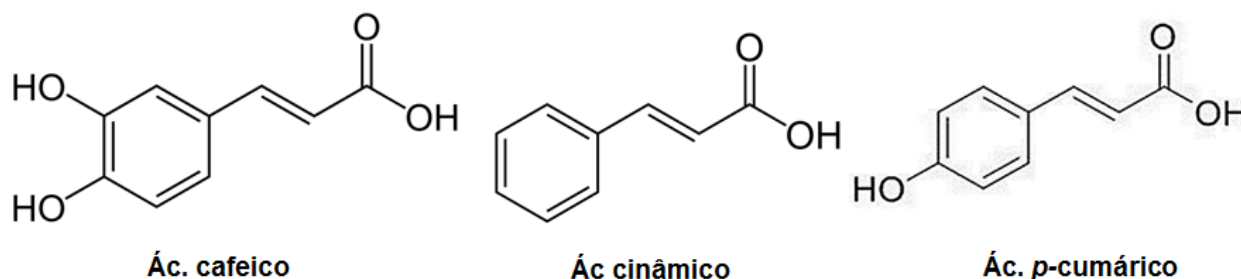


Figura 6. Representação molecular do ácido cafeico, ácido cinâmico e ácido *p*-cumárico (imagens disponíveis em <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/c3/Kaffees%C3%A4ure.svg/490pxKaffees%C3%A4ure.svg.png>; <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/4/41/Cinnamicacid2.png/250px-Cinnamicacid2.png>; <https://i1.wp.com/img.fcencias.com/uploads/2014/02/cumarico.png?resize=800%2C411>).

Os derivados de ácido cinâmico exibem alta atividade antioxidante, devido à presença de fragmentos do radical vinil em suas estruturas. Este fator é interessante nos estudos relacionados com a potencialidade desses compostos no tratamento de patologias relacionadas à peroxidação lipídica nas membranas celulares. (BOGDASHEV, TUKHOVSKAYA & POGREBNIYAK, 1998).

Assim, a posição do radical no ácido cafeico e ácido *p*-cumárico favorece a atividade antioxidante (CHEN & HO, 1997; SHARMA, 2011). O ácido cafeico, por exemplo, tem uma grande variedade de efeitos farmacológicos potenciais, como antioxidante, anticâncer e atividades antivirais, bem como ação antídoto sobre a peçonha de *Bothrops jararaca* (RICE-EVANS, MILLER & PAGANGA, 1997; XIE *et al*, 2013; SOARES *et al*, 2005; FERNANDES *et al*, 2015). Além disso, demonstrou-se que os derivados do ácido cafeico são antídotos para peçonhas de serpente via administração oral ou parentérica (AGORO, 1978; MORS *et al.*, 2000; SAMY *et al.*, 2008).

A elucidação estrutural de PLA₂s, tanto em sua forma nativa, recombinante, como complexadas com ligantes e/ou inibidores, é de extrema importância para uma melhor compreensão do mecanismo de ação dessas proteínas, visto que as estruturas tridimensionais das

PLA2s podem conter informações indispensáveis no desenvolvimento de fármacos e derivados de toxinas menos agressivos, que poderão ser utilizados na produção de soros antiofídicos. Além disso, conhecimentos acerca da estrutura oligomérica de toxinas é relevante tanto na fase de descoberta como na de otimização de candidatos a drogas que possam complementar a soroterapia convencional (KUNTZ, 1992; VERLINDE & HOL, 1994).

1.3. Clonagem e expressão de toxinas de peçonhas de serpentes

A obtenção de moléculas recombinantes com o auxílio de técnicas de biologia molecular, devido à alta produtividade e versatilidade desse mecanismo, facilita os estudos que visam elucidar os possíveis mecanismos de ação destas toxinas a partir da aquisição de seus modelos moleculares e de estudos funcionais. Desta forma, abrem-se caminhos para a compreensão de quais domínios estruturais são responsáveis pelas diferentes atividades apresentadas por estas enzimas, além de reduzir o sofrimento e estresse causado às serpentes na extração da peçonha. (ROBERTO *et al.*, 2004a; CARDOSO *et al.*, 2011).

A expressão de proteínas recombinantes em microrganismos transformados consolidou-se como uma técnica fundamental na biologia molecular moderna (QORONFLECH *et al.*, 2007). A produção de proteínas heterólogas pode ser obtida em diferentes organismos, tais como bactérias, leveduras e células de mamíferos (MAKRIDES, 1996), sendo que nas últimas três décadas, bactérias da espécie *Escherichia coli* tem sido amplamente utilizadas no processo. No entanto, a aplicação deste sistema com proteínas derivadas de genomas eucarióticos, que requerem modificações pós-traducionais, tem sido um problema devido ao fato destes microrganismos não possuírem maquinaria intracelular necessária para obtenção destas modificações (DALY & HEARN, 2005). Além disso, não é apropriado o uso de *E. coli* em estudos de expressão de proteínas com um grande número de ligações dissulfeto, devido ao citoplasma de *E. coli* ser um ambiente redutor. Com isso, proteínas ligadas por ligações

dissulfeto devem ser re-enoveladas, partindo de corpos de inclusão de *E. coli*, o que resulta em quedas significativas de rendimento. (WHITE, KEMPI & KOMIVES 1994).

Várias PLA₂s recombinantes de diferentes peçonhas foram expressas através de sistema de expressão com *E. coli* (LIANG *et al*, 1993; OGAWA *et al*, 1997; TSAI & WANG, 1998; GIULIANI *et al*, 2001; CHIOATO *et al.*, 2002). Roberto *et al.* (2004a) expressaram uma PLA₂ ácida recombinante clonada em *E. coli* a partir da glândula de *Bothrops jararacussu*. Esta apresentou as mesmas características estruturais e funcionais da PLA₂ nativa. Recentemente, Silveira *et al.* (2013) clonaram e expressaram uma fosfolipase A₂ ácida (BmooPLA₂) da peçonha de *Bothrops moojeni* que apresenta alta atividade fosfolipásica, bem como efeito bactericida moderado e atividade citotóxica semelhante aos observados na proteína nativa.

Destes, tem destaque a expressão da BthTX-I (WARD *et al.*, 2001), por ser a primeira PLA₂-like recombinante de peçonha de serpente produzido com atividade funcional (SOARES, FONTES & GIGLIO, 2004; WARD *et al*, 2001), além de ser a única PLA₂-like botrópica recombinante relatada (SETO *et al.*, 2008). Bem como outras PLA₂-like descritas, a BthTX-I foi expressa em corpos de inclusão (SETO *et al.*, 2008). Ainda de acordo com Seto *et al.* (2008), existem dificuldades na expressão de PLA₂ de peçonhas em *E. coli*, devido as propriedades da proteína, que pode levar a lise celular em *E. coli* e também por causa da presença de sete ligações dissulfeto que não são adequadamente pareadas nesse sistema. O sucesso no protocolo de re-enovelamento proposto por Ward *et al.* (2001) envolve vários passos de solubilização dos corpos de inclusão, de purificação, incluindo cromatografia de fase reversa, e, ainda, as etapas adicionais de re-enovelamento. Um protocolo complexo com várias etapas até a obtenção de proteína expressa pode resultar em perdas significativas, baixa produtividade e consequente aumento dos custos de produção da proteína expressa (WANG *et al*, 2000; SETO *et al*, 2008).

Com isso, uma grande variedade de proteínas que não puderam ser expressas em *E. coli* no nível correto de maturação pós-traducional foram subsequentemente produzidas em levedura metilotrófica *Pichia pastoris* (MONSALVE *et al.*, 1999).

Esse sistema contém vantagens significativas em relação a sistemas de expressão em *E. coli* na produção de muitas proteínas eucarióticas heterólogas, tais como a existência de mecanismos de modificação pós-traducional. Essa é uma característica particularmente importante para proteínas que contêm múltiplas ligações dissulfeto, bem como proteínas que requerem glicosilação, fosforilação, a ausência de metionina amino-terminal ou não formação de oligômero para a montagem correta da proteína madura. Além disso, esse sistema permite a segregação da proteína autêntica na forma solúvel e é capaz de produzir grandes quantidades da proteína recombinante (DALY & HEARN, 2005).

Tais pesquisas utilizam técnicas de biologia molecular como ferramentas para buscar entender a relação estrutura-função de moléculas, gerando com isso, não somente conhecimentos em várias áreas do saber, mas também abrem caminhos para o desenvolvimento e utilização de fármacos no tratamento de acidentes ofídicos, ou no tratamento de algumas patologias.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo geral

Compreender o mecanismo miotóxico da BnSP-7 a partir de ensaios bioquímicos e biofísicos e estudos cristalográficos com a proteína obtida diretamente do veneno, na forma nativa e complexada com ligantes derivados do ácido cinâmico e análise dos tuneis do canal hidrofóbico, bem como estudos de clonagem e expressão e cristalização da proteína na forma recombinante, visando estabelecer bases para a realização de mutações sitio dirigidas.

1.4.2. Objetivos específicos

- a) Purificação da proteína BnSP-7 da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* a partir de cromatografia de troca iônica e fase reversa, para a obtenção de BnSP-7 com alta pureza.
- b) Estudos biofísicos em solução (dicroísmo circular, Espalhamento Dinâmico de Luz, espectroscopia de fluorescência e termoforese em microescala), visando a obtenção de informações sobre a integridade estrutural da toxina, bem como informações da afinidade da BnSP-7 com os ligantes derivados do ácido cinâmico.
- c) Clonagem e expressão de BnSP-7 recombinante, utilizando como modelo biológico levedura metilotrófica *Pichia pastoris*, purificação dessa proteína heteróloga através de cromatografia e caracterização bioquímica da proteína recombinante, para a obtenção de bases para experimentos de mutação sitio dirigidas.
- d) Experimentos estruturais por cristalografia da BnSP-7 e seus complexos com derivados de ácido cinâmico (ácido cafeico (CaA), ácido cinâmico (CiA) e ácido *p*-cumárico (CuA)) e da BnSP-7 recombinante, a fim de obter resultados para a compreensão do mecanismo miotóxico das PLA₂-like e sua inibição, além de, eventualmente, obter informações que podem levar ao design de novos inibidores para essas toxinas.
- e) Análise estrutural comparativa da BnSP-7 com outras PLA₂-like, para indicar os possíveis motivos da menor atividade miotóxica da BnSP-7 em comparação com outras miotoxinas.

Capítulo 2:

MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Purificação das amostras e obtenção dos ligantes

A BnSP-7 nativa foi isolada a partir do veneno bruto de *B. pauloensis*, por cromatografia de troca iônica seguido de cromatografia líquida de alta performance de fase reversa (HPLC-RP) (sistema ÄKTA Purifier 10, GE Healthcare) (SOARES *et al.*, 2000b, com modificações). Já para a obtenção da BnSP-7 recombinante, os experimentos de expressão serão mostrados em sessão específica (3.8).

Na purificação da BnSP-7 nativa, 50 mg de veneno bruto liofilizado foi ressuspenso em 50 mM de bicarbonato de amônio (pH 8,0) e então centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi aplicado em uma coluna HiTrap CM Sepharose Fast Flow (CM FF; GE Healthcare), previamente equilibrada com o mesmo tampão. A eluição ocorreu a partir de um gradiente linear de 50-500 mM de bicarbonato de amônio (pH 8,0) em um fluxo de 1,0 ml/min. As frações foram coletadas com monitoramento a 280 nm. A fração contendo a BnSP-7 foi liofilizada e subsequentemente dissolvida em 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) e aplicada em uma coluna C18 (SUPELCO, 25 cm por 4,6 mm, 5 µm, Sigma-Aldrich) pré-equilibrada com 0,1% de TFA (tampão A).

As proteínas foram eluídas em gradiente 0,1% TFA em 66,5% acetonitrila (tampão B) em fluxo de 1,0 ml/min no seguinte sistema: 5% B (0-10 min); 5-70% B (10-45 min); 70-100% B (45-50 min); 100% B (50-58 min) e acompanhadas por absorbância a 280 nm. As frações obtidas foram analisadas por SDS-PAGE a 13%. A fração referente à BnSP-7 foi liofilizada e estocada a -20 °C até o uso. O ácido cafeico (CaA), ácido cinâmico (CiA) e ácido *p*-cumárico (CuA) foram adquiridos comercialmente (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA), com pureza superior a 98% para CaA e CuA e 97% para CiA.

2.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (SDS-PAGE)

A eletroforese com agente desnaturante dodecil sulfato de sódio (SDS) foi realizada segundo a técnica descrita por Laemmli (1970). O sistema de SDS-PAGE descontínuo consistiu de: Gel de empilhamento a 6%, contendo Tris-HCl 0,5M (pH 6,8) e SDS a 0,1% e gel de separação a 13% contendo Tris-HCl 1,5M (pH 8,8) e SDS 0,1%, além de Persulfato de Amônio a 10% e TEMED, mantendo a relação de Acrilamida/Bis-Acrilamida em 30%:0,8%. Foram utilizados géis concentração de 13%, pois nessa concentração a observação da migração de PLA₂s se torna mais evidente. Todos os géis foram preparados num sistema de eletroforese Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio Rad). As amostras proteicas foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625M pH 6,8; glicerol a 10%; β-mercaptoetanol 5%; 2% de SDS e 0,001% de azul de bromofenol (condição redutora). As soluções foram aquecidas a 95°C por 5 minutos em banho-maria e aplicadas em gel de eletroforese. O marcador de peso molecular utilizado foi PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific), que contém bandas de referência de 10 a 170 kDa. O tampão do eletrodo continha Tris-HCl 0,025M, Glicina 0,19M e SDS 0,1%, pH 8,3. A eletroforese foi realizada em corrente de 70V até o indicador azul de bromofenol alcançar o final do gel. O gel foi corado em solução de azul de coomassie - R250 0,1% em água, ácido acético 10% e etanol 50% ou a partir de Kit de coloração com prata Pierce silver stain (Thermo Scientific) de acordo com as instruções do fabricante e descorado em solução de ácido acético 10% e etanol 30% para posterior análise.

2.3. Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)

A integridade da estrutura secundária da BnSP-7 nativa foi verificada por espectroscopia de dicroísmo circular no intervalo espectral de comprimento de onda de 185-260 nm, utilizando para tal, um espectropolarímetro JASCO J-815 (JASCO Spectroscopic Co., Ltd., Japão) equipado com um termo controlador Peltier. Os experimentos foram realizados a 293 K,

utilizando uma cubeta de quartzo de 0,5 nm, *scanning speed* de 100 nm/min, tempo de resposta de 1 s, *bandwidth* de 2nm e 20°C de temperatura na presença de fluxo de nitrogênio gasoso. O espectro final corresponde à média de 20 acumulações medidas da BnSP-7, já subtraído a medida do tampão (branco) e normalizados através da transformação da unidade de miligraus para elipcidade residual média $[\theta]$ (deg.cm². dmol⁻¹.residue⁻¹). A amostra de proteína foi analisada a 0,25 mg. mL⁻¹ em água deionizada.

2.4. Espectroscopia UV-visível e de fluorescência

As medições de espectroscopia de UV-visível do ácido cinâmico (CiA) e seus derivados ácido cafeico (CaA) e ácido *p*-cumárico (CuA) foram realizadas em um espectrofotômetro Ultrospec 2000 UV / visível (Pharmacia Biotech) usando uma cuveta de quartzo com caminho óptico de 1 mm a 293 K. Os derivados de ácido cinâmico foram analisados a concentração de 130 µM em tampão composto por HEPES 30 mM (pH 8,0), etanol 0,5% e piridina 0,5%, na faixa de 200-1000 nm.

As medidas de fluorescência estática da intensidade de emissão de CaA e CuA sozinhas e complexadas com a BnSP-7 foram realizadas em um espectrofluorímetro Hitachi F-7000 usando uma cuveta de quartzo com caminho óptico de 10 mm a 293 K e *bandwidth* de 5 nm (para medidas de CaA e BnSP-7 complexada com ácido cafeico (BnSP-7/CaA)) e 10 nm (para medidas de CuA e BnSP-7 complexada com ácido *p*-cumárico (BnSP-7/CuA)). As amostras analisadas foram diluídas em tampão composto por HEPES 30 mM (pH 8,0), etanol a 0,5% e piridina a 0,5% a concentrações de 30 µM de proteína e 300 µM de ambos os ligantes. Os espectros de emissão de fluorescência foram medidos de 400 a 600 nm (1200 nm. s⁻¹) utilizando como comprimento de onda de excitação de 330 nm (para medidas de CuA e BnSP-7/CuA) e 345 nm (para medidas de CaA e BnSP-7/CaA).

2.5. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Os experimentos de espalhamento dinâmico de luz (DLS) foram conduzidos a partir da BnSP-7 liofilizada e dissolvida em água deionizada em concentração de 3,5 mg. mL⁻¹ a 291 K.

As medidas de DLS foram realizadas utilizando o sistema DynaPro TITAN (Wyatt Technology). Foram medidos dados da amostra 100 vezes em triplicata e os resultados foram analisados no programa Dynamics v.6.10.

2.6. Termoforese em microescala (MST)

Termoforese em microescala (*Microscale Thermophoresis* - MST) (JERABEK-WILLEMSSEN *et al.*, 2011) foi utilizada para medir a afinidade entre a BnSP-7 e os três ligantes (ácido cafeico (CaA), ácido cinâmico (CiA) e ácido *p*-cumárico (CuA)). As medidas de MST foram realizadas em um sistema Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies), localizado no Instituto de Física de São Carlos - USP. A BnSP-7 foi previamente preparada em uma solução tampão composta por HEPES 50 mM, pH 8,0. Para a realização dos ensaios, a BnSP-7, com concentração de 2,3 mg. mL⁻¹, foi marcada com 10 mg. mL⁻¹ de Isômero de isotiocianato de fluoresceína I (FITC) (Sigma-Aldrich) dissolvido em DMSO. Esta mistura foi incubada durante 2 horas no escuro com agitação constante na presença de tampão de marcação (HEPES 50 mM, pH 8,0). A proteína marcada com FITC foi separada do FITC não ligado usando uma coluna HiTrap *Desalting* (GE Healthcare). Os ligantes foram solubilizados em tampão contendo HEPES 50 mM, pH 8,0 e etanol a 1%. Para os ensaios, foram preparadas 16 soluções diferentes de proteína: ligante, contendo em cada uma o mesmo volume de BnSP-7 marcado com FITC (0,425 mM), além de concentrações crescentes de cada um dos ligantes, sendo as concentrações de estoque dos ligantes: CaA - 0,5 mM, CuA - 1 mM e CiA - 2,5 mM. Após 10 minutos de incubação, cada solução foi transferida individualmente para um capilar (NT.115, NanoTemper Technologies) e medida com uma potência LED de 20-40% e uma potência MST de 40%. O K_D

(constante de dissociação) foi determinado por ajuste não-linear das respostas de termoforese usando termoforese com *T jump* como Estratégia de Avaliação do MST no MO. *Software* de análise de afinidade v.2.1.2.

2.7. Cristalização, coleta e processamento de dados de raios-X

Experimentos de co-cristalização foram executados utilizando a BnSP-7 nativa diluída em água deionizada na concentração de 10 mg. mL⁻¹. Os ligantes foram dissolvidos em uma solução contendo etanol a 50% e piridina a 50% de modo a se atingir proporção molecular de proteína: ligante de 10:1 nas gotas de cristalização. Para os experimentos de cristalização da BnSP-7 recombinante, se utilizou a proteína diluída em 50 mM do tampão formato de amônio, pH 3,5. Os cristais foram obtidos pelo método de difusão de vapor, no sistema *hanging-drop* (McPHERSON, 2003), em que as gotas dos experimentos de co-cristalização da BnSP-7 nativa foram compostas de 1 µL da solução de proteína, 0,2 µL da solução de ligante e 0,8 µL da solução do reservatório. Nos experimentos de cristalização da BnSP-7 recombinante, as gotas foram compostas de 1 µL da solução de proteína e 1 µL da solução do reservatório. Na montagem da placa, o reservatório continha 500 µL de solução de reservatório.

Para os complexos de BnSP-7 nativa com ligantes, a solução do reservatório consistiu em 30% (w/v) de polietileno glicol 4000 (PEG 4000), 100 mM Tris-HCl pH 8,5 e 150-200 mM de sulfato de lítio. Os melhores cristais foram obtidos a 291 K após aproximadamente duas a três semanas para todos os complexos proteicos. Os cristais da BnSP-7 nativa foram obtidos a partir da mesma solução de reservatório empregando gotas de 1 µL da solução de proteína e 1 µL da solução de reservatório.

Os testes de cristalização da BnSP-7 recombinante foram inicialmente realizados através do método da matriz esparsa (JANKARIK & KIM, 1991), utilizando o quite JCSG Core Suite I (QIAGEN©) composto por 96 soluções de cristalização. A condição na qual foram obtidos os

melhores cristais consistia em 50% (v/v) de hexileno glicol (MPD), 100 mM Tris-HCl pH 8,5 e 200 mM de fosfato de amônio. Os melhores cristais foram obtidos a 291 K após aproximadamente duas semanas.

Os dados de difração de raios-X foram coletados a um comprimento de onda de 1,459-1,500 Å para todos os cristais, que foram submetidos à fonte de radiação síncrotron (linha MX2, Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, LNLS, Campinas, Brasil) e um detector PILATUS 2M (DECTRIS Ltd.). Os cristais foram montados em *loops* de nylon e mantidos em temperatura criogênica através de fluxo de gás nitrogênio a 100 K, sem a presença de crioprotetor. Os dados foram processados utilizando o pacote de programas HKL (OTWINOWSKI & MINOR, 1997).

2.8. Determinação da estrutura e refinamento

As estruturas cristalográficas obtidas da BnSP-7 nativa, BnSP-7 complexada com ácido cafeico (BnSP-7/CaA), BnSP-7 complexada com ácido cinâmico (BnSP-7/CiA) e BnSP-7 complexada com ácido *p*-cumárico (BnSP-7/CuA) foram resolvidas pelo método de substituição molecular utilizando para isso, o programa Phaser-MR, parte integrante do pacote de programas PHENIX (ADAMS *et al.*, 2010). Foi utilizado como estrutura modelo as coordenadas cristalográficas da BnSP-7 na forma apo (PDB: 1PA0 - MAGRO *et al.*, 2003). O processo de modelagem foi realizado com ajustes manuais utilizando o programa Coot (EMSLEY *et al.*, 2010) e o mapa de densidade eletrônica calculado com os coeficientes $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$. Os modelos foram refinados e melhorados pela análise do *R-work* (BRUNGER *et al.*, 1998), através de ciclos de refinamento cristalográfico, considerando os seguintes parâmetros: correção do fator de solvente; refinamento do corpo rígido, considerando cada monômero como um grupo; refinamento posicional, de deslocamento atômico e fator de temperatura (*B-factor* individuais), utilizando o pacote de programas PHENIX (ADAMS *et al.*, 2010).

2.9. Comparação e caracterização do canal hidrofóbico e dos túneis por análises de bioinformática

Para a caracterização do canal hidrofóbico, foram utilizadas as seguintes estruturas, com o código de identificação no Protein DataBank entre parênteses (PDB ID): BthTX-I/PEG4000 (3IQ3), BthTX-I/BPB dimérica (*p*-brometo de bromofenacil) (3HZW) (FERNANDES *et al.*, 2010), BthTX-I/ α -tocoferol (3CXI), PrTX-I/ α -tocoferol (3CYL) (DOS SANTOS *et al.*, 2009), PrTX-I/ácido rosmarínico/PEG330 (3QNL) (DOS SANTOS *et al.*, 2011), PrTX-I/ácido cafeico/PEG4000 (4YU7), PrTX-I/ácido aristolóquio/PEG4000 (4YZ7) (FERNANDES *et al.*, 2015), MjTX-II/ácido esteárico (1XXS) (WATANABE *et al.*, 2005), MjTX-II/PEG4000 (4KF3) (SALVADOR *et al.*, 2013), e MjTX-II/suramina/PEG4000 (4YV5) (SALVADOR *et al.*, 2015). Para garantir a correta caracterização físico-química, os resíduos imprecisos de cada modelo foram modelados automaticamente pelas funções *mutate* e *autofit* no programa COOT e refinamento *sphere* a 3,0 Å usando dados de difração depositados (EMSLEY *et al.*, 2010).

Foi utilizado o programa MOLE (SEHNAL *et al.*, 2013) para localizar e caracterizar as propriedades químicas das cavidades, ou seja, do canal hidrofóbico. Dentro dele, avaliamos a acessibilidade do canal hidrofóbico através de cálculos de túneis, que é o caminho dentro do canal hidrofóbico, usando cada resíduo de His48 como ponto de partida. Este aminoácido é o resíduo mais profundo que interage com diferentes ligantes encontrados no canal hidrofóbico, tais como íons de zinco, brometo de *p*-bromofenil (BPB), ácidos graxos e moléculas de polietileno glicol (PEG) (BORGES *et al.*, 2017).

Foram utilizadas as opções padrão, exceto os parâmetros *probe radius* e *bottle neck radius*, que foram alterados para 4 e 1,4, respectivamente, para garantir a uniformidade do cálculo do túnel. Nos casos em que mais de um túnel foi encontrado, escolhemos o que teve melhor ocupação de PEG/ácido graxo.

2.10. Clonagem, expressão e purificação da BnSP-7 recombinante (rBnSP-7)

2.10.1. Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose foi realizada em gel a 1% de agarose dissolvido em tampão 1X TAE (Tris-Acetato 40mM; EDTA 2mM, pH 8,5) e contendo brometo de etídeo (0,5 g/ml) (Gibco). Nas amostras foram adicionados tampão de amostra 2x contendo azul de bromofenol 0,1%, SDS 1%, glicerol 50% e EDTA- Na_2 0,1M. A eletroforese foi realizada sendo aplicada uma corrente de 90 V em tampão TAE 1X. Após a migração, o gel de agarose foi visualizado em um transluminador de luz ultravioleta (UV).

2.10.2. Obtenção do vetor para expressão da rBnSP-7 em *Pichia pastoris*

O vetor pPicZ α A, contendo a ORF (*open reading frame*) para a expressão da fosfolipase A₂ BnSP-7 foi obtido a partir de síntese gênica pela GeneArt (Life Technologies™). A ORF referente à BnSP-7 foi inserida no vetor a partir dos sítios de restrição *EcoRI* (3' DNA) e *NotI* (5' DNA) (**Figura 7**).

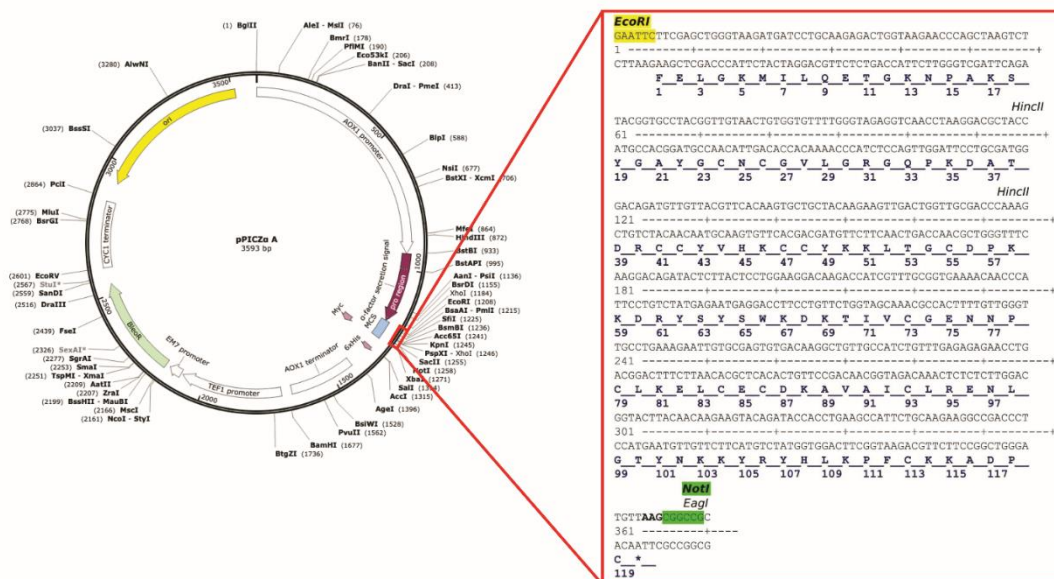


Figura 7: Representação esquemática do vetor pPicZ α A e detalhe da sequência de nucleotídeos do plasmídeo recombinante clonado pPicZ α A-BnSP7. A ORF da BnSP-7 está inserida subjacente ao α -factor, e apresenta um

sítio de restrição para *EcoRI*. O gene foi inserido de modo que a proteína fosse expressa sem cauda de poli histidina na porção C-terminal. O códon que indica o fim da transcrição está em negrito. Os sítios de clivagem para as enzimas de restrição estão *EcoRI* e *NotI* em amarelo e verde, respectivamente.

2.10.3. Preparo de bactérias (DH5 α) competentes para choque térmico com CaCl₂

Para receber o vetor pPicZ α A foi necessário tornar as células de *E. coli*, linhagem DH5 α competentes. Esse processo foi realizado a partir de um pré-inóculo de bactérias original, ou seja, que ainda não receberam o plasmídeo, em 5 mL de meio LB, a 37°C, 200 rpm por 16 horas. Desse pré-inóculo, 2 mL foram diluídos em 100mL de meio LB, nas mesmas condições do pré-inóculo até atingir a absorbância a 600nm de aproximadamente 0,4. A partir disso, a cultura foi centrifugada a 2450 $\times g$ durante 7 minutos. Descartado o sobrenadante, as células foram ressuspensas em 35 mL de CaCl₂ 0,1M gelado e estéril e deixado em repouso por 20 minutos no gelo. Após este procedimento, essa solução foi novamente centrifugada a 2450 $\times g$ por 7 minutos, sendo que foi descartado o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 8 mL de CaCl₂ 0,1M, acrescido de 2 mL de glicerol 50%. Esse material foi separado em alíquotas e mantido a – 80°C.

2.10.4. Transformação de células de *Escherichia coli* (DH5 α)

Para realizar a transformação de *E. coli* DH5 α foram utilizados 100 μ L de bactérias competentes e adicionados 5 μ L de plasmídeos recombinantes. Após esta etapa, essa solução permaneceu incubada a 42°C por 1 minuto e 20 segundos e em seguida por 3 minutos no gelo. Subsequentemente foram adicionados 800 μ L de meio LB *low salt* a essa solução, que foi deixada em repouso a 37°C por 1 hora. Esse material foi plaqueado em LB *low salt* ágar, contendo 25 μ g/ μ L do antibiótico zeocina. As placas contendo 50, 100 e 200 μ L de bactérias transformadas foram preparadas e incubadas por 16 horas a 37°C (**Figura 8**).

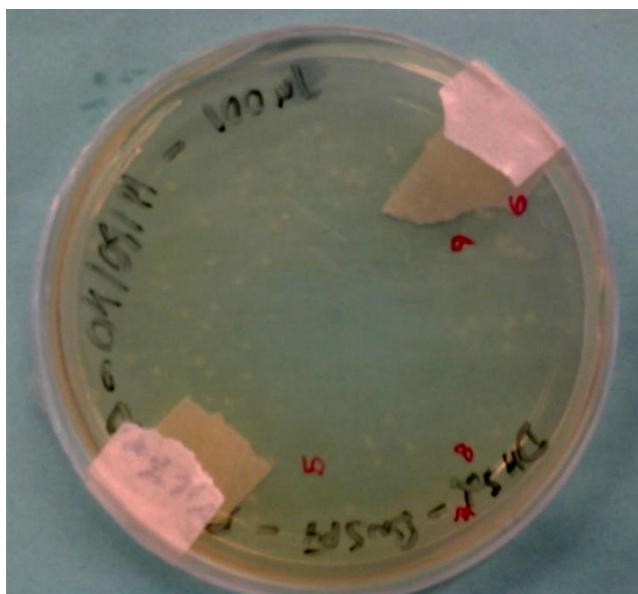


Figura 8: Placa dos transformantes em DH5 α contendo 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de zeocina e 100 μL de bactérias transformadas.

2.10.5. Preparação do DNA plasmidial por lise alcalina (*Miniprep*)

Visando a obtenção de DNA plasmidial, foram selecionadas algumas colônias para fazer um pré-inóculo em 10 mL de meio LB *low salt* líquido contendo 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de zeocina, incubados por 16 horas a 37°C e 250 rpm. Após esta etapa o material foi submetido à lise alcalina (*Miniprep*) para extração do plasmídeo, segundo Sambrook *et al.*, 2001. A cultura foi centrifugada por 5 minutos a 4°C e 3800 xg , descartando-se o sobrenadante. As células foram ressuspendidas em 600 μL da solução I contendo 50mM dextrose, 25mM Tris HCl, 10 mM EDTA gelado. A essa solução foram adicionados 10 μL de RNase 20 mg/mL e incubados por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 200 μL da solução II contendo 0,2M NaOH, 1% (w/v) SDS e 350 μL da solução III contendo 5M de acetato de potássio, 23% ácido acético gelada, homogeneizando e posteriormente incubando por 5 minutos. Posteriormente a cultura foi incubada por 3 minutos no gelo e centrifugada a 18000 xg por 10 minutos a 4°C. Após esta etapa, foram realizadas adições sequenciais de etanol 100% e 70% seguidos de centrifugação a 18000 xg a 4°C e deixados secar a temperatura ambiente. Em

seguida, foram adicionados 20 μ L de água deionizada e incubado por 30 minutos a 42°C. Após esse procedimento, o material foi quantificado por espectrofotometria ótica a 260 nm em um equipamento *Nanodrop* (ND-1000 spectrophotometer Thermo-Scientific) e visualizado em gel de agarose a 1%, visando confirmar a presença do vetor.

2.10.6. Linearização do plasmídeo pPicZ α A-BnSP7 com enzima de restrição *PmeI*

A reação de linearização do plasmídeo pPicZ α A-BnSP7 foi preparada utilizando tampão da enzima 1X, 20 U da enzima *PmeI*, cerca de 10 μ g do material obtido da *miniprep* e água Milli-Q, totalizando 100 μ L. A reação foi incubada a 37°C por quatro horas, a enzima *PmeI* foi inativada a 65°C por 20 minutos e a reação foi analisada em gel de agarose a 1% para confirmação da linearização.

O material linearizado foi precipitado adicionando-se acetato de sódio 3M, pH 5,2 e etanol 100% gelado. Essa solução permaneceu por 20 minutos a -80°C e posteriormente foi centrifugado a 15500 xg por 10 minutos. Em seguida, ao *pellet* foram adicionados 500 μ L de etanol 80% gelado, novamente centrifugado a 15500 xg por 10 minutos a temperatura ambiente, ressuspenso em 10 μ L de água deionizada e quantificado por espectrofotometria ótica a 260 nm em um equipamento *Nanodrop* (ND-1000 spectrophotometer Thermo-Scientific).

2.10.7. Preparo das células competentes de *P. pastoris*

O preparo das células *P. pastoris*, linhagem KM71H competentes foi realizado segundo protocolo descrito por Cregg, 2007. Foi realizado um pré-inóculo da célula original de *P. pastoris*, em 5 mL de meio YPD e incubado por 9 horas a 30°C e 250 rpm. Desse pré-inóculo, 50 μ L foram retirados e adicionados em Erlenmeyer de 500 mL, contendo 50 mL de meio YPD. Esse material foi incubado a 30°C e 250 rpm até atingir absorbância a 600nm de 1,2. Ao atingir a DO, a cultura foi centrifugada a 1500 xg , 4°C por 5 minutos e ressuspenso em 10 mL de YPD

acrescido de 170mM de HEPES. Posteriormente, foram adicionados a essa solução 250 μ L de ditioneitol (DTT). Esse material foi incubado a 30°C por 15 minutos sem agitação. Em seguida, foi adicionado água deionizada estéril até volume final de 50 mL e centrifugado a 1500 $\times g$, por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e 25 mL de água destilada estéril foram adicionados as células e repetido o passo de centrifugação. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e foram adicionados 2 mL de sorbitol 1M estéril, centrifugando as células a 1500 $\times g$, por 5 minutos a 4°C. Novamente o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 100 μ L de sorbitol 1M estéril e mantida a -20°C.

2.10.8. Transformação das células competentes de *P. pastoris* por eletroporação

Em um tubo de 1,5mL foram colocados 5 μ L de DNA linearizado e 40 μ L de células competentes. Essa solução foi transferida para cubeta 0,2 cm (Bio-Rad) e incubadas por 5 minutos no gelo. Esse material recebeu um pulso de eletroporação nas condições de 1500V, 25 μ F e 200 Ω , em aparelho GenePulser II (Bio-Rad). Imediatamente após o choque, foi adicionado às células 1mL de sorbitol 1M a cubeta e transferido para um tubo de 15 mL. As células foram incubadas a 30°C por 2 horas sem agitação. Posteriormente 50, 100 e 200 μ L das células foram plaqueadas em placas contendo YPDS ágar contendo 100 ou 500 μ g/ μ L de zeocina, onde permaneceram incubadas a 30°C por 4 dias.

2.10.9. Triagem em pequena escala da expressão heteróloga em *P. pastoris*

Para avaliação das condições de expressão da proteína recombinante, foram selecionadas colônias da transformação em *P. pastoris* e individualmente inoculadas em tubos falcon de 50 mL, contendo 6 mL de meio BMGY (1% extrato de levedura, 2% peptona, 1,34% YNB, 4.10⁻⁵% biotina, 1% glicerol, 100 mM fosfato de potássio). Os tubos de triagem foram incubados a 30°C sob agitação constante de 250 rpm. Após 48 h, as culturas foram centrifugadas a 1500 $\times g$,

descartando o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 4 mL de meio BMMY (1% extrato de levedura, 2% peptona, 1,34 % YNB, $4 \cdot 10^{-5}$ % biotina, 1% metanol, 100 mM fosfato de potássio pH 6,0), para a indução da expressão. Em seguida, as culturas foram incubadas a 26°C sob agitação constante. A indução foi mantida a partir a adição de metanol 100% em uma concentração final de 0,75% a cada 24 h. Foram coletadas alíquotas da indução nos tempos de 0h a 144 h e centrifugadas a 5000 *xg* por 5 minutos. Os sobrenadantes foram então analisados em gel SDS-PAGE a 13%, corado com nitrato de prata para determinação dos níveis de expressão.

2.10.10. Indução em larga escala

As colônias que apresentaram níveis de expressão satisfatórios na triagem em placa foram selecionadas e individualmente foi realizado pré-inóculo à 30°C em Erlenmeyer de 125 mL contendo 10 mL de meio BMGY (1% extrato de levedura, 2% peptona, 1,34% YNB, $4 \cdot 10^{-5}$ % biotina, 1% glicerol, 100 mM fosfato de potássio pH 6,0). Esse pré-inóculo foi diluído em 500mL de meio BMGY, nas mesmas condições do pré-inóculo até que a absorbância a 600 nm estivesse entre 5 e 6. Atingida a absorbância requerida, a cultura foi centrifugada a 1500 *xg*, por 5 minutos e o *pellet* ressuspensado em 100 mL de meio BMMY, que consiste em base (extrato de levedura e peptona); tampão fosfato de potássio 1M, pH6,0; YNB 10X; biotina 0,02 mg/ml e metanol a 0,05%. Coletou-se uma alíquota de 1mL (0h) para verificação da expressão proteica basal. 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. O restante da cultura foi centrifugado a 6000 *xg* e reservado o sobrenadante. As alíquotas coletadas ao longo do processo receberam a adição do tampão da amostra (Tris HCl 1,25 M pH 6,8, SDS a 10% (m/v), glicerol a 30% (v/v), azul de bromofenol a 0.1% (m/v) e β -mercaptoetanol a 15% (v/v)) e foram posteriormente analisadas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 13% (LAEMMLI, 1970).

2.10.11. Isolamento da fosfolipase recombinante BnSP-7: Purificação de proteínas produzidas em *P. pastoris*

O sobrenadante obtido da indução foi filtrado em filtro Millex[®] HV PVDF, 0,45µm de Poro (Millipore[®]), concentrado e teve o tampão alterado para formato de amônio 50mM, pH 3,5 utilizando centricon Vivaspin 3 kDa MWCO (GE Healthcare) e fracionado em coluna de gel filtração HiLoad[™] 26/600 Superdex 75. A coluna foi previamente equilibrada com 5 volumes de tampão formato de amônio 50mM, pH 3,5 e a eluição ocorreu com 2 volumes do mesmo tampão. As frações obtidas foram analisadas em SDS-PAGE a 13%.

Capítulo 3:

**ESTUDOS DA INTERAÇÃO DE LIGANTES DERIVADOS DO ÁCIDO CINÂMICO COM
O SITIO MDoS**

3.1 Resultados

3.1.1. Purificação da BnSP-7

O veneno bruto de *B. pauloensis* foi aplicado em coluna de troca iônica CM-FF, com um gradiente linear 50-500 mM de bicarbonato de amônio (pH 8,0). Foram obtidas três frações, nomeadas de CM1 a CM3 (**Figura 9A**). A fração que continha massa molecular coerente com fosfolipases A₂ (fração CM3, ~14 kDa) (**Figura 9C**) foi submetida a cromatografia de fase reversa, sendo aplicada em coluna C-18 (SUPELCO, Sigma-Aldrich), com um gradiente de 0-70% de 0,1% TFA em 66,5% acetonitrila (**Figura 9B**). A cromatografia de fase reversa resultou em cinco picos, em que a BnSP-7 corresponde ao primeiro pico, observado em SDS-PAGE à 13% (**Figura 9C**). O rendimento da purificação foi verificado a partir de quantificação a 280 nm em *Nanodrop* (ND-1000 spectrophotometer Thermo-Scientific) a cada passo cromatográfico e foi estimada em cerca de 7 mg de BnSP-7 a cada 100 mg de veneno bruto. A integridade estrutural da BnSP-7 purificada foi atestada por espectroscopia de dicroísmo circular, onde foi obtido um espectro de CD que apresentou características típicas, como a alta presença de alfa hélices (valores mínimos de $[\theta]$ em 222 nm e 208 nm e máximo em 191 nm), como o esperado para fosfolipases A₂ (**Figura 9D**).

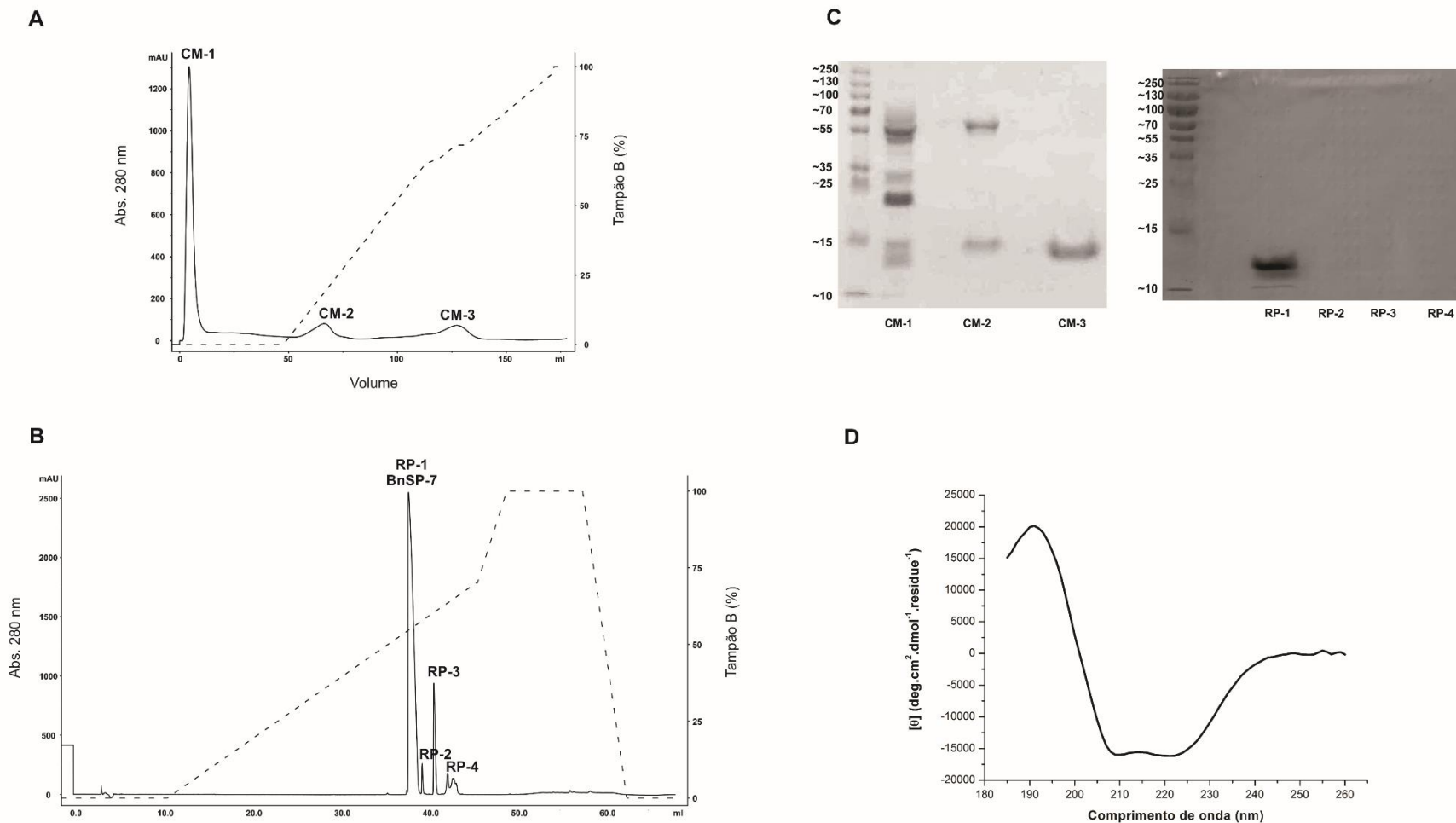


Figura 9: Purificação da BnSP-7 a partir do veneno bruto de *B. pauloensis* em protocolo de cromatográfica em duas etapas. **(A)** Fracionamento do veneno bruto de *B. pauloensis* por cromatografia de troca iônica (Hi Trap CM Sepharose Fast Flow), que resultou em três frações, CM1, CM2 e CM3. **(B)** Fracionamento do pico CM3 por cromatografia de fase reversa em coluna C18 (SUPELCO), resultando em cinco picos, na qual a BnSP-7 foi obtida na fração RP-1. **(C)** SDS-PAGE a 13% das dos passos cromatográficos de troca iônica e fase reversa, demonstrando a presença da BnSP-7 na fração CM3 e sua purificação na fração RP-1. **(D)** Espectro de dicroísmo circular da BnSP-7 purificada.

3.1.2. Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

Os experimentos de Espalhamento Dinâmico de Luz foram realizados a 291 K (temperatura de cristalização) com a apo-BnSP-7 indicaram uma média de raio hidrodinâmico (R_H) de 2,2 nm com polidispersidade de 10,7%. A função de autocorreção e o ajuste de regularização baseada no algoritmo CONTIN das medidas realizadas estão apresentadas na **Figura 10**. A informação da dinâmica das partículas nos experimentos de DLS é derivada a partir da flutuação da intensidade espalhada pela amostra durante um intervalo de tempo definido no experimento. A curva de auto correlação é gerada a partir da função de auto correlação, considerando amostras monodispersas, porém no caso de amostras polidispersas, um algoritmo regulariza os dados gerando um erro do ajuste, mostrado no inserto da **Figura 10**.

O valor de R_H obtido corresponde a uma massa molecular de aproximadamente 21 kDa e é, portanto, equivalente a conformação dimérica. Além disso, os valores de R_H e polidispersividade obtidos da BnSP-7 são equivalentes a valores previamente obtidos por outras PLA₂-like botrópicas na conformação dimérica (FERNANDES *et al.*, 2010; SALVADOR *et al.*, 2013).

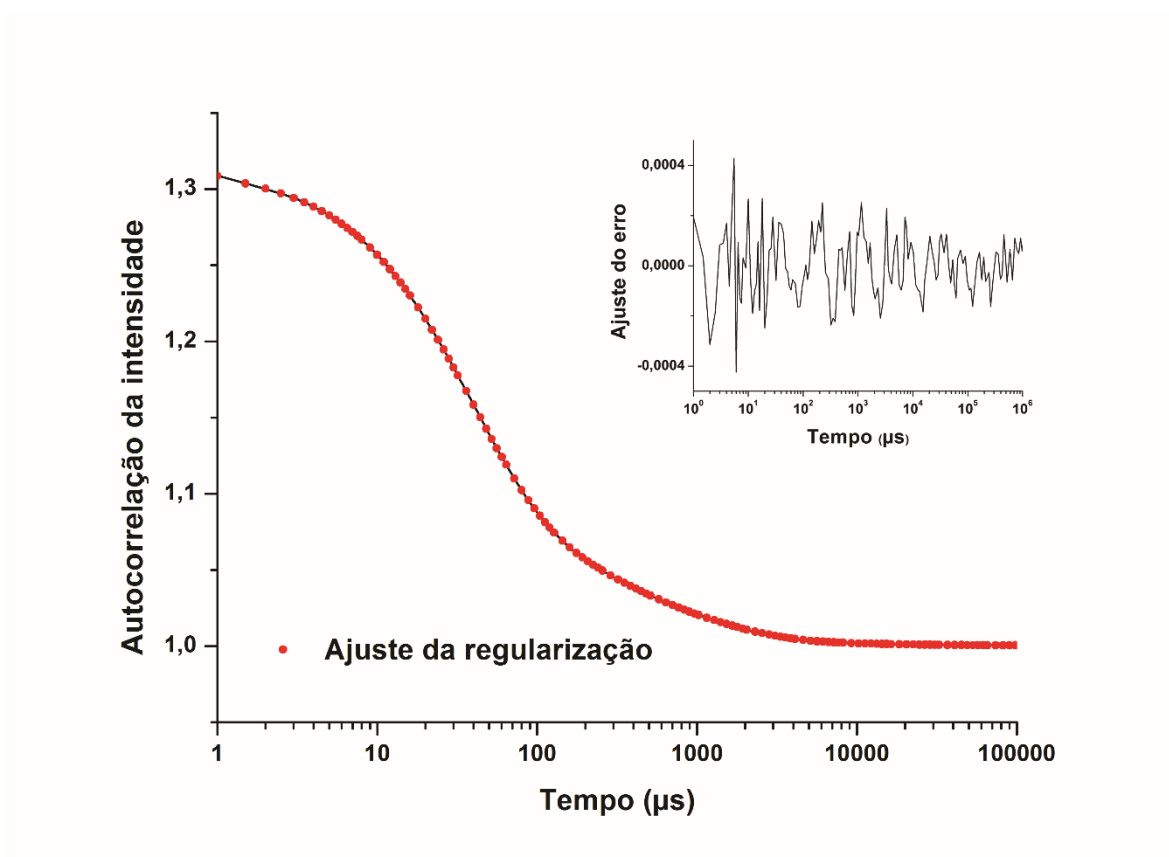


Figura 10: Função de auto correlação e o ajuste de regularização (erro do ajuste mostrado no inserto) baseada no algoritmo CONTIN das medidas de espalhamento dinâmico de luz da BnSP-7 a 291 K.

3.1.3. Espectroscopia UV-visível e de fluorescência

Os derivados do ácido cinâmico (CaA, CiA e CuA) mostraram absorbância no comprimento de onda na faixa de 225-300 nm, que são os mesmos comprimentos de onda de absorbância presentes em proteínas típicas. Contudo, CaA e CuA também possuem comprimentos de onda de absorbância superiores a 300 nm (até 420 nm para o ácido cafeico e 370 nm para o ácido *p*-cumárico). Assim, as diferenças nos espectros de emissão de fluorescência de CaA e CuA na presença da BnSP-7 que permitem comprimentos de onda de excitação acima de 310 nm podem indicar que os ligantes estão interagindo com a toxina em solução.

CaA e CuA apresentam emissão máxima de fluorescência a 466 nm e 438 nm, respectivamente (**Figura 11**), indicando que CuA é mais apolar do que CaA. Como a única

diferença entre essas moléculas é um radical hidroxila extra no grupo fenil do CaA, este radical hidroxila é responsável pela diferença na polaridade entre CaA e CuA observada pela espectroscopia de fluorescência. A complexação de CaA e CuA com a BnSP-7 diminui a emissão de fluorescência do ligante (**Figura 11**). Isso pode ser devido aos ligantes estarem em um ambiente mais polar na presença da proteína. Isso pode ser atribuído às interações eletrostáticas formadas entre os ligantes, os resíduos polares de BnSP-7 e as moléculas de água da vizinhança (seção 3.1.5).

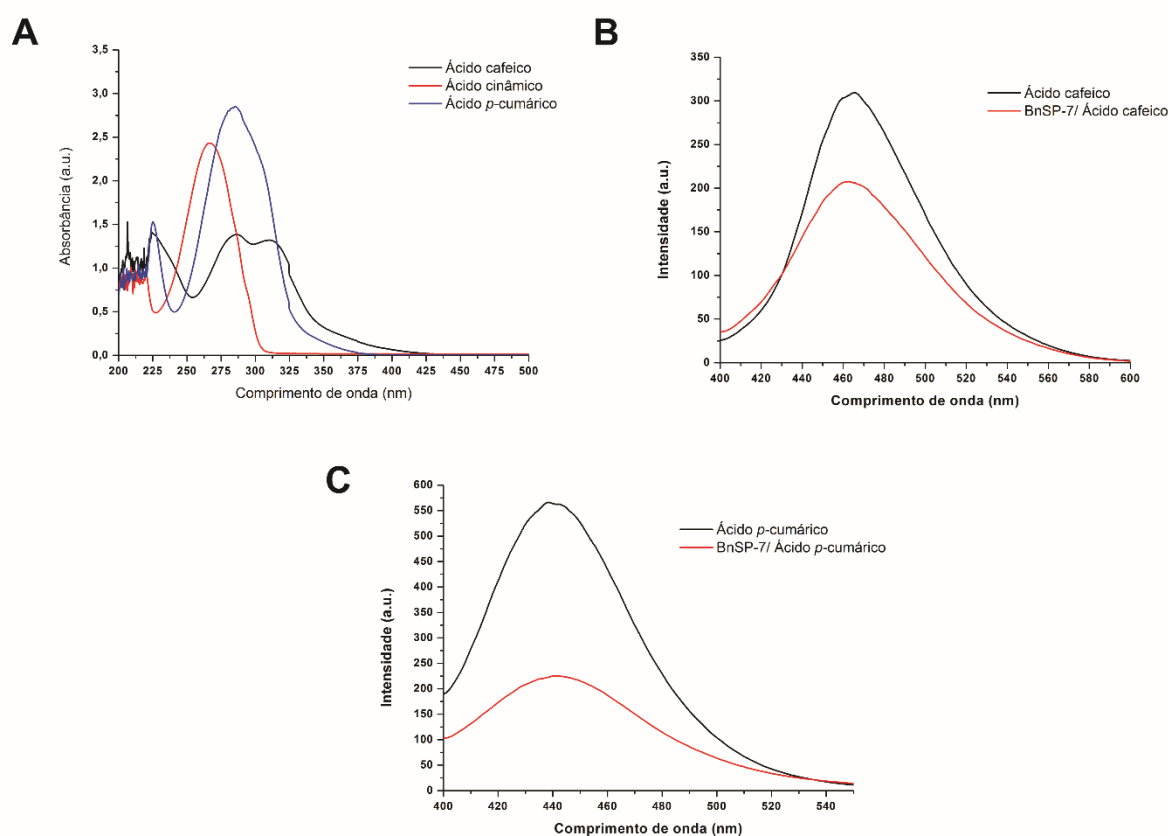


Figura 11: Espectroscopia de fluorescência e ultravioleta do ácido cinâmico e seus derivados e a BnSP-7. **(A)** Espectroscopia UV-visível do ácido cafeico (linha preta); Ácido cinâmico (linha vermelha) e ácido *p*-cumárico (linha azul); **(B)** Fluorescência estática do ácido cafeico sozinho (linha preta) e complexado com a BnSP-7 (linha vermelha) com uma onda de excitação a 345 nm; **(C)** Fluorescência estática do ácido *p*-cumárico sozinho (linha preta) e complexada com a BnSP-7 (linha vermelha) com uma onda de excitação a 330 nm.

3.1.4. Termoforese em microescala (MST)

Os ensaios de termoforese (MST) mostraram as seguintes constantes de dissociação (K_D) de cada ligante para BnSP-7: $20 \pm 10 \mu\text{M}$ (ácido cafeico (CaA)), $150 \pm 20 \mu\text{M}$ (ácido *p*-cumárico (CuA)) e $300 \pm 50 \mu\text{M}$ (ácido cinâmico (CiA)). Na **Figura 12** são mostradas curvas típicas de MST para cada ligante. Estes valores de K_D demonstraram que todos os ligantes interagem com a toxina em solução, porém o ácido cafeico apresenta uma afinidade 15 vezes maior em comparação com o ácido cinâmico e afinidade 7,5 vezes maior do que o ácido *p*-cumárico. O motivo dessas diferenças é provavelmente as interações eletrostáticas adicionais feitas pelo grupo aromático de CaA com BnSP-7 em comparação com outros ligantes (seção 3.1.5).

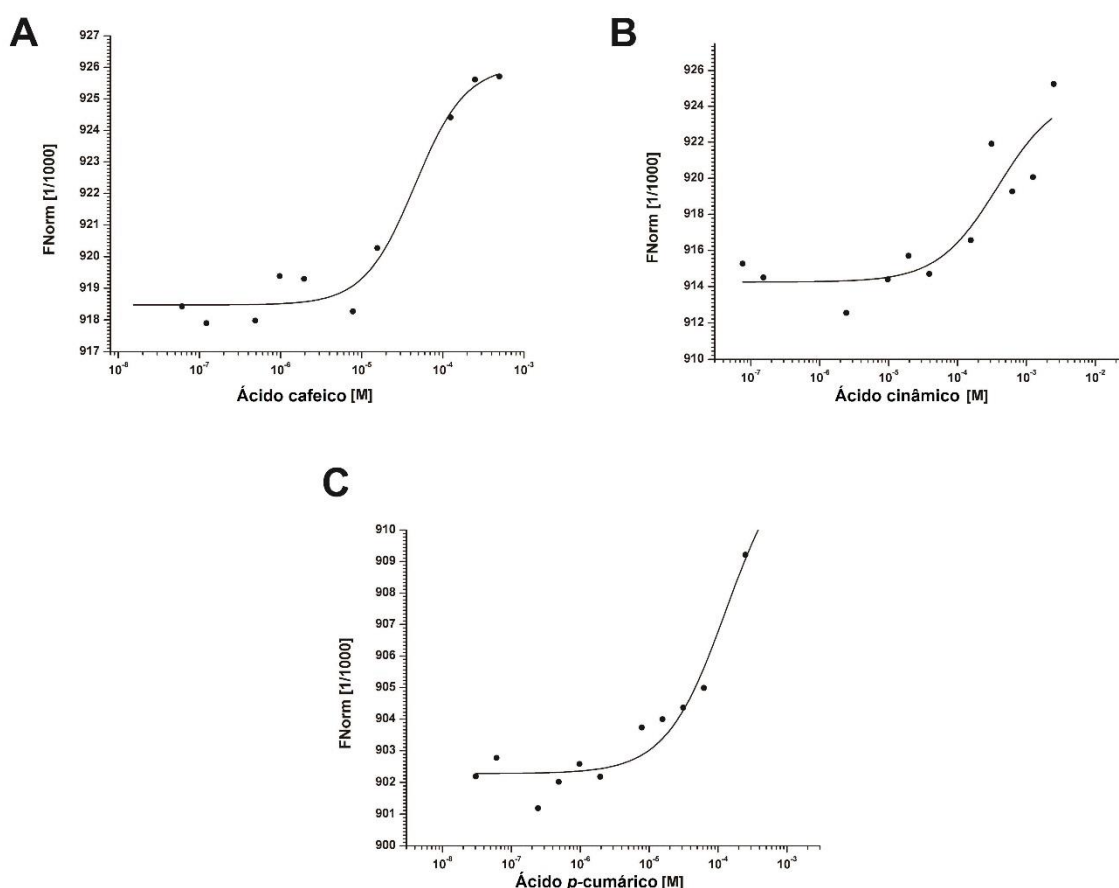


Figura 12: Medidas de termoforese (MST) da afinidade de ligação entre a BnSP-7 e os ligantes (A) ácido cafeico, (B) ácido cinâmico e (C) ácido *p*-cumárico. Os ajustes de K_D são mostrados como linhas pretas. A fluorescência normalizada está no eixo y contra a concentração do ligante no eixo x. As medidas foram feitas com 20 a 40% de

potência LED e 40% de potência laser. As curvas de ligação do MST foram ajustadas por termoforese com T_{jump} como estratégia de avaliação do MST no MO. Software de análise de afinidade v.2.1.2.

3.1.5. Co-cristalização e estruturas cristalográficas dos complexos BnSP-7/CaA, BnSP-7/CiA e BnSP-7/CuA.

Cristais da BnSP-7 nativa, isolada do veneno de *Bothrops pauloensis* na conformação nativa e complexada com ácido cafeico (BnSP-7/CaA), ácido cinâmico (BnSP-7/CiA) e ácido *p*-cumárico (BnSP-7/CuA) (**Figura 13**) foram obtidos em condições semelhantes e difrataram a alta resolução. Todos os cristais foram isomorfos e apresentaram simetria do grupo espacial $P2_1$ (**Tabela 1**). Os refinamentos convergiram para valores finais de R de 16,3% ($R_{free} = 19,1\%$), 20,6% ($R_{free} = 24,0\%$), 21,7% ($R_{free} = 26,0\%$) e 17,1% ($R_{free} = 21,4\%$), respectivamente para BnSP-7 nativa, BnSP-7/CaA, BnSP-7/CiA e BnSP-7/CuA (**Tabela 1**). Nas estruturas BnSP-7/CiA e BnSP-7/CuA pôde ser observado um valor R_{merge} ligeiramente elevado (**Tabela 1**), porém durante o processamento uma resolução mais elevada foi mantida de maneira a ser possível modelar corretamente. Além disso, é descrito na literatura (KARPLUS & DIEDERICH, 2012) que valores de $CC_{1/2}$ são indicadores precisos da qualidade dos dados, em que valores acima de 75% estão relacionados com dados de boa qualidade.

Os modelos finais mostraram qualidade estereoquímica compatível com estruturas de mesma resolução, como indicado pelo desvio médio das distâncias das ligações e dos ângulos e pela análise do gráfico de Ramachandran (**Tabela 1**).

Conforme observado para a maioria das proteínas Lys49-PLA₂ diméricas, duas possíveis conformações diméricas podem ser observadas nas células unitárias das estruturas obtidas. As estruturas foram refinadas usando o "dímero compacto" (anteriormente referido como "dímero alternativo" (FERNANDES *et al.*, 2014)) porque a outra possibilidade de dímero (denominada "dímero grande" ou "dímero convencional") apresentou energia livre desfavorável e/ou exibiu

uma pequena área de interface quando examinada no pacote de software PISA (www.ebi.ac.uk/pdbe/pisa (KRISSINEL& HENRICK, 2007)) (**Tabela 2**).

Resultados semelhantes foram obtidos para outras proteínas Lys49-PLA₂ botrópicas presentes no PDB. Portanto, o dímero compacto é a estrutura mais provável que ocorre em solução (DOS SANTOS, SOARES & FONTES, 2009). Além disso, outras evidências experimentais, como a análise de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS), corroboram os resultados (MURAKAMI *et al.*, 2007).

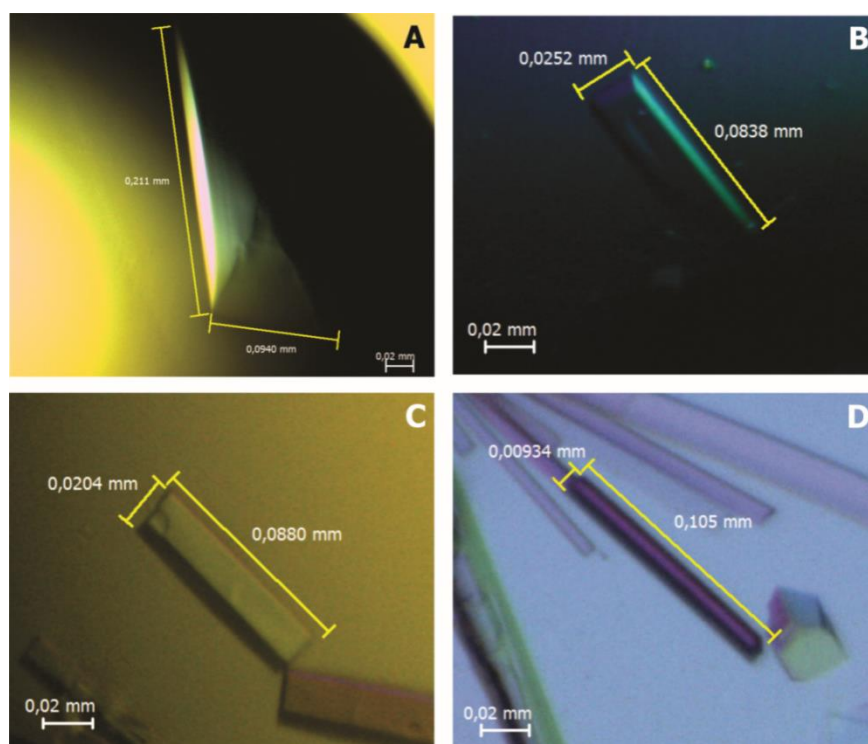


Figura 13: Cristais da BnSP-7 nativa isolada do veneno de *Bothrops pauloensis* na forma nativa e complexada com ligantes. **(A)** BnSP-7 nativa, **(B)** BnSP-7 co-cristalizada com ácido cafeico (BnSP7/CaA), **(C)** BnSP-7 co-cristalizada com ácido cinâmico (BnSP-7/CiA) e **(D)** BnSP-7 co-cristalizada com ácido *p*-cumárico (BnSP-7/CuA).

Tabela 1: Dados de difração de raios-X e estatísticas de refinamento das estruturas cristalográficas. **(A)** BnSP-7 nativa, **(B)** BnSP-7 co-cristalizada com ácido cafeico (BnSP7/CaA), **(C)** BnSP-7 co-cristalizada com ácido cinâmico (BnSP-7/CiA) e **(D)** BnSP-7 co-cristalizada com ácido *p*-cumárico (BnSP-7/CuA).

	BnSP-7	BnSP-7/CaA	BnSP-7/CiA	BnSP-7/CuA
Resolução (Å)	23,6-1,59 (1,65-1,59) ^a	26,3-2,08 (2,16-2,08) ^a	45,5-2,39 (2,47-2,39) ^a	45,5-2,06 (2,13-2,06) ^a
Grupo espacial	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁
Célula unitária a,b,c (Å), β(°)	45,4; 59,6; 58,6; 95,7	45,6; 59,1; 58,5; 95,8	45,8; 58,7; 58,1; 95,9	45,8; 58,0; 58,0; 96,0
Reflexões únicas	40956 (3811) ^a	18143 (1633) ^a	12111 (1084) ^a	18099 (1467) ^a
Completeza (%)	98,1 (92,2) ^a	97,6 (88,8) ^a	98,5 (88,0) ^a	95,9 (80,0) ^a
I/sigma (I)	7,9 (3,9) ^a	4,4 (1,9) ^a	8,5 (1,9) ^a	9,95 (2,3) ^a
CC1/2 (%)	86,3	79,9	79,4	86,8
R_{merge} (%)^b	9,4 (32,8) ^a	14,3 (45,8) ^a	17,5 (60,3) ^a	15,5 (55,0) ^a
R_{work} (%)^c	16,3 (17,9) ^a	20,6 (26,5) ^a	21,7 (32,1) ^a	17,1 (23,9) ^a
R_{free} (%)^d	19,1 (20,9) ^a	24,0 (33,9) ^a	26,0 (39,9) ^a	21,4 (28,3) ^a
Número de átomos não hidrogênio^e	2341	2135	2012	2203
Proteína	1882	1870	1858	1890
Ligantes	30	38	57	75
Águas	429	227	97	238
RMS (comprimento ligações)^e	0,022	0,005	0,065	0,007
RMS (ângulos)^e	1,81	0,96	2,49	1,09
Ramachandran favoráveis/não favoráveis (%)^e	95/0	94/0	94/1,4	92/0,93
Clashscore	3,2	5,1	14,1	3,9
B-factor^e	25,4	36,1	37,8	33,6
Proteína	22,9	35,0	37,0	31,6
Ligantes	40,2	67,9	66,6	74,5
Solvente	35,5	39,9	35,1	37,1

^aNúmeros entre parênteses representam os valores da camada de mais alta resolução. ^b $R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} (\sum_i (|I_{hkl,i}| - \langle I_{hkl} \rangle)) / \sum_{hkl} \langle I_{hkl} \rangle$, onde $I_{hkl,i}$ é a intensidade de uma medida individual de uma reflexão com índices de Miller h , k e l , e $\langle I_{hkl} \rangle$ é a intensidade média daquela reflexão. Calculado para $I \geq 3\sigma(I)$. ^c $R_{\text{work}} = \sum_{hkl} (|F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}|) / \sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|$, onde $|F_{\text{obs}}|$ e $|F_{\text{calc}}|$ são as amplitudes dos fatores de estrutura observados e calculados, respectivamente. ^d R_{free} é equivalente ao R_{work} , porém calculado com 5% das reflexões omitidas do processo de refinamento. ^eCalculado pacote de programas PHENIX (ADAMS *et al.*, 2010).

Tabela 2: Análise da área de interface e energia livre de solvatação para ambas as conformações oligoméricas (dímeros grandes e compactos) do BnSP-7.

	Dímero compacto		Dímero largo	
	Área de interface (Å ²)	Δ^iG (kcal/mol)	Área de interface (Å ²)	Δ^iG (kcal/mol)
BnSP-7 nativa	705,5	-18,4	419,9	1,6
BnSP-7/CaA	711,8	-18,4	412,7	1,2
BnSP-7/CiA	732,2	-17,7	431,9	1,0
BnSP-7/CuA	729,0	-18,7	433,8	-0,0

Δ^iG indica o ganho de energia livre de solvatação após a formação da interface, em kcal / mol. O valor é calculado como a diferença nas energias totais de solvatação de estruturas isoladas e de interface. O Δ^iG negativo corresponde a interfaces hidrofóbicas, ou a afinidade positiva da proteína. Esse valor não inclui o efeito de ligações de hidrogênio e pontes salinas através da interface. Área de interface em Å², é calculada como a diferença nas áreas de superfície total acessíveis das estruturas isoladas e da interface dividida por dois.

Na estrutura da BnSP-7 nativa, devido à falta de densidade eletrônica, provavelmente por conta da flexibilidade desses resíduos, parte ou a totalidade da cadeia lateral dos seguintes resíduos foram omitidas: Glu86 (monômero B), Lys115(B), Lys127 (monômeros A e B) e Lys129(B). Da mesma maneira, na estrutura do complexo BnSP-7/CaA, parte ou a totalidade da cadeia lateral dos seguintes resíduos foram omitidas: Lys57(B), Lys78(B), Glu86(A, B), Lys116(A), Lys127 (A, B) e Lys129 (A, B). Na estrutura do complexo BnSP-7/CiA, parte ou a totalidade da cadeia lateral dos seguintes resíduos foram omitidas: Lys57(A, B), Arg72(B), Lys78(A), Asn87(A, B), Lys93(B), Lys115(B), Lys127(A, B) e Lys129(A, B). Na estrutura do complexo BnSP-7/CuA, parte ou a totalidade da cadeia lateral dos seguintes resíduos foram omitidas: Glu86(A, B), Lys127(A) e Lys129(B). As estruturas dos cristais foram depositadas no Protein Data Bank (PDB) sob os códigos de identificação 5VFH (BnSP-7 nativa), 5VFJ (BnSP-7 / CaA), 5VFN (BnSP-7 / CiA) e 5VFM (BnSP-7 / CuA).

Todas as estruturas dos modelos finais (**Figura 14**) possuem estruturas secundárias e terciárias compatíveis com outras Lys49-PLA₂s previamente elucidadas (FERNANDES *et al.*, 2010; 2013; SALVADOR *et al.*, 2013; DOS SANTOS *et al.*, 2011), tais como: (i) uma α -hélice N-terminal; (ii) uma hélice “curta”; (iii) um *loop* de ligação ao Ca²⁺; (iv) duas α -hélices (2 e 3);

(v) duas cadeias curtas de folha- β antiparalela (β -wing); e (vi) uma região C-terminal, similar a todas as outras PLA₂ de classe II (SCHALOSKE & DENNIS, 2006; BURKE & DENNIS, 2009a).

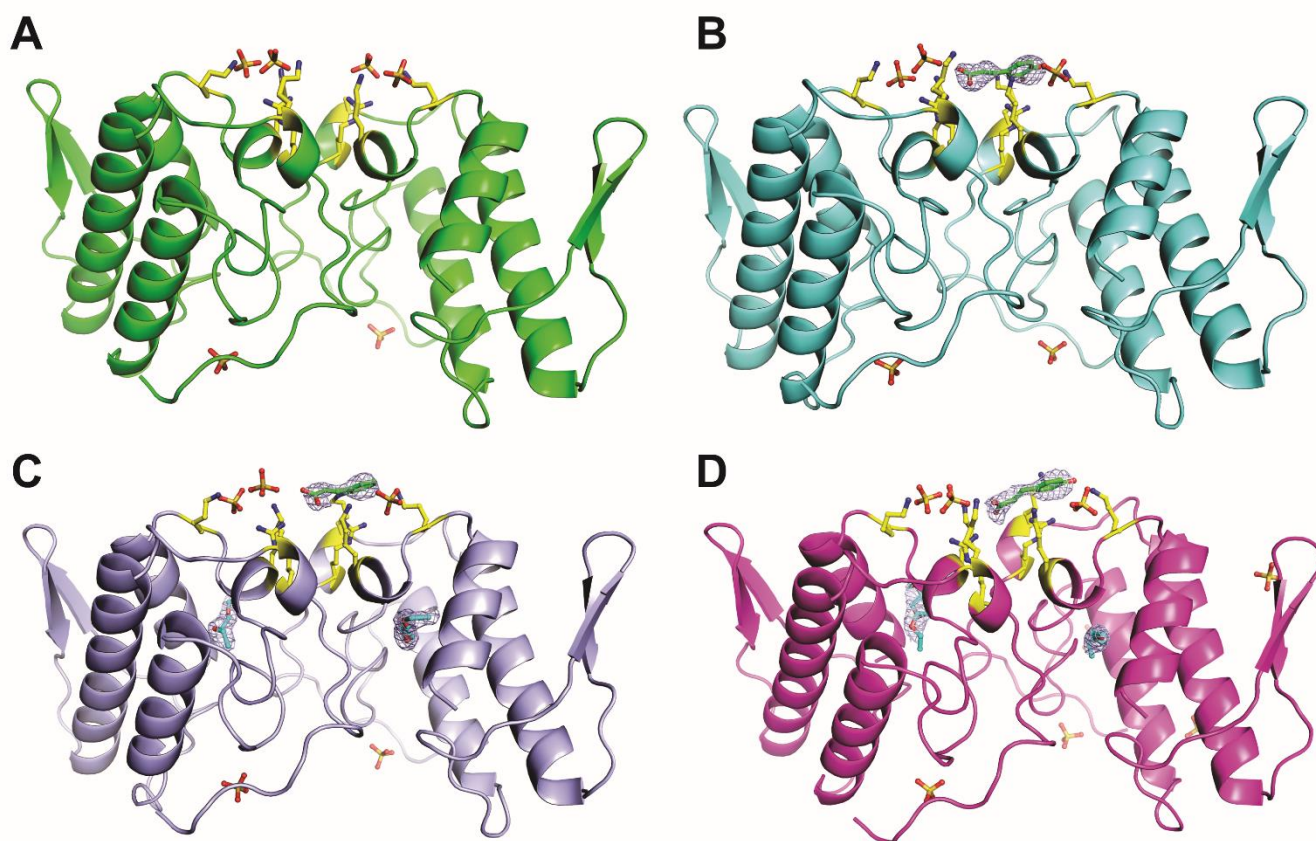


Figura 14: Representação em *cartoon* das estruturas diméricas de (A) BnSP-7 nativa; (B) BnSP-7 co-cristalizada com ácido cafeico (BnSP7/CaA), (C) BnSP-7 co-cristalizada com ácido cinâmico (BnSP-7/CiA) e (D) BnSP-7 co-cristalizada com ácido *p*-cumárico (BnSP-7/CuA). Os ligantes (CaA, CiA e CuA), moléculas de PEG e íons sulfato foram representados em *sticks* (verde, ciano e amarelo, respectivamente). O mapa de densidade eletrônica $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$ em corte a 1.0 do desvio padrão dos ligantes e de moléculas de PEG são mostrados (“malhas” cinzas).

A sobreposição entre os átomos de Ca dos monômeros A e B da BnSP-7 nativa e BnSP-7/CaA, BnSP-7/CiA e BnSP-7/CuA (**Figura 15**) mostram que os monômeros dos modelos elucidados são semelhantes. Foram observadas poucas diferenças nas estruturas, particularmente nos *loops* de ligação a Ca^{2+} (resíduos 29–34), *loops* antes e após a região das cadeias de folhas- β (resíduos 57–60 e 86–90) e na região C-terminal (117–130). Os valores dos desvios da raiz quadrática média (RMSD) da sobreposição das estruturas são mostrados na **Tabela 3**. Esses desvios na estrutura também foram encontrados na sobreposição de Ca entre várias estruturas de Lys49-PLA₂ (FERNANDES *et al.*, 2010) e deve ocorrer por conta da maior flexibilidade desses segmentos, que resulta em valores de *B-factors* mais altos em comparação com outras regiões dessas proteínas.

A superposição entre os átomos de Ca dos dímeros de BnSP-7, BnSP-7/CaA, BnSP-7/CiA e BnSP-7/CuA (**Figura 16**) também revelou estruturas oligoméricas muito semelhantes.

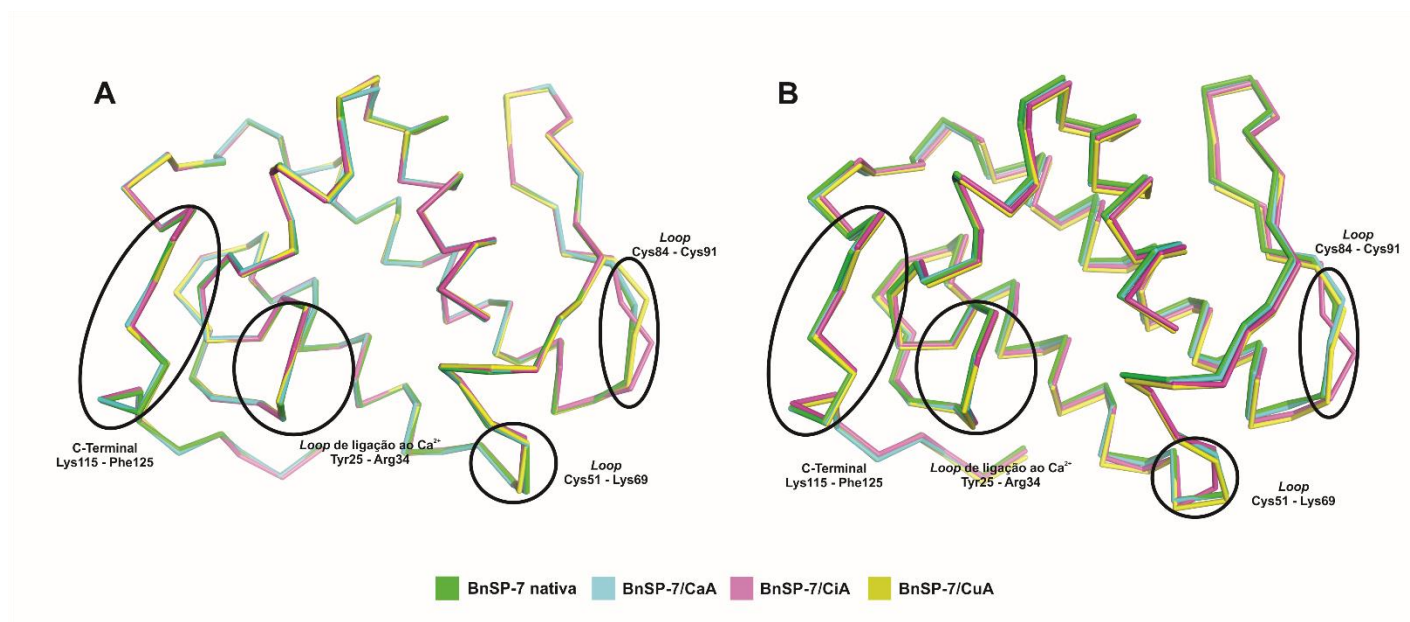


Figura 15: Sobreposição de Ca do (A) monômero A e (B) monômero B da BnSP-7 nativa (em verde), BnSP-7/CaA (em azul), BnSP-7/CiA (em rosa) e BnSP-7/CuA (em amarelo) destacando os desvios estruturais mais importantes entre essas estruturas.

Tabela3: Desvios médios da sobreposição de C α dos monômeros A e B da BnSP-7 nativa com BnSP-7/CaA, BnSP-7/CiA e BnSP-7/CuA.

Monômeros – visão geral				Loop de ligação ao Ca ²⁺ (Resíduos29-34)			
		BnSP-7 nativa				BnSP-7 nativa	
		Monômero A	Monômero B			Monômero A	Monômero B
BnSP-7/CaA	Monômero A	0,16	0,40	BnSP-7/CaA	Monômero A	0	0,09
	Monômero B	0,42	0,16		Monômero B	0,09	0
BnSP-7/CiA	Monômero A	0,37	0,51	BnSP-7/CiA	Monômero A	0,11	0,09
	Monômero B	0,54	0,37		Monômero B	0,15	0,09
BnSP-7/CuA	Monômero A	0,22	0,45	BnSP-7/CuA	Monômero A	0,09	0,09
	Monômero B	0,44	0,22		Monômero B	0,07	0,07

Folhas- β (Resíduos57-60)				Folhas- β (Resíduos 86-90)			
		BnSP-7 nativa				BnSP-7 nativa	
		Monômero A	Monômero B			Monômero A	Monômero B
BnSP-7/CaA	Monômero A	0	1,37	BnSP-7/CaA	Monômero A	0	0,50
	Monômero B	1,37	0		Monômero B	0,50	0
BnSP-7/CiA	Monômero A	0,18	1,35	BnSP-7/CiA	Monômero A	1,08	0,92
	Monômero B	1,36	0,56		Monômero B	1,14	1,03
BnSP-7/CuA	Monômero A	0,16	1,42	BnSP-7/CuA	Monômero A	0,41	0,34
	Monômero B	1,43	0,08		Monômero B	0,54	0,34

Região C-terminal (Resíduos 117-130)			
		BnSP-7 nativa	
		Monômero A	Monômero B
BnSP-7/CaA	Monômero A	0	0,10
	Monômero B	0,10	0
BnSP-7/CiA	Monômero A	0,17	0,17
	Monômero B	0,18	0,16
BnSP-7/CuA	Monômero A	0,16	0,15
	Monômero B	0,16	0,13

Em relação à estrutura quaternária, tanto a BnSP-7 nativa quanto a BnSP-7 co-cristalizada com os diferentes ligantes, possuem dois protômeros na unidade assimétrica (**Figuras 14, 15 e 16**) e apresentam conformações oligoméricas bastante semelhantes (RMSD= 0,41 Å para BnSP-7/CaA, 0,54 Å para BnSP-7/CiA e 0,43 Å para BnSP-7/CuA).

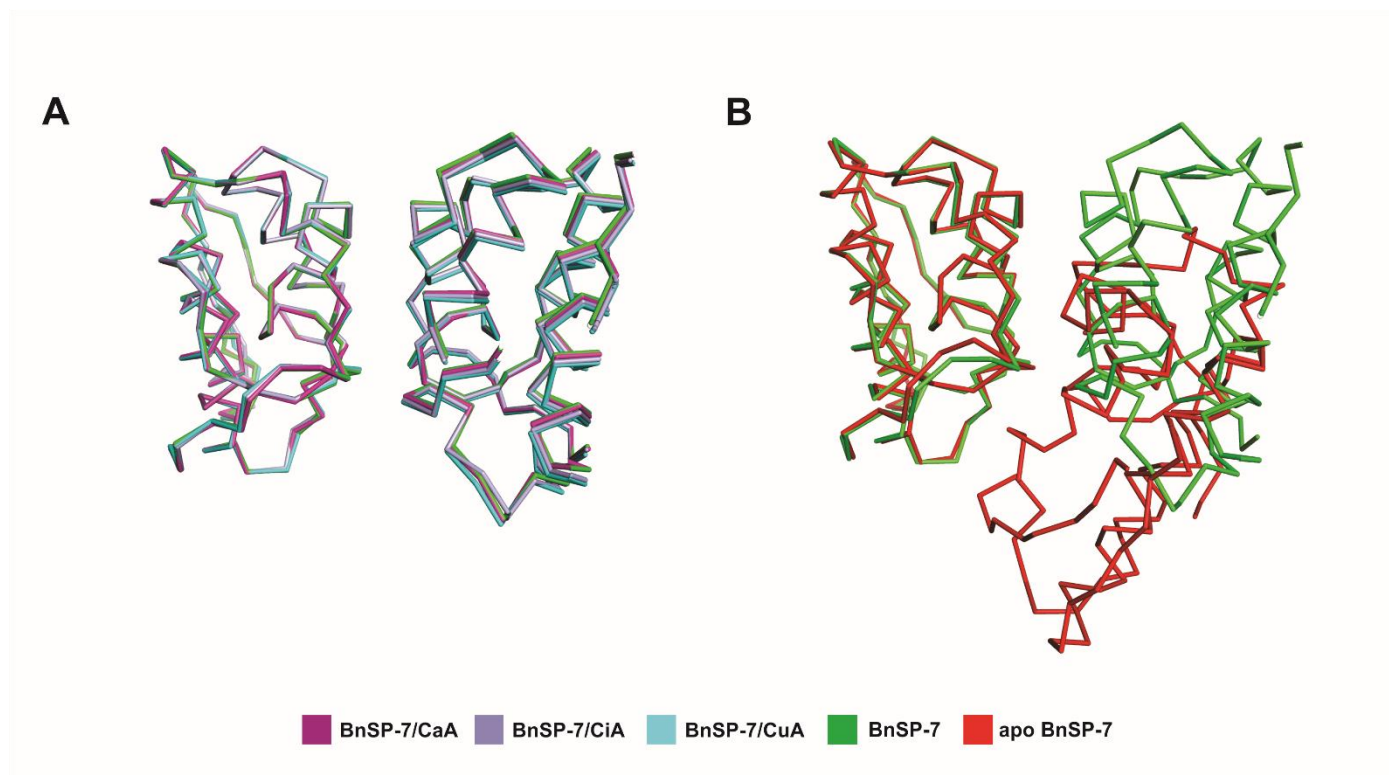


Figura 16: Sobreposição de Ca dos dímeros das estruturas de **(A)** BnSP-7 / CaA (violeta), BnSP-7 / CiA (roxo) e BnSP-7 / CuA (ciano); **(B)** BnSP-7 nativa (verde) e apo-BnSP-7 (vermelho).

A inspeção do $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$ no mapa de densidade eletrônica da BnSP-7 co-cristalizada com diferentes ligantes revelaram a presença de vários íons sulfato (4-7 íons) em todas as estruturas. Eles interagem com resíduos previamente apontados como o sítio de *docking* da membrana (*Membrane Docking Site*, MDoS) das PLA₂-like, mas também interagem com outros resíduos básicos na superfície das estruturas. Nos complexos, também se verificou a presença de um ligante em cada estrutura, com proximidade de contatos com a região MDoS (**Figuras 17 e 18**), interagindo através de ligações eletrostáticas, van der Waals, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas com o MDoS de ambos os monómeros, particularmente os seguintes resíduos: Lys16 (A e B), Lys20 (A e B), Lys115 (A) e Arg118 (A). Os três ligantes estão em uma região similar como mostrado nas **Figuras 14 e 18**.

Na estrutura da BnSP-7/CaA, o grupo fenólico da molécula de ácido cafeico estabelece contatos com os resíduos Lys16 e Lys115, no monômero A, por meio de duas pontes salinas. O grupo aromático do ácido cafeico também interage com íons sulfato. O grupo acila estabelece uma ligação de hidrogênio com a Lys20, no monômero B, além de estabelecer interações de Van der Waals com Lys20 do monômero A e contatos hidrofóbicos com a Arg118, no monômero A e com um íon de sulfato (**Figuras 17A e 18A**). Na estrutura da BnSP-7/CiA, o grupo fenil da molécula de ácido cinâmico estabelece contatos de Van der Waals com os resíduos Lys16 e Lys115, no monômero A, além de interações hidrofóbicas com íons sulfato e Arg118, no monômero A. Já o grupo acila exibe interações de Van der Waals com Lys20 do monômero A e estabelece uma interação de longo alcance (3,6 Å) com a Lys20 no monômero B. (**Figura 17B**). Na estrutura da BnSP-7/CuA, o grupo fenol do ácido *p*-cumárico estabelece contatos com Lys16 e Lys115, no monômero A, por meio de uma ponte salina e interações de Van der Waals. O grupo aromático do ácido *p*-cumárico também interage com íons sulfato e Arg118, no monômero A (**Figura 17C**). Além disso, o grupo acila ácido *p*-cumárico estabelece uma ligação de hidrogênio com o resíduo Lys20 no monômero B e exibe interações de Van der Walls com Lys20 no monômero A e interações coordenadas por sulfatos com Lys16, no monômero B (**Figuras 17C e 18C**).

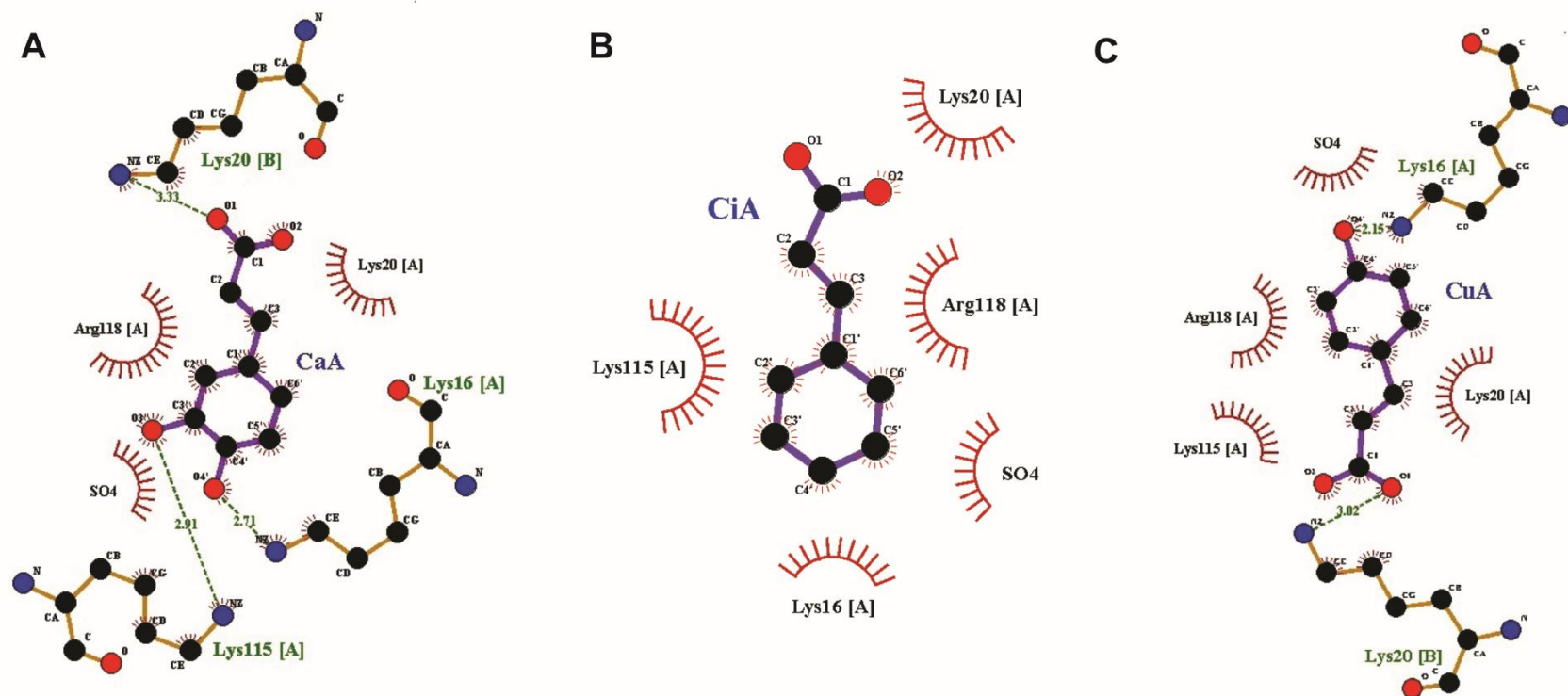


Figura 17: Contatos hidrofóbicos e interações eletrostáticas entre **(A)** ácido cafeico (CaA); **(B)** ácido cinâmico (CiA) e **(C)** ácido *p*-cumárico (CuA) com a BnSP-7, observado nas estruturas cristalográficas. Imagem gerada utilizando o programa Ligplot (LASKOWSKI & SWINDELLS, 2011).

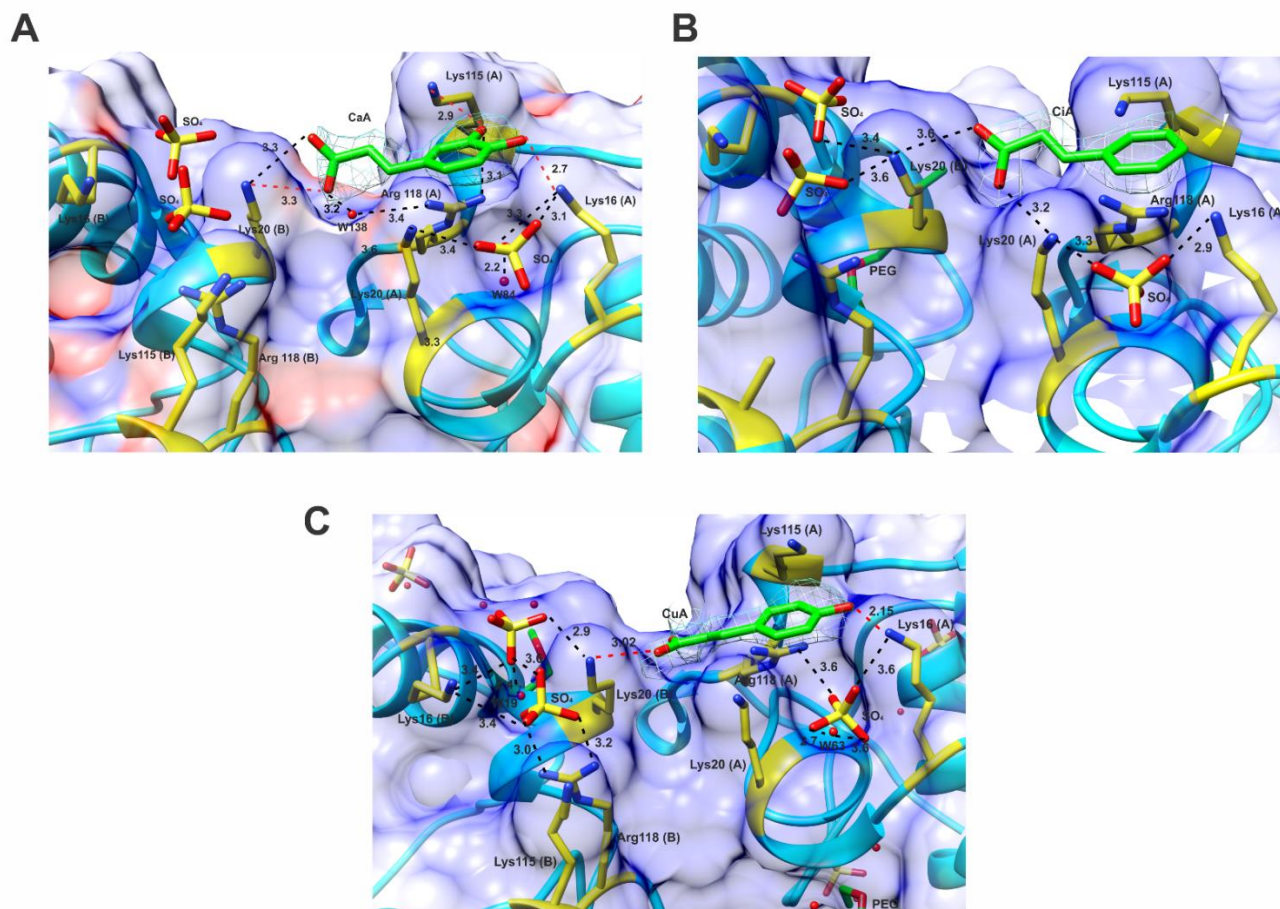


Figura 18: Superfície de potencial eletrostático das estruturas cristalográficas da (A) BnSP-7/CaA, (B) BnSP-7/CiA e (C) BnSP-7/CuA. Na superfície eletrostática, superfícies com carga líquida negativa são representadas em roxo, superfícies com cargas líquida neutra são representadas em branco e superfícies com cargas líquida positiva são representadas em salmão. As distâncias (Å) entre a proteína e os ligantes são mostradas em linha pontilhada em preto, para distâncias de contato e em linha pontilhada em vermelho, para distâncias de ligações de hidrogênio. Os resíduos dos monômeros A e B em contato com os ligantes (*sticks* em verde) estão representados em *sticks* em amarelo. Íons de sulfato estão representados em *sticks* em amarelo/vermelho e as moléculas de água estão representadas em esferas em vermelho. O mapa de densidade eletrônica $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$ em corte a 1.0 do desvio padrão dos ligantes são mostrados em “malhas” cinzas. As superfícies de potencial eletrostático foram geradas por cálculos eletrostáticos APBS (Adaptive Poisson–Boltzmann Solver) em 150 mM NaCl (BAKER *et al.*, 2001), disponíveis no programa Chimera v.1.9 (PETTERSEN *et al.*, 2004), após a transformação do arquivo PDB para arquivo PQR, utilizando o servidor *online* PDB2PQR em pH 7.0 (DOLINSKY *et al.*, 2004).

Além dos íons de sulfato localizados na região MDoS, também são notados íons de sulfato estabelecendo ligações de hidrogênio com o resíduo Arg34 em ambos os monômeros em todas as estruturas. Esses íons de sulfato também foram encontrados em estruturas de outras

PLA₂-like, mas podem ser atribuídas a interações não específicas (FERNANDES *et al.*, 2013, 2015; dos SANTOS *et al.*, 2009). Também foram encontradas partes de moléculas de PEG 4000 na entrada do canal hidrofóbico (em contato com o resíduo Lys7) nos monômeros A e B das estruturas de BnSP-7/CiA (8 átomos nos monômeros A e B, no mapa de densidade eletrônica) e BnSP-7/CuA (10 átomos no monômero A e 8 átomos no monômero B, no mapa de densidade eletrônica).

3.1.6. Comparação e caracterização do canal hidrofóbico e dos túneis

Para caracterizar melhor a estrutura de BnSP-7 e sua relação com a interação ácido-graxo/PEG com ativação de toxinas, avaliou-se a acessibilidade do canal hidrofóbico (cavidade) através da região C-terminal da proteína com o cálculo de tuneis utilizando o algoritmo *MOLE2* (seção *materiais e métodos*). Foram analisadas as propriedades físico-químicas, como a composição de aminoácidos do canal hidrofóbico, bem como a carga total do canal hidrofóbico, a hidropatia, ou seja, a afinidade de resíduos hidrofílicos pela água e a polaridade dos resíduos que compõem o canal hidrofóbico.

A cavidade do canal hidrofóbico da BnSP-7 tem uma média de 3420 Å³ de volume, incluindo as regiões do interior e de interface de ambos os monômeros. A face externa da cavidade, ou seja, os aminoácidos com cadeias laterais voltadas para a parte externa do canal hidrofóbico é composta principalmente de resíduos positivos e hidrofóbicos, com uma carga total de 9 e hidropatia e polaridade calculada de -0,76 e 11,2; respectivamente (**Tabela 4**).

O canal hidrofóbico (chamado de pelo algoritmo *MOLE2* de túneis) dos monómeros A e B nos quais o ácido graxo pode acessar através da região C-terminal tem aproximadamente 310 Å³ de volume. É composto principalmente de resíduos hidrofóbicos, com uma hidropatia de 0,57, carga total de 1 sem resíduos negativos (**Tabela 5**).

Tabela 4: Área total e análise físico-química dos aminoácidos das cavidades da estrutura cristalográfica da BnSP-7 nativa (N7nat) e complexada com os ligantes: ácido cinâmico (N7CiA); ácido *p*-cumárico (N7CuA) e ácido cafeico (N7CaA); bem como de outras PLA₂-like proteins depositadas no PDB.

	PROPRIEDADES DAS CAVIDADES											
	Modelo	Volume total da cavidade (Å ³)	Total					Face externa				
			Carga total	Resíduos positivos	Resíduos negativos	Hidropatia	Polaridade	Carga total	Resíduos positivos	Resíduos negativos	Hidropatia	Polaridade
MjTX-II	1XXS	5275,8	20	22	2	-0,43	9,19	13	14	1	-0,95	12,98
	4KF3	5128,8	19	23	4	-0,49	9,54	11	14	3	-0,94	12,85
	4YV5	5105,3	19	23	4	-0,52	9,54	12	14	2	-1,19	13,16
	MÉDIA (DESVIO PADRÃO)	5170,0 (92,4)	19,3 (0,6)	22,7 (0,6)	3,3 (1,1)	-0,48 (0,05)	9,42 (0,20)	12,0 (1,0)	14,0 (0,0)	2,0 (1,0)	-1,03 (0,14)	13,00 (0,16)
BthTX-I	3CXI	5441,9	22	25	3	-0,52	10,04	18	20	2	-1,06	13,73
	3HZW	5575,0	23	26	3	-0,45	9,88	18	20	2	-1,06	15,93
	3IQ3	4614,1	19	21	2	-0,54	9,64	18	19	1	-1,15	13,94
	3QNL	4603,3	15	18	3	-0,38	8,85	16	16	0	-0,79	11,59
	MÉDIA (DESVIO PADRÃO)	5058,6 (522,3)	19,8 (3,6)	22,5 (3,7)	2,8 (0,5)	-0,47 (0,07)	9,60 (0,53)	17,5 (1,0)	18,8 (1,9)	1,3 (1,0)	-1,02 (0,16)	13,80 (1,77)
PrTX-I	3CYL	5985,0	19	21	2	-0,43	9,11	16	16	0	-0,90	12,14
	4YU7	4548,3	14	17	3	-0,44	9,10	11	11	0	-0,71	10,11
	4YZ7	5729,6	19	22	3	-0,47	9,69	13	15	2	-0,87	12,75
	MÉDIA (DESVIO PADRÃO)	5420,9 (766,4)	17,3 (2,9)	20,0 (2,7)	2,7 (0,6)	-0,45 (0,02)	9,30 (0,34)	13,3 (2,5)	14,0 (2,7)	0,7 (1,2)	-0,83 (0,10)	11,67 (1,38)
BnSP-7	BnSP-7/CiA	3840,0	15	18	3	-0,36	9,30	11	12	1	-0,66	11,17
	BnSP-7/CuA	3400,8	14	18	4	-0,41	9,73	9	11	2	-0,85	12,67
	BnSP-7 nativa	3503,9	14	18	4	-0,49	9,61	9	11	2	-0,82	10,61
	BnSP-7/CaA	2939,9	11	15	4	-0,44	9,50	8	9	1	-0,69	10,35
	MÉDIA (DESVIO PADRÃO)	3421,1 (371,6)	13,5 (1,7)	17,3 (1,5)	3,75 (0,5)	-0,43 (0,05)	9,54 (0,18)	9,3 (1,3)	10,8 (1,3)	1,5 (0,6)	-0,76 (0,09)	11,20 (1,04)

Tabela 5: Análise físico-química dos aminoácidos que compõem o canal hidrofóbico (túnel) de ambos os monômeros da estrutura cristalográfica da BnSP-7 nativa (N7nat) e complexada com os ligantes: ácido cinâmico (N7CiA); ácido *p*-cumárico (N7CuA) e ácido cafeico (N7CaA); bem como de outras PLA₂-like proteins depositadas no PDB.

	Modelo	TÚNEL A					TÚNEL B				
		Volume (Å ³)	Resíduos positivos	Resíduos negativos	Hidropatia	Polaridade	Volume (Å ³)	Resíduos positivos	Resíduos negativos	Hidropatia	Polaridade
MjTX-II	1XXS	660,6	2	0	0,77	5,47	702,7	2	0	0,89	5,98
	4KF3	561,5	4	0	0,40	9,88	695,8	3	0	0,60	8,57
	4YV5	730,4	2	0	0,53	7,15	767,4	2	0	0,84	5,60
	MÉDIA (DESVIO PADRÃO)	650,8 (84,9)	2,7 (1,2)	0,0 (0,0)	0,57 (0,19)	7,50 (2,23)	722,0 (39,5)	2,3 (0,6)	0,0 (0,0)	0,78 (0,16)	6,72 (1,62)
BthTX-I	3CXI	657,3	2	0	0,39	8,53	552,1	4	0	0,36	8,89
	3HZW	521,5	2	0	0,50	9,43	393,7	1	0	0,39	8,13
	3IQ3	706,3	1	0	0,57	7,05	521,3	3	0	0,39	7,64
	3QNL	605,7	2	0	0,87	5,74	547,0	1	0	0,67	5,10
	MÉDIA (DESVIO PADRÃO)	622,7 (79,0)	1,8 (0,5)	0,0 (0,0)	0,58 (0,21)	7,69 (1,63)	503,5 (74,5)	2,3 (1,5)	0,0 (0,0)	0,45 (0,15)	7,44 (1,64)
PrTX-I	3CYL	702,0	2	0	0,62	7,04	560,0	3	0	0,49	7,67
	4YU7	633,0	0	0	1,04	4,17	469,8	1	0	0,47	6,83
	4YZ7	564,2	2	0	0,41	6,01	446,1	2	0	0,47	8,17
	MÉDIA (DESVIO PADRÃO)	633,1 (68,9)	1,3 (1,2)	0,0 (0,0)	0,69 (0,32)	5,74 (1,45)	492,0 (60,1)	2,0 (1,0)	0,0 (0,0)	0,48 (0,01)	7,56 (0,68)
BnSP-7	BnSP-7/CiA	297,6	1	0	0,64	8,55	284,8	1	0	0,45	6,25
	BnSP-7/CuA	336,0	1	0	0,66	5,91	322,3	1	0	0,65	6,26
	BnSP-7 nativa	364,8	2	0	0,47	8,60	309,2	1	0	0,65	7,47
	BnSP-7/CaA	312,3	1	0	0,63	7,74	283,1	1	0	0,37	7,32
	MÉDIA (DESVIO PADRÃO)	327,68 (29,4)	1,3 (0,5)	0,0 (0,0)	0,60 (0,09)	7,70 (1,26)	299,9 (19,1)	1,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,53 (0,14)	6,83 (0,66)

3.2. Discussão

3.2.1. Visão geral das estruturas cristalográficas e ensaios estruturais em solução: comparação estrutural

Os resultados de co-cristalização mostraram que as condições de cristalização testadas foram favoráveis ao crescimento de monocristais, obtendo-se dados de cristais que difrataram à alta resolução (aproximadamente 2Å). Assim, a análise estrutural destes complexos foi possível, mostrando a interação dos ligantes com a BnSP-7 nativa. Os três modelos finais exibem uma qualidade estereoquímica compatível com outras estruturas já elucidadas na mesma faixa de resolução, com a maioria dos resíduos das estruturas na combinação apropriada dos ângulos ϕ e ψ (Tabela 1). Os dímeros de todas as estruturas estão na conformação de dímero compacto (dímero alternativo), como descrito por DOS SANTOS *et al.* (2009) e a estrutura geral de uma Lys49-PLA₂ se apresenta conservada em todos os casos.

Foi observado que mesmo quando foram utilizados o ácido cinâmico e seus dois derivados, foram encontrados sítios de ligação semelhantes nas estruturas cristalográficas dos complexos com a BnSP-7 (**Figura 19**). Os radicais hidroxila dos grupos acila e fenólico do ácido cafeico e grupos acila e fenol do *p*-cumárico produzem três e duas interações eletrostáticas, respectivamente, mas no caso do ácido cinâmico, o ligante interage apenas por meio de interações hidrofóbicas. A quantidade de interações eletrostáticas possivelmente está relacionada com as afinidades dos ligantes, como observado nos ensaios de MST, que será discutido posteriormente nessa mesma seção. O ácido cinâmico mostra uma leve translocação na direção do grupo fenil (**Figura 19**), provavelmente para adquirir um número maior de interações hidrofóbicas, mesmo com perda de uma interação eletrostática entre o grupo acila e Lys20 (**Figura 17**).

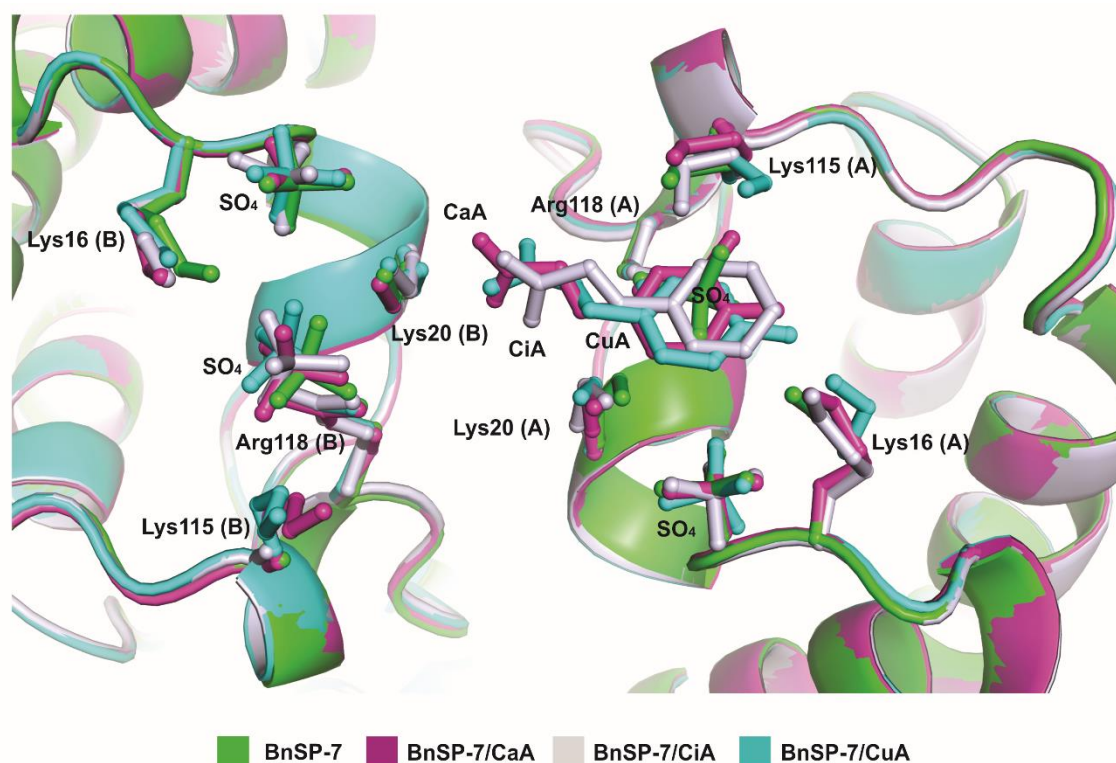


Figura 19: Sobreposição das estruturas BnSP-7, BnSP-7 / CaA, BnSP-7 / CiA e BnSP-7 / CuA na região MDoS. Os átomos de ácido cafeico (CaA) (magenta), ácido cinâmico (CiA) (cinza) e ácido p-cumárico (CuA) (ciano), íons sulfato e resíduos principais cujos ligantes interagem são representados em *sticks*.

No complexo da BnSP-7 com ácido cafeico, foram encontrados íons sulfato, moléculas de água (**Figura 18**) e uma molécula de ácido cafeico na região C-terminal da proteína, no sítio MDoS. Essa região foi recentemente descrita como provável responsável pela ancoragem da proteína na célula alvo para posterior etapa de disruptura da membrana da célula muscular, culminando com morte celular (SOARES *et al*, 2000b, FERNANDES *et al*, 2013, 2014). O diagrama de interação mostra vários contatos hidrofóbicos entre o ligante e os resíduos Lys20 de ambos monômeros e com os resíduos, Arg118 e Lys115 do monômero A, bem como uma ligação de hidrogênio entre o ácido cafeico e o resíduo Lys16 do monômero A (**Figura 17**).

Fernandes *et al.* (2015), mostrou recentemente em estrutura do complexo PrTX-I com ácido cafeico, a presença de 4 moléculas deste ácido. Dois desses ligantes, estão situados na

região MDoS, e um deles estabelecem ligações de hidrogênio no monômero B com Lys20 e Arg118 e por interação hidrofóbica com Lys115, enquanto outro estabelece ligação de hidrogênio com a Lys15 e Arg118 e interações hidrofóbicas com Lys20 e Lys115. Esses ácidos cafeicos encontrados na região do MDoS, estabelecem contatos semelhantes com aqueles encontrados na estrutura da BnSP-7 complexada com ácido cafeico. Outro dos ácidos cafeicos encontrados na estrutura da PrTX-I por Fernandes e colaboradores (2015) situa-se em região adjacente ao MDoS e interage por ligação de hidrogênio coordenada por moléculas de águas nos resíduos Gly15, Asn17 e Ser21, no monômero B e por interação hidrofóbica no Leu121 no monômero A, onde na estrutura da BnSP-7 complexada com ácido cafeico, há um sulfato em região próxima ao ácido cafeico encontrado na estrutura da PrTX-I. Além disso, em outras estruturas cristalinas de Lys49-PLA₂s, os íons sulfato foram encontrados interagindo com a maioria dos resíduos que estabelecem contatos com o ácido cafeico nas estruturas da PrTX-I e BnSP-7 complexadas (FERNANDES *et al.*, 2013; DOS SANTOS *et al.*, 2009).

A análise funcional do mesmo trabalho mostrou que a incubação com o ácido cafeico pode inibir em torno de 34%, na proporção proteína/inibidor 1:1 e 50%, na proporção 1:5, do dano muscular provocado pela PrTX-I (FERNANDES *et al.*, 2015). Deste modo, podemos concluir que a inibição provocada pelo ácido cafeico na ação miotóxica das Lys49-PLA₂s botrópicas se dá porque ele se liga ao sítio MDoS (Lys20-Lys115-Arg118) destas proteínas, dificultando a estabilização da proteína sobre a membrana e, consequentemente, o rompimento da membrana pelo sítio MDiS. De forma semelhante podemos inferir que o mesmo pode ocorrer em relação a BnSP-7 e o ácido cafeico, pois a estrutura mostra que o ligante interage nas mesmas regiões encontradas para a estrutura complexada da PrTX-I.

No complexo BnSP-7/CiA, foi encontrado, além de íons de sulfato e moléculas de água, uma molécula de ácido cinâmico, tal como o complexo BnSP-7/CaA, na região que compreende o sítio MDoS, interagindo com os resíduos Lys20, Lys115 e Arg118, estabelecendo

contatos hidrofóbicos com esses resíduos. Também foram encontrados alguns átomos de moléculas de PEG na entrada do canal hidrofóbico (**Figura 14**), em ambos os monômeros, que interage com o resíduo Lys7, mas não adentra nem interage com outros resíduos referentes ao canal hidrofóbico. Não houve alterações estruturais significativas relativamente à presença de PEG na entrada do canal hidrofóbico quando comparado com outros complexos obtidos (**Figura 15**).

No complexo BnSP-7/CuA, além de moléculas de água e alguns ions de sulfato, há uma molécula de ácido *p*-cumárico e alguns átomos de moléculas de PEG (**Figura 14**). A molécula de ácido *p*-cumárico interage, tal como nos outros complexos obtidos, com a região que compreende o sítio MDoS, o que confirma a importância dessa região, bem como que a inibição da miotoxicidade pode ser através da interação com esta região, como sugerido anteriormente por Fernandes *et al.* (2013; 2015). O diagrama de interação para este complexo mostra vários contatos hidrofóbicos, além da presença de duas ligações de hidrogénio do ligante com Lys16 no monómero B e Lys20 no monómero A (**Figura 17**). A análise dos modelos de distribuição de cargas (**Figura 18**) e sobreposição dos carbonos alfa das estruturas (**Figura 15**), mostra alta similaridade da região de interação de ligação e equivalência dos três complexos.

Do ponto de vista estrutural, o ácido cafeico parece ser um ligante mais eficaz para a BnSP-7, seguido dos ácidos *p*-cumárico e cinâmico. Devido a interações eletrostáticas adicionais, mantendo aproximadamente a mesma quantidade de interações hidrofóbicas. De fato, os ensaios de afinidade (MST) corroboram os ensaios estruturais, demonstrando que o ácido cafeico apresenta maior afinidade, seguido de ácidos *p*-cumárico e cinâmico. As interações eletrostáticas dos ácidos cafeico e *p*-cumárico com as toxinas parecem ser as principais razões para o aumento de afinidade desses ligantes em comparação com o ácido cinâmico.

Os ensaios de espectroscopia de fluorescência mostraram que o ácido cafeico e o ácido *p*-cumárico se ligam a BnSP-7 em solução. A emissão de fluorescência dos ligantes diminui na

presença da proteína devido às interações eletrostáticas formadas entre CaA e CuA e os resíduos Lys e Arg da BnSP-7 (**Figuras 11, 17 e 18**).

3.2.2. Relação entre a interação dos ligantes e os sítios MDiS e MDoS

Um dos desafios vigentes atualmente nos estudos em toxilogia esta relacionado com o desenvolvimento de alternativas terapêuticas para o tratamento do efeito local decorrente do envenenamento ofídico, que não são eficientemente neutralizados por soroterapia convencional. Em casos de serpentes botrópicas, a mionecrose local causada por PLA₂ e PLA₂-like é a principal consequência do acidente ofídico (CORREIA-DE-SA *et al.*, 2013). Este efeito, por ser ineficientemente neutralizado, pode levar até a perda do membro afetado, levando a incapacidade permanente (GUTIERREZ, THEAKSTON & WARRELL, 2006; WARRELL, 2010). Assim, torna-se essencial a compreensão das bases estruturais para a mionecrose local e desenvolver modelos moleculares que norteiem o projeto de inibidores eficientes que poderiam ser usados para complementar a soroterapia convencional.

Recentemente foi mostrado ação de constituintes de extrato de plantas com ação inibitoria do envenenamento ofídico, a partir de dados estruturais e funcionais. Dos Santos *et al.* (2011) demonstraram que o ácido rosmarínico foi capaz de inibir a atividade paralisante *in vitro* causada por PrTX-I em preparações neuromusculares de camundongos por 80%.

Como dito anteriormente, Fernandes *et al.* (2015) recentemente mostrou efeitos de inibição do ácido cafeico e ácido aristolóquico contra a ação da PrTX-I, sendo que o ácido cafeico pode inibir em torno de 34%, na proporção proteína/inibidor 1:1 e 50%, na proporção 1:5, do dano muscular provocado pela PrTX-I.

Com base em estudos funcionais e estruturais, foi proposto que existam três possíveis mecanismos de inibição para as PLA₂-like (FERNANDES *et al.*, 2015; SALVADOR *et al.*, 2015; BORGES *et al.*, 2017): (i) bloqueio físico do canal hidrofóbico, (ii) obstrução de MDoS e /

ou região de MDiS, e (iii) indução de oligomerização de proteínas. Os dados apresentados por Fernandes e colaboradores (2015) forneceram informação estrutural, a partir dos complexos com ácido cafeico e ácido aristolóquico, sobre a inibição de Lys49-PLA₂s em relação à neutralização parcial da atividade miotóxica destas proteínas, reforçando o mecanismo de inibição pela obstrução de MDoS e / ou região de MDiS, ligando-se com esses dois locais de interação com a membrana alvo (MDoS e MDiS).

As estruturas apresentadas nesse trabalho reforçam o meio de inibição da miotoxicidade causada por Lys49-PLA₂s em que ocorre o bloqueio da região MDoS pela interação com o ligante, mostrando estruturas em que outros ligantes derivados do ácido cinâmico se ligaram a BnSP-7 na mesma região em que o ácido cafeico se ligou na estrutura da PrTX-I. Não é surpreendente que tenhamos obtidos esses resultados nesse trabalho, visto que os derivados de ácido cinâmico exibem alta atividade antioxidante, devido à presença de fragmentos do radical vinil em suas estruturas (SHARMA, 2011). Contudo, o fragmento de vinil, responsável pelo centro reativo da molécula, é altamente afetado pela posição do radical no núcleo de benzeno (BOGDASHEV, TUKHOVSKAYA & POGREBNYAK, 1998).

Assim, como observado nas estruturas desse trabalho, o ácido cafeico e ácido *p*-cumárico possuem mais interações com os resíduos pertencentes à região MDoS do que o ácido cinâmico devido a posição do radical, que favorece interações com essa região pelos oxigênios das hidroxilas conferirem maior densidade eletrônica. Os oxigênios do ácido cafeico e do ácido *p*-cumárico fazem com que eles se situem melhor dentro da região carregada positivamente do MDoS, como mostrado pela presença de ligações de hidrogênio nas estruturas desses complexos. Destaca-se o ácido cafeico que faz mais ligações com a região carregada positivamente do MDoS por possuir duas hidroxilas no grupo fenil, em relação ao ácido cinâmico, que não tem as hidroxilas no anel aromático.

A análise do complexo da BnSP-7 revelaram a presença dos ligantes ocupando região do MDoS, onde em muitas estruturas se observa a presença dos íons sulfato. Como descrito em trabalhos recentes (FERNANDES *et al.*, 2013; 2014; DOS SANTOS *et al.*, 2009), a presença de sulfatos em diversas estruturas na região C-terminal, bem como de ligantes, principalmente os carregados negativamente, nas estruturas apresentadas nesse trabalho, ocorre devido a intensa presença de resíduos carregados positivamente nessa região, atualmente conhecida como MDoS.

Até se chegar ao mecanismo de ação do MDiS e MDoS, proposto por Fernandes *et al.* (2013), houveram diversas propostas de mecanismos baseado em interações eletrostáticas entre resíduos, especialmente da região C-terminal e a membrana alvo. Entretanto, entre todos, apenas o proposto por dos Santos *et al.* (2009) considera o dímero compacto como o dímero biológico das Lys49-PLA₂s. Estes autores propuseram um "sítio miotóxico" formado pelos resíduos Lys20, Lys115 e Arg118, que seria determinante pela perturbação da membrana por conta da interação desses resíduos com íons sulfato.

No entanto, a proposição do sítio miotóxico não considerava que há baixa probabilidade de resíduos carregados se inserirem na porção hidrofóbica da membrana. No mecanismo proposto por Fernandes e colaboradores (2013), esse sítio (Lys20-Lys115-Arg118) está mais relacionado a ancoragem na membrana que sua desestabilização propriamente, de maneira similar ao que ocorre nas Asp49-PLA₂s. Assim, essa região na qual, no presente trabalho, encontramos ligantes interagindo com a BnSP-7, passou a ser chamado de Sítio de Docking na Membrana (Membrane-Docking Site, MDoS).

Em hipóteses anteriores, ainda baseadas no dímero largo, foi sugerido a participação de aminoácidos hidrofóbicos na ação da atividade miotóxica (AMBROSIO *et al.*, 2005). Foi mostrado recentemente, no alinhamento da região C-terminal das sequências de Lys49-PLA₂s, uma alta taxa de conservação de aminoácidos hidrofóbicos na região C-terminal, especialmente resíduos de Leu, Pro e Phe nas posições 121, 124 e 125 (FERNANDES *et al.*, 2013). Em relação

as Lys49-PLA₂s botrópicas, nota-se a presença de um resíduo de Leu e um de Phe, nas posições 121 e 125, respectivamente, em 98% das sequências encontradas nos NCBI Protein Data Bank (FERNANDES *et al.*, 2013; 2014).

Uma análise da posição das cadeias laterais desses dois resíduos em estruturas de Lys49-PLA₂s complexadas, mostrou que eles se encontram em contato um ao outro, expostos ao solvente e de maneira simétrica no outro monômero (FERNANDES *et al.*, 2013). Assim, a partir do alto nível de conservação desses resíduos, bem como sua posição nas estruturas, foi proposto que esse seria o sítio responsável pela miotoxicidade dessas proteínas, denominado de Sítio de Desestabilização da Membrana (Hydrophobic Membrane-Disruption Site, MDiS) (FERNANDES *et al.*, 2013).

Experimentos anteriores de mutação sítio dirigida com a proteína BthTX-I, mostraram que quando era mutado o resíduo Phe125Ala, esta proteína possuía menor atividade miotóxica que a BthTX-I nativa (CHIOATO *et al.*, 2007). Por outro lado, quando se mutou o mesmo resíduo para Phe125Trp, a proteína apresentou o mesmo nível de miotoxicidade (FERREIRA *et al.*, 2008).

Esses resultados destacaram a importância de um aminoácido hidrofóbico na posição 125 para a expressão da atividade miotóxica. Além disso, Núñez *et al.* (2001) demonstrou a partir da inspeção da estrutura tridimensional da região 115-129 em alguns cristais de miotoxina, que a presença de um aminoácido hidrofóbico na posição 121 é importante para a expressão da atividade miotóxica.

Fernandes *et al.* (2013) observou que a presença de um ligante no canal hidrofóbico provoca uma maior projeção dos resíduos que compõem o MDiS em direção ao solvente, expondo-os ao solvente. Contudo, o que foi observado para as estruturas da BnSP-7 complexadas do presente trabalho, foi que esses resíduos já estariam parcialmente expostos ao

solvente independente da presença ou não de ligante no canal hidrofóbico, em uma conformação oligomérica atípica, o que será discutido posteriormente.

A partir dos dados encontrados, a proposta da ação miotóxica de Fernandes *et al.* (2013) ocorreria a partir da entrada de uma molécula hidrofóbica, como um ácido graxo no canal hidrofóbico das Lys49-PLA₂s, que, como anteriormente observado nas estruturas complexadas (PEG, alfa-tocoferol, ácido graxo), levaria a uma reorientação de um dos monômeros, acarretando no alinhamento dos sítios MDoS e do MDiS no mesmo plano em uma posição simétrica em ambos os monômeros, expondo mais os resíduos que compreende a região MDiS. O ácido graxo que levaria a ativação da Lys49-PLA₂, ocasionalmente poderia ser proveniente da ação de uma Asp49-PLA₂ na membrana, o que reforça o sinergismo entre Asp49-PLA₂ e Lys49-PLA₂ na ação do veneno (MORA-OBANDO *et al.*, 2014).

Posteriormente, haveria a estabilização do dímero, na conformação alternativa, sobre a membrana pela interação do sítio MDoS (Lys20-Lys115-Arg118) com a cabeça aniônica de fosfolipídios da membrana. Como já observado, esse sítio interage com íons sulfatos em diversas estruturas de Lys49-PLA₂s e eles mimetizariam grupos aniônicos fosfatidil da bicamada lipídica. Com isso, ocorreria a desestabilização da membrana pela penetração do sítio MDiS (Leu121-Phe125) na membrana, levando a um influxo de Ca²⁺ e Na⁺, e consequentemente a morte celular (FERNANDES *et al.* 2013).

3.2.3. Diferenças estruturais: análise da conformação oligomérica, dos túneis e canal hidrofóbico em diferentes estruturas cristalográficas

As estruturas elucidadas nesse trabalho têm conformações oligoméricas idênticas, como mostrado pelo fato de que eles têm valores de RMSD de C α na faixa de 0,2-0,5 Å (**Tabela 3**). Mesmo no modelo da BnSP-7/sulfato, é observado conformação oligomérica semelhante aos modelos dos complexos e diferente da estrutura da apo-BnSP-7 anteriormente resolvida por

Magro e colaboradores(2003). Há de se considerar, entretanto, que a estrutura da apo-BnSP-7 não está ligado a nenhuma molécula ou íon, diferentemente da estrutura da BnSP-7 com íons de sulfato. A estrutura apo-BnSP-7 apresenta uma conformação oligomérica diferente de BnSP-7/sulfato ou BnSP-7 complexada, como mostrado pelo valor $C\alpha$ RMSD: ~ 15 Å (**Figura 16**). Para investigar a conformação oligomérica de toxinas PLA_2 -like, dos Santos *et al.* (2009) desenvolveram um modelo de dois ângulos que classificou essas proteínas em duas classes: estados ativos e inativos. Mais recentemente, este método foi desenvolvido em uma estratégia mais informativa com três ângulos: rotação, torção e inclinação (BORGES *et al.*, 2016). A **Tabela 6** mostra os cálculos de ângulo para as estruturas apo e complexos da BnSP-7 e os ângulos médios para proteínas PLA_2 -like em conformações ativas e inativas. Assim, a BnSP-7 complexada apresenta uma combinação de ângulos atípica que é diferente dos estados ativos e inativos previamente classificados. É interessante ressaltar que a conformação é quase idêntica à estrutura PrTX-II/ácido graxo (PDB ID 1QLL (LEE *et al.*, 2001), que foi outra exceção à conformação oligomérica entre as toxinas PLA_2 -like (DOS SANTOS, *et al.*, 2009; BORGES *et al.*, 2016).

Tabela 6: Ângulos de conformação quaternária para estruturas cristalográficas Lys49- PLA_2 s.

Estado	Ligantes	Ângulos (°)		
		Giro	Torção	Abertura
apo BnSP-7*		141	26	54
BnSP-7/sulfato		164.4	18.3	80.4
BnSP-7/CaA		164	18.8	80.5
BnSP-7/CiA		163.8	19.1	79.9
BnSP-7/CuA		163.6	19.4	80
1QLL (LEE <i>et al.</i>, 2001)		163.1	19.9	80.5
INATIVO	-	141 (0.6)	27 (0.4)	54 (1.0)
ATIVO	Moléculas hidrofóbicas e negativas	175 (4.4)	26 (2.0)	33 (8.6)

Os números entre parênteses referem-se ao desvio padrão. O estado inativo representa as estruturas cujos PDB IDs são: 1PA0 *, 2Q2J, 3HZD, 3I3H, 4K09, 4WTB *, 2H8I. O estado ativo representa as estruturas cujos PDB IDs são: 4KF3, 4YV5 *, 1XXS *, 1Y4L *, 3QNL, 4YZ7, 3CYL, 3CXI, 4YU7, 2OK9, 4K06, 3IQ3, 3MLM. * As identificações de cadeia A e B foram invertidas.

Nas estruturas da BnSP-7/sulfato e BnSP-7 complexada com ácido cafeico, foi notado a ausência de moléculas de PEG no canal hidrofóbico dessas estruturas, enquanto nas estruturas da e BnSP-7 complexada com ácido cinâmico e e BnSP-7 complexada com ácido *p*-cumárico são observadas alguns átomos de moléculas de PEG na entrada do canal hidrofóbico, mas que como citado anteriormente, não adentra, nem interage com outros resíduos referentes ao canal hidrofóbico.

Todavia, diferentemente de outros estudos com Lys49-PLA₂, onde é mostrado que a presença de ligantes no canal hidrofóbico das Lys49-PLA₂s produz a reorientação espacial de um dos monômeros, levando a formação de uma ligação de hidrogênio entre os O γ das Tyr119 de cada um dos monômeros (FERNANDES *et al.*, 2013; 2015; DOS SANTOS *et al.*, 2009), as estruturas obtidas nesse trabalho apresentam uma conformação de dímero compacto, porém com uma conformação oligomérica atípica, com o sítio correspondente ao MDiS menos exposto em relação a outras estruturas. Vale ressaltar que todas as estruturas obtidas nesse trabalho, tendo ou não a presença de PEG na entrada do canal hidrofóbico, apresentaram essa conformação espacial.

A reorientação de um dos monômeros é, segundo dos Santos *et al.* (2009) essencial para a expressão da atividade miotóxica porque alinha lado a lado a região C-terminal e o sítio miotóxico dos dois monômeros. A ausência ou presença de ácido graxo no canal hidrofóbico não interferiu na conformação oligomérica entre as estruturas desse trabalho (**Figuras 15 e 16**). Porém, a atividade miotóxica da BnSP-7 é menor em comparação com outras Lys49-PLA₂ já estudadas (TOYAMA *et al.*, 2001), o que pode indicar que o padrão miotóxico da proteína pode ocorrer na ausência de ácido graxo no canal hidrofóbico, contudo sem a mesma efetividade devido a não total exposição do MDiS.

A fim de compreender porque as diferentes proteínas botrópicas contra a preparação neuromuscular têm diferentes graus de toxicidade, foram realizadas análises das cavidades e dos

canais hidrofóbicos (túneis), comparando as propriedades físico-químicas dos canais hidrofóbicos de cada toxina (**Tabelas 4 e 5**). A maioria das propriedades químicas da análise geral das cavidades são semelhantes, tais como polaridade e hidropatia das estruturas analisadas (**Tabela 4**). A análise da face externa das cavidades mostrou que as estruturas da BnSP-7 apresentam polaridade e hidropatia menores em relação as outras estruturas (**Tabela 4**).

A principal diferença entre os canais hidrofóbicos (túneis) (**Tabela 5**) e cavidades (**Tabela 4**) calculadas é o seu volume. Os modelos da BnSP-7 possuem cavidades com um volume médio de cerca de $3400 \text{ \AA}^3$, que são pelo menos 35-45% menores do que os outros modelos avaliados de PLA_2 -like (**Tabela 4**), como por exemplo, a MjTX-II, BthTX-I e PrTX-I que têm seus canais hidrofóbicos com um volume entre 5000 e $5400 \text{ \AA}^3$. A diminuição do volume do túnel da BnSP-7 é ainda mais perceptível ao analisar apenas os canais hidrofóbicos porque exibem um volume 40-60% menor do que outras toxinas Lys49- PLA_2 (**Tabela 5**).

Foi notado que em relação aos canais hidrofóbicos (túneis), a MjTX-II possui um valor ligeiramente maior em relação as outras estruturas analisadas, pois os ácidos graxos/PEG, em vez de sair do meio da hélice N-terminal como ocorre em BthTX-I e PrTX-I, segue um caminho mais longo para o início desta mesma hélice (SALVADOR *et al.*, 2013). O volume do túnel da MjTX-II é de aproximadamente $680 \text{ \AA}^3$, enquanto o da BthTX-I e PrTX-I são ao redor de $560 \text{ \AA}^3$.

Em relação as propriedades das cavidades e canais hidrofóbicos das estruturas analisadas, nota-se que um número maior de resíduos positivos nessas regiões possui certa correlação com a miotoxicidade. Isto está de acordo com outros experimentos funcionais que mostram a importância da interação eletrostática na toxicidade, uma vez que é mostrado um aumento na toxicidade quando lipossomas ou eritrócitos humanos são enriquecidos de fosfolipídios aniônicos (BULTRÓN, GUTIÉRREZ & THELESTAM, 1993; DÍAZ *et al.*, 1991; 2001).

O aumento de resíduos positivos diminui a hidropatia e aumenta a polaridade. Para as toxinas mais potentes (MjTX-II e BthTX-I), a hidropatia da face externa das cavidades são -1,03 e -1,02; respectivamente (**Tabela 4**). Por outro lado, para PrTX-I e BnSP-7, a hidropatia da face externa das cavidades são -0,83 e -0,76; respectivamente. A polaridade da face externa das cavidades estão entre 13 e 14 para MjTX-II e BthTX-I, e é de 11,7 e 11,2 para PrTX-I e BnSP-7, respectivamente (**Tabela 4**).

Embora as sequências sejam altamente conservadas, a parte externa das cavidades e dos túneis da BnSP-7 têm um menor número de resíduos positivos e, conseqüentemente, maior hidropatia e menor polaridade. Essas propriedades podem estar relacionadas a uma menor afinidade de moléculas hidrofóbicas, como PEG e ácidos graxos. Das quatro estruturas elucidadas aqui, duas não contém PEG, enquanto as outras têm menos átomos modelados quando comparados com outras miotoxinas depositadas.

Estes dados destacam que a conformação oligomérica entre os monômeros é o fator responsável pelas diferenças na composição externa dos modelos avaliados. No arranjo quaternário incomum das estruturas da BnSP-7, onde o canal hidrofóbico está parcialmente exposto, há uma baixa composição de resíduos positivos nas cavidades e canais hidrofóbicos.

3.2.4. Relação das diferenças estruturais com as diferenças na ação miotóxica

Como discutido anteriormente, o passo inicial para o mecanismo miotóxico das Lys49-PLA₂s é a reorientação dimérica causada pela entrada de um ácido graxo no canal hidrofóbico (FERNANDES *et al.*, 2013, 2014; BORGES *et al.*, 2017). Em várias estruturas, a molécula de PEG desempenha o papel do ácido graxo. Como já mostramos, as moléculas de PEG não foram encontradas dentro do canal hidrofóbico (ligação ao resíduo His48) nas estruturas desse trabalho apesar da alta concentração nos ensaios de cristalização. Existem poucos casos da literatura (FERNANDES *et al.*, 2014), mas em todos eles, as toxinas estão na conformação inativa e,

geralmente, seus cristais pertencem ao grupo espacial $P3_12$. A análise das cavidades e túneis mostraram que a BnSP-7 têm volumes menores em comparação com outras proteínas Lys49-PLA₂, e há diferenças na disposição de resíduos básicos e hidrofóbicos na entrada de suas cavidades, que podem estar relacionadas à ausência (ou ocupação parcial) de moléculas de PEG (ou outras moléculas hidrofóbicas, como ácidos graxos) nos canais hidrofóbicos das estruturas da BnSP-7.

As estruturas da BnSP-7 elucidadas nesse trabalho apresentam uma conformação atípica, com ângulos intermediários entre as estruturas ativas e inativas, ao contrário de outras proteínas Lys49-PLA₂, como a apo-BnSP-7 (sem qualquer molécula ligada) (MAGRO *et al.*, 2003), que está no estado inativo e PrTX-I complexada com ácido cafeico (ácido cafeico ligado às moléculas MDoS e moléculas de PEG ligadas ao canal hidrofóbico) (FERNANDES *et al.*, 2015) que está no estado ativo. Assim, podemos formular a hipótese de que as estruturas da BnSP-7 estão em um estado oligomérico intermediário em comparação com outras Lys49-PLA₂.

Duas consequências estruturais adicionais que podem ser observadas para esta conformação incomum nas estruturas da BnSP-7. A primeira está relacionada à típica interação entre as Tyr119 intermonomeros nas Lys49-PLA₂s no estado ativo após a reorientação do dímero. Para a BnSP-7, esta é uma interação de longo alcance com uma distância superior a 3,3 Å. A segunda consequência é as posições de resíduos que fazem parte das regiões MDiS. Uma comparação de uma Lys-PLA₂s típica em seu estado ativo (PrTX-I / ácido cafeico) e a BnSP-7 complexada com ácido cafeico revela que a região MDiS está deslocada em mais de 12 Å (**Figura 20**), provavelmente devido a conformação oligomérica intermediária da BnSP-7 complexada.

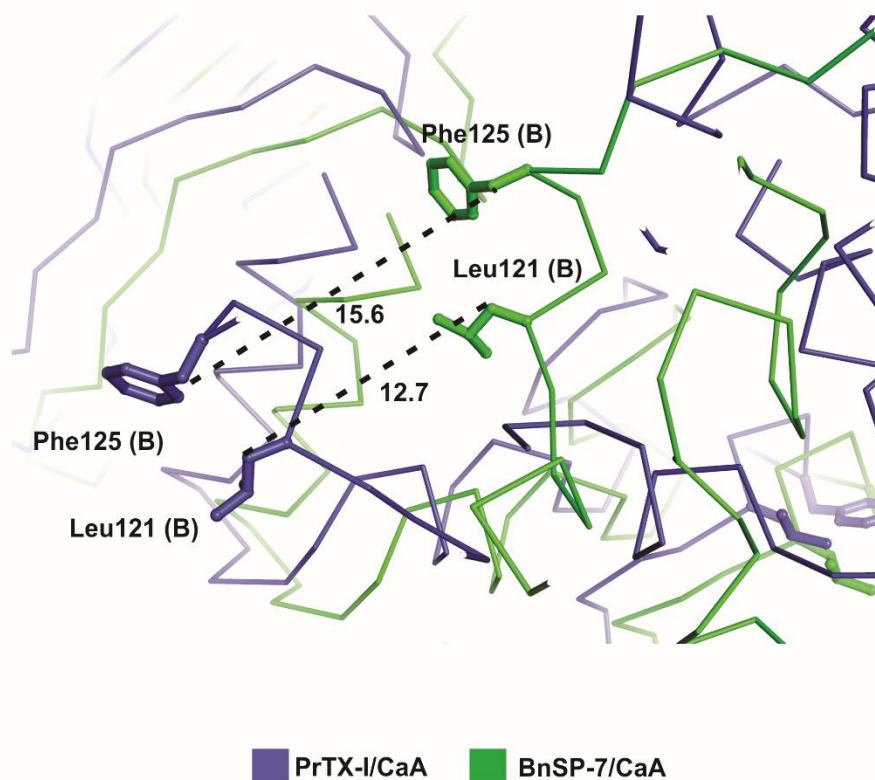


Figura 20: Sobreposição das estruturas diméricas de PrTX-I (violeta) e BnSP-7 (verde) complexadas com ácido cafeico, detalhando os resíduos (Leu121 e Phe125) que compõem o MDiS de ambas as estruturas. Os átomos de Ca do monômero A de ambas as estruturas foram sobrepostos para verificar o desvio dos resíduos nos monômeros B. As distâncias dos átomos de C β dos resíduos Leu121 e Phe125 de ambas as estruturas estão representadas por linhas tracejadas pretas.

A conservação das propriedades globais e conformação oligomérica das estruturas de Lys49-PLA₂ está relacionada com a conservação da função. A partir de todos os dados estruturais obtidos aqui, podemos sugerir que a BnSP-7 não é capaz de exercer completamente sua atividade miotóxica em comparação com outras proteínas Lys49-PLA₂ que foram previamente caracterizadas. Estudos prévios com BnSP-7 demonstraram que esta proteína tem menor atividade miotóxica do que outras Lys49-PLA₂ (SOARES *et al.*, 2000b; TOYAMA *et al.*, 2001). O principal motivo de sua atividade tóxica mais baixa pode ser a ação parcial de resíduos

hidrofóbicos no MDiS na membrana alvo porque é estruturalmente impossível para as regiões MDiS de ambos os monômeros interagirem simultaneamente.

Contudo, é importante ressaltar a relevância dos complexos obtidos, visto que mesmo em uma toxina com menos resíduos positivos expostos e conformação oligomérica intermediária, foi encontrado interações na região MDoS, com 3 ligantes diferentes, reforçando a importância dessa região como parte do mecanismo de ação das Lys49-PLA₂ (FERNANDES *et al.*, 2013), bem como nos estudos de inibição dessas toxinas.

Capítulo 4:

**EXPRESSÃO EM ALTA ESCALA EM *PICHTIA PASTORIS*, PURIFICAÇÃO E
CRISTALIZAÇÃO DA BnSP-7 HETERÓLOGA: UMA Lys49-PLA₂ DE VENENO
BOTRÓPICO**

4.1 Resultados

4.1.1. Clonagem do vetor pPicZαA-BnSP7 em *E. coli* DH5α competentes

O vetor pPicZαA, contendo o cassete de expressão para a proteína BnSP-7 foi clonado a partir da inserção em *E. coli* DH5α competentes, propagação e posterior extração através de lise alcalina, na qual foram isoladas 14 colônias, o que pode ser visualizado em gel de agarose a 1%, feito após a *miniprep*, pela presença de banda com peso em pares de base compatível com o tamanho do vetor utilizado (**Figura 21A**).

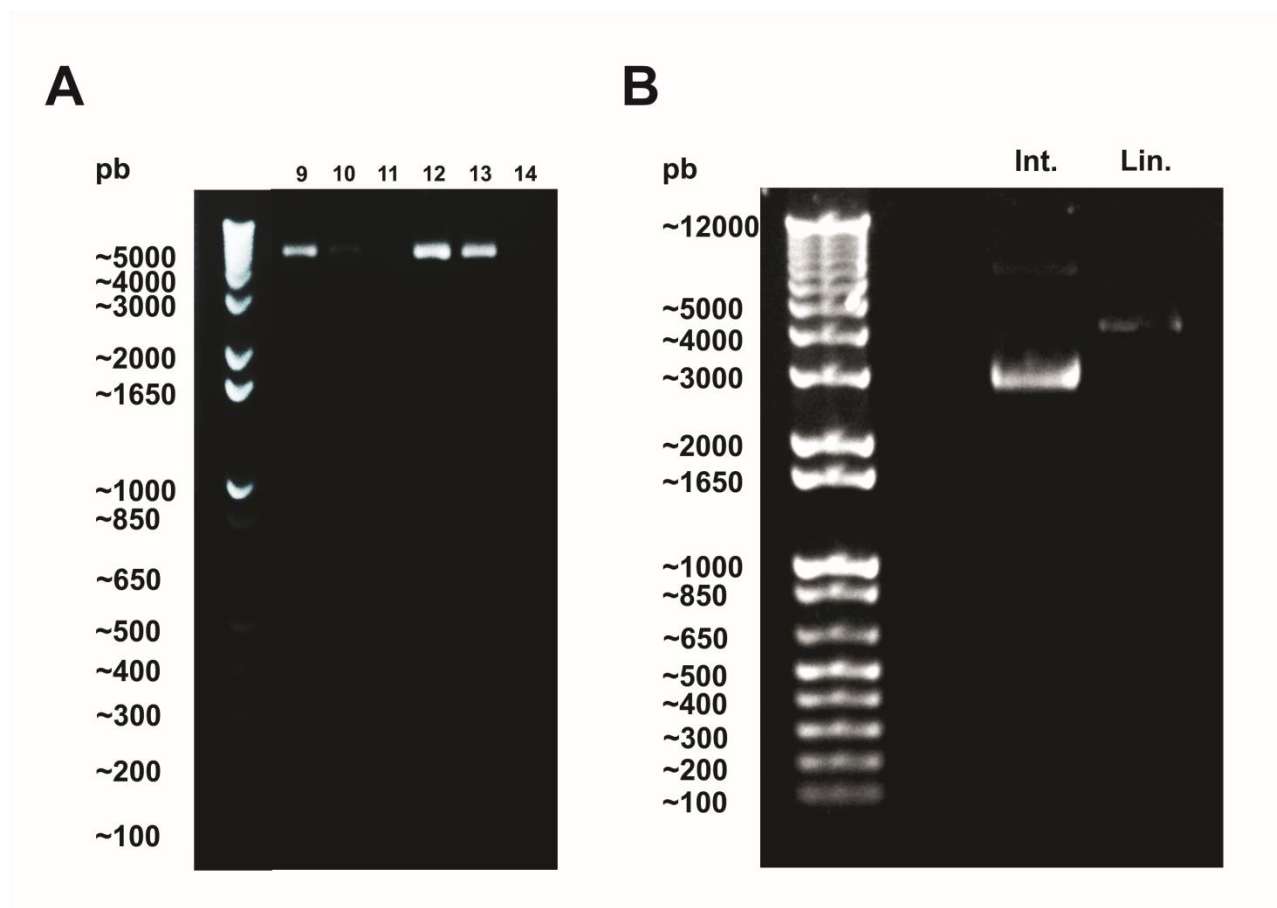


Figura 21: (A) Eletroforese da lise alcalina das células de *E. coli* DH5α competentes, colônias numeradas de 9 a 14, contendo o vetor pPicZαA-BnSP7 em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. (B) Eletroforese da linearização com *PmeI* do vetor pPicZαA-BnSP7 em gel de agarose 1%, mostrando bandas referentes ao material intacto (int.) e linearizado (lin.), corado com brometo de etídeo.

4.1.2. Linearização do vetor pPicZαA-BnSP7

O material obtido a partir da lise alcalina foi quantificado e posteriormente linearizado, utilizando para isso, a enzima de restrição *PmeI*, como mostrado na **Figura 21B**. Nota-se a eficiência no processo de linearização pela diferença no tamanho das bandas do material genômico intacto e linearizado, pois nessa forma, o DNA percorre o gel com maior resistência do que um material genômico circular ou em *Random coil*.

4.1.3. Transformação em *P. pastoris* KM71H

O vetor pPicZαA-BnSP7 linearizado foi inserido em células competentes de *P. pastoris* por eletroporação para integração no genoma da levedura. Após a transformação, as células de *P. pastoris* foram cultivadas em meio contendo 100 e 500 µg/µL de zeocina para seleção de colônias resistentes (**Figura22**). Não foram encontradas colônias na placa com meio contendo 500 µg/µL de zeocina, descartando a possibilidade de possíveis transformantes multiclonos.



Figura 22: Placa dos transformantes em KM71H contendo 100 µg/µL de zeocina, indicando a presença de colônias positivas para o inserto referente a BnSP-7 recombinante.

4.1.4. Triagem em pequena escala da expressão heteróloga em *P. pastoris* e expressão da proteína recombinante em larga escala.

Foram realizadas a expressão de 6 colônias selecionadas em tubos tipo falcon de 50 mL. O resultado da expressão visualizado em gel de poliácridamida a 13% (**Figura 23A**) indica a presença da proteína recombinante em várias colônias, com destaque para a colônia 9, a qual foi selecionada para as induções em larga escala por apresentar uma alta expressão da proteína recombinante (**Figura 23B**).

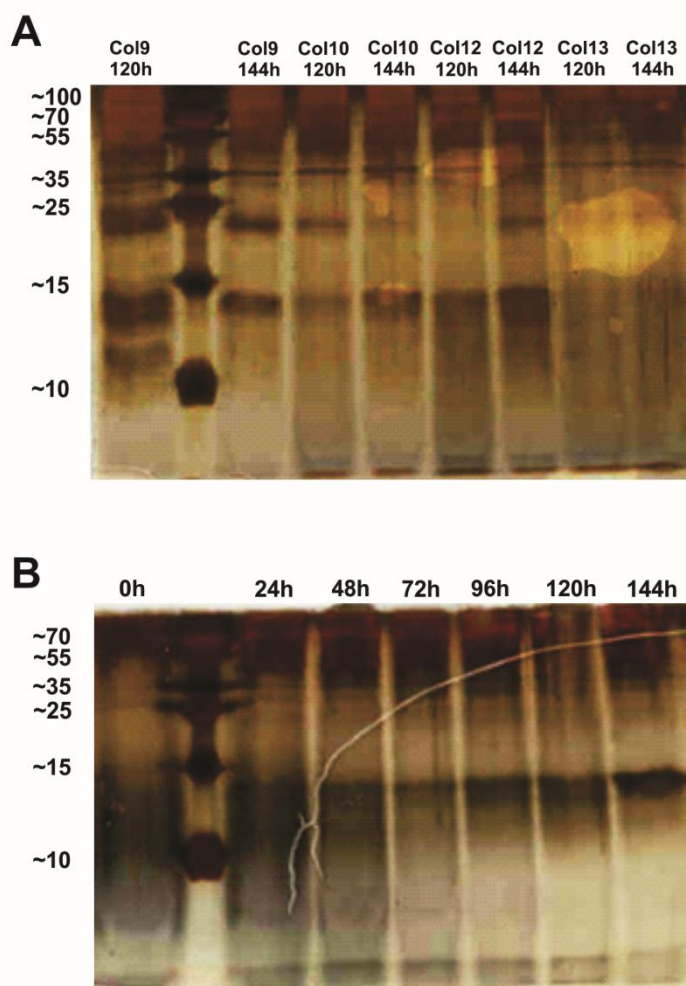


Figura 23: Gel de poliácridamida a 13%, corado com nitrato de prata referente a triagem em pequena escala da expressão heteróloga em *P. pastoris* e expressão da proteína recombinante em larga escala. **(A)** Triagem da expressão da rBnSP-7 a partir das colônias 9, 10, 12 e 13, em relação aos tempos de indução de 120 e 144h. **(B)** Expressão da proteína BnSP-7 recombinante pela colônia 9 em relação ao tempo de indução de 0h a 144h.

4.1.5. Purificação de proteínas produzidas em *P. pastoris* por filtração em gel

O sobrenadante obtido da indução da expressão foi filtrado, concentrado e aplicado em coluna de gel filtração HiLoad™ 26/600 Superdex 75 (60 cm x 26 mm, 34 µm tamanho médio de partícula), sendo que o equilíbrio e a eluição da coluna foram realizados com tampão formato de amônio 50mM, pH 3,5. As frações obtidas foram nomeadas de P1 a P6 (**Figura 24A**) e analisadas em SDS-PAGE a 13%, determinando assim as frações P2a, P2b, P3 e P4 como contendo a proteína recombinante de interesse (**Figura 24B**).

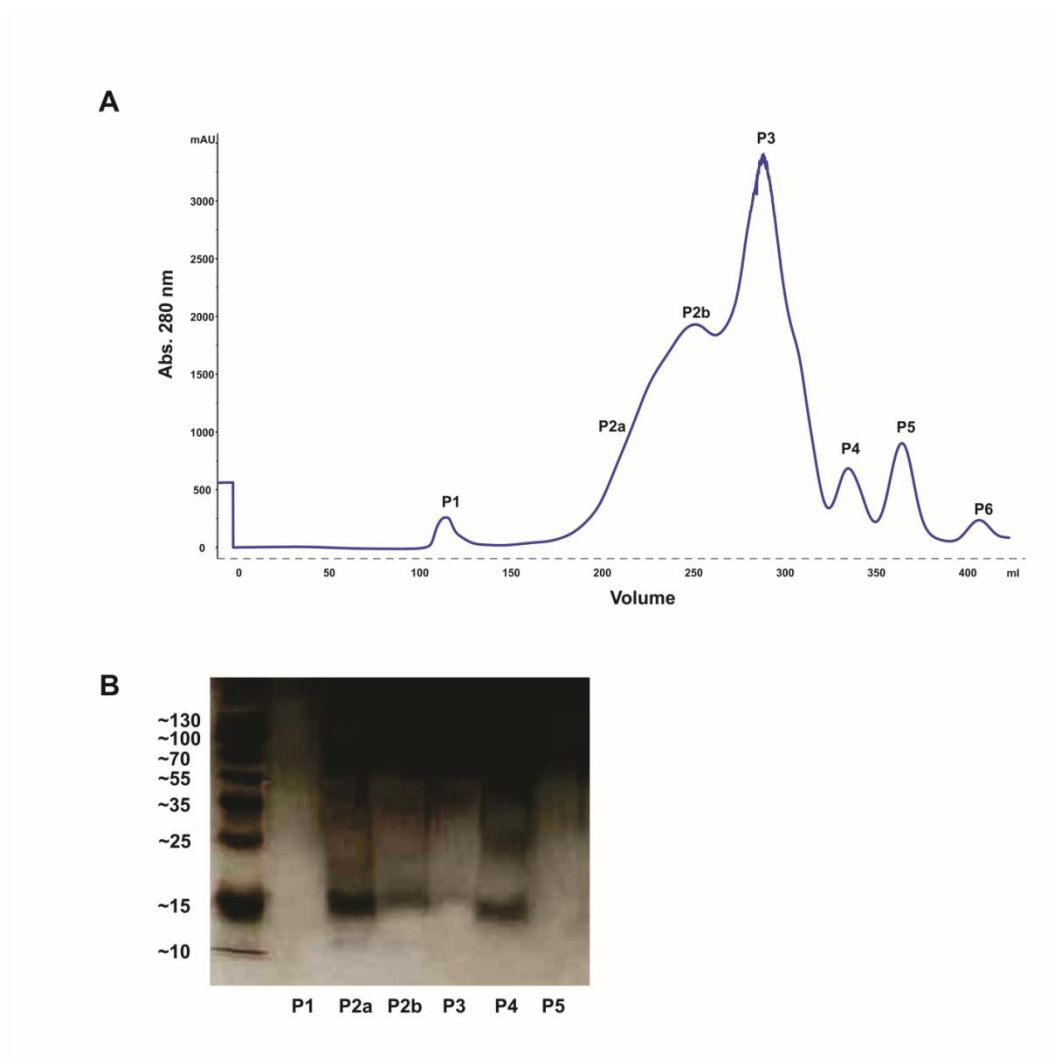


Figura 24: Purificação da BnSP-7 recombinante. **(A)** Fracionamento da indução da expressão em *P. pastoris* em coluna de gel filtração HiLoad™ 26/600 Superdex 75, equilibrada com tampão formato de amônio 50 mM, pH 3,5. As amostras foram eluídas no mesmo tampão, num fluxo de 0,5 mL/min à temperatura ambiente. Seis frações foram

coletadas. **(B)** Gel de poliacrilamida a 13% das frações oriundas da gel filtração corado com nitrato de prata, demonstrando a presença da BnSP-7 recombinante nas frações P2a, P2b, 3 e 4.

4.1.6. Experimentos de cristalização da fosfolipase A₂ BnSP-7 recombinante

As tentativas de cristalização da BnSP-7 recombinante ocorreram a partir do método convencional de difusão de vapor *sitting drop*, utilizando para tal, o quite comercial JCSG Core I Suite (QIAGEN®) composto por 96 soluções de cristalização, bem como as frações obtidas. A condição na qual foram obtidos os melhores cristais consistia em 50% (v/v) de hexileno glicol (MPD), 100 mM Tris-HCl pH 8,5 e 200 mM de fosfato de amônio. Foram obtidos cristais das frações P2b, P3 e P4 a 291 K após aproximadamente duas semanas **(Figura 25)**.

Os cristais obtidos foram levados para coleta de dados de difração. Contudo, os cristais não difrataram, o que impossibilitou análises posteriores, a partir do processamento dos dados, refinamento e elucidação das estruturas.

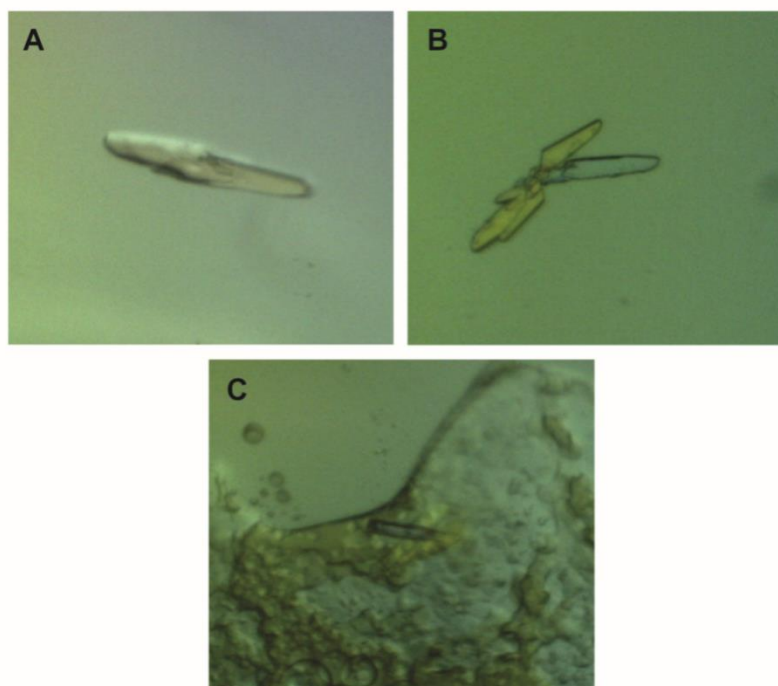


Figura 25: Cristais da BnSP-7 recombinante, induzido em sistema de expressão em *Pichia pastoris*. **(A)** Fração P2b **(B)** Fração P3 **(C)** Fração P4.

4.2. Discussão

As PLA₂s se destacam por serem as proteínas bioativas mais abundantes nas peçonhas ofídicas e de outros animais (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1997). Estas são responsáveis por causarem danos locais após o envenenamento botrópico, como mionecrose e edema, além disso são responsáveis pela ação inflamatória dentre outros efeitos (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1997; SOARES *et al.*; 2000b; CHACUR *et al.*, 2003, 2004; SOARES *et al.*, 2004).

A BnSP-7 foi a primeira PLA₂ Lys-49 isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis* como descrito por Rodrigues *et al.* (1998). Rodrigues *et al.* (2012) demonstraram o repertório de componentes proteicos presentes na glândula de peçonha da serpente *B. pauloensis*. Dentre estes as PLA₂s mostraram ser componentes abundantes perfazendo um percentual de 26,4% do total de toxinas expressas nessa glândula, sendo que o cluster BP018 apresentou 98% de identidade com a BnSP-7. Dessa sequência obtida, a ORF foi sintetizada pela GeneArt (Life Technologies™). A ORF referente à BnSP-7 foi inserida no vetor a partir dos sítios de restrição *EcoRI* (3' DNA) e *NotI* (5' DNA).

O sistema de expressão em *P. pastoris* oferece vantagens significativas para proteínas alvo que contêm múltiplas ligações dissulfeto, além de permitir a segregação da proteína autêntica na forma solúvel, sendo capaz assim, de produzir grandes quantidades da proteína recombinante em relação a sistemas bacterianos, onde comumente os produtos proteicos expressos podem se apresentar insolúveis, não enovelados ou sem o enovelamento condizente com a proteína nativa e ainda em corpos de inclusão, sendo necessários passos adicionais para solubilização e re-enovelamento (MARSTON, 1986; MAKRIDES, 1996).

O plasmídeo recombinante foi utilizado para transformar células da linhagem KM71H de *P. pastoris* através do método de eletroporação. A produção da proteína heteróloga foi eficiente, sendo que o rendimento máximo da proteína por litro de cultura de levedura foi estimado em 7,0 mg, sendo este um valor considerado elevado quando comparado com trabalhos em sistemas

bacterianos de expressão (SELISTRE-DE-ARAÚJO *et al.*, 2000; RAMOS, 2001). Contudo, devido à ausência da cauda de histidina, necessária para a purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade, no inserto clonado e consequentemente na proteína expressa, outras estratégias de purificação tiveram de ser empregadas.

A ausência da cauda de *His* na clonagem e expressão da BnSP-7 recombinante ocorreu devido ao risco da presença das seis histidinas que compõem a cauda na porção C-terminal, próxima as regiões do MDiS e MDoS, descrita na literatura como fundamental no mecanismo de ação dessa toxina (FERNANDES *et al.*, 2013; 2014), bem como o risco dessas histidinas na porção N-terminal, próximo à entrada do canal hidrofóbico, outra região importante para a função das Lys49PLA₂ (DOS SANTOS *et al.*, 2009). Isso em uma proteína que contém apenas 121 aminoácidos.

Os melhores resultados foram obtidos a partir de cromatografia por exclusão molecular, utilizando um tampão com pH ácido, na tentativa de minimizar a agregação das moléculas, distanciando do ponto isoelétrico da proteína (pI próximo de 9) afim de se obter um melhor espectro cromatográfico.

A agregação de proteínas é um evento geral, que pode acontecer com qualquer proteína conhecida (DE FELICE *et al.*, 2004; ENCISO, SCHÜTTE & DELLE SITE, 2015). A propensão à agregação, entretanto, depende de fatores como particularidades da sequência de proteínas (FITZPATRICK *et al.*, 2011; ENCISO, SCHÜTTE & DELLE SITE, 2015) e da estrutura (HECHT, 1994; ENCISO, SCHÜTTE & DELLE SITE, 2015), bem como de fatores externos como pH, concentração, força iônica, entre outros. Sabe-se que certas condições de solução, tais como o pH e força iônica podem minimizar ou exacerbar a agregação de proteínas (CHAN & CHEN, 2001; FANI, FELL & SUKI, 1983; PALECEK & ZYDNEY, 1994). Em relação ao pH, foi observado em análises sobre a taxa de agregação de BSA um aumento da agregação das proteínas com o aumento do pH (CHAN & CHEN, 2001; KELLY & ZYDNEY, 1997).

Mesmo realizado a partir do uso de tampão formato de amônio, pH 3,5, os resultados de purificação em gel filtração mostram a presença da proteína recombinante em 4 picos, sugerindo que ainda possa estar ocorrendo formação de aglomerados proteicos (**Figura 24**), visto que a análise em SDS-PAGE a 13% em condições redutoras, mostram as 4 frações com massa molecular compatível com PLA₂.

Apesar da presença do fator alfa no vetor de expressão, responsável pelo direcionamento da proteína recombinante ao sobrenadante, o que leva a diminuição das etapas no processo de purificação das proteínas recombinantes expressas, foi notado a presença de sobrenadantes de coloração amarela. Culturas de alta densidade celular de *Pichia pastoris* cultivadas em metanol tendem a desenvolver sobrenadantes de cor amarela, atribuídos à liberação de riboflavinas (MARX, MATTANOVICH & SAUER, 2008). A síntese de riboflavinas em leveduras ocorre na via do metabolismo do metanol, a partir de GTP e ribulose-5-fosfato, nas reações da via das pentoses-fosfato (MARX, MATTANOVICH & SAUER, 2008). Infelizmente, o método descrito na literatura para a remoção de riboflavina de sobrenadantes advindos de processos de fermentação envolve o aquecimento do sobrenadante a uma temperatura de 90 °C, durante 1 a 3 horas, e posteriormente arrefecida a 30 °C, durante 1 a 5 horas, seguida de centrifugação (FAUST *et al.*, 1992), processo que levaria a degradação das proteínas expressas. Com isso, devido a coloração amarela presente no sobrenadante, houve a impossibilidade de experimentos estruturais não cristalográficos (com a proteína em solução), por prejudicar análises dependentes de absorção ou espalhamento de luz. Com isso não foram realizados experimentos de CD e DLS com a proteína recombinante.

Como dito anteriormente, são relatadas na literatura a clonagem e expressão de algumas PLA₂ recombinantes oriundas de peçonhas de serpentes, tais como a BmooPLA₂, uma fosfolipase A₂ ácida da peçonha de *Bothrops moojeni* (SILVEIRA *et al.*, 2013) ou a BthTX-I, uma miotoxina da peçonha de *Bothrops jararacussu*, que é a única PLA₂-like botrópica

recombinante relatada até então (SETO *et al.*, 2008). Todavia, essas proteínas foram expressas em sistema de expressão em *E. coli*, em corpos de inclusão e sem o enovelamento correto. O protocolo de re-enovelamento descrito na literatura (WARD *et al.*, 2001), envolve várias etapas de solubilização dos corpos de inclusão, de purificação, incluindo cromatografia de fase reversa, e, ainda, as etapas adicionais de re-enovelamento, o que potencializa eventuais perdas da proteína expressa, bem como leva a um aumento dos custos e do tempo desse processo.

Nesse âmbito, se destaca a clonagem, expressão e purificação da BnSP-7 recombinante, em sistema de expressão em *Pichia pastoris*, a primeira PLA₂-like botrópica expressa com sucesso nesse sistema, e em quantidades significativas para que fosse realizado experimentos de cristalização, processo que demanda grandes quantidades de material proteico.

Os resultados de cristalização das frações obtidas demonstraram que poucas soluções de cristalização presentes no quite JCSG Core I Suite (QIAGEN©) foram eficientes na cristalização da BnSP-7 em sua forma recombinante. Dentre as quais, se destaca a condição composta por 50% (v/v) de hexileno glicol (MPD), 100 mM Tris-HCl pH 8,5 e 200 mM de fosfato de amônio, que foi a mais favorável ao crescimento de cristais das 3 frações (P2b, P3 e P4) que foram utilizadas nos experimentos de cristalização e resultaram em cristais, o que sugere que de fato, essas frações se tratam da BnSP-7 em diferentes estados de agregação.

Porém, em razão dos cristais obtidos não terem difratado em resolução suficiente para a elucidação da estrutura, torna-se necessário a otimizaçãoda condição de cristalização, bem como as condições de estados de agregação molecular da amostra proteica utilizadas nos ensaios de cristalização.

Há na literatura, vários estudos estruturais envolvendo PLA₂ recombinantes, como estruturas cristalográficas de fosfolipase A₂ pancreática bovina (SEKAR *et al.*, 1998; SEKAR & SUNDARALINGAM, 1999), PLA₂ humana Peroxiredoxin-6 (CHOI *et al.*, 1998), PLA₂ da classe XIB, presentes em arroz (GUY, STÅHL & LINDQVIST, 2009), todas expressas em

sistemas com *E coli*. Todavia, não há relatos de estudos cristalográficos envolvendo PLA₂ recombinantes de peçonhas de serpentes, tampouco miotoxinas Lys49-PLA₂ recombinantes de serpentes botrópicas.

Graças a grande quantidade de proteína produzida no sistema em *P. pastoris*, foi possível a obtenção de cristais da BnSP-7 recombinante, os primeiros obtidos para toxinas PLA₂-like botrópicas, abrindo perspectivas para que, com a otimização desse sistema, outras Lys49-PLA₂ possam ser expressas no sistema em *P. pastoris* e cristalizadas, incrementando material de estudo para essas toxinas que são fundamentais nos efeitos locais decorrentes do envenenamento ofídico (GUTIERREZ & LOMONTE, 1995).

Capítulo 5:

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados apresentados nesse trabalho ressaltam a importância da técnica de cristalografia de proteínas para obtenção de informações acerca do funcionamento de macromoléculas biológicas, bem como destaca a importância das técnicas de biologia molecular, sobretudo o sistema de expressão em *Pichia pastoris*, como ferramenta na obtenção de objetos de estudo biológicos em quantidades consideráveis, facilitando os estudos que visam elucidar os possíveis mecanismos de ação destas toxinas a partir da aquisição de seus modelos moleculares e de estudos funcionais. Desta forma, essa técnica abre caminhos para a compreensão de quais domínios estruturais são responsáveis pelas diferentes atividades apresentadas por estas enzimas, além de reduzir o sofrimento e estresse causado às serpentes na extração da peçonha. Os resultados obtidos mostraram que a cristalografia aliada com análises estruturais em solução e técnicas computacionais formam uma ferramenta interessante para o entendimento mais profundo e completo da ação destas moléculas.

Neste trabalho, são apresentadas estruturas cristalográficas da BnSP-7, uma Lys49-PLA₂s isolada do veneno da serpente *B. pauloensis*, na sua forma nativa, bem como complexadas com diferentes ligantes derivados do ácido cinâmico (ácido cafeico, ácido cinâmico e ácido *p*-cumárico). A análise destas estruturas reforça a hipótese de inibição da miotoxicidade causada por Lys49-PLA₂s em que ocorre o bloqueio da região MDoS pela interação com o ligante, mostrando estruturas em que outros ligantes derivados do ácido cinâmico se ligaram a BnSP-7 na mesma região em que o ácido cafeico se ligou na estrutura da PrTX-I. Os dados obtidos pelas análises de espectroscopia de fluorescência e MST também reforçam essa hipótese. Assim os dados obtidos trazem evidências que ajudam na validação do mecanismo de expressão da miotoxicidade em que há dois locais de interação destas proteínas com a membrana alvo (MDoS e MDiS) proposto anteriormente, bem como dos mecanismos de inibição propostos, sendo que os três ligantes testados podem ser potencialmente utilizados como inibidores para a BnSP-7.

As análises computacionais das cavidades das estruturas obtidas revelaram que a disposição oligomérica intermediária entre os monômeros, sugerido para as estruturas encontradas, não permitem que MDiS de ambos os monômeros fiquem no mesmo plano de MDoS, além de promover a ausência ou ocupação parcial de moléculas no canal hidrofóbico. Juntamente com um menor número de resíduos positivos na cavidade, esses podem ser os fatores responsáveis pela menor toxicidade da BnSP-7 em relação a outras miotoxinas.

Contudo, é importante ressaltar a relevância dos complexos obtidos, visto que mesmo em uma toxina com menos resíduos positivos expostos, foram encontrados interações na região MDoS, com 3 ligantes diferentes, reforçando a importância dessa região como parte do mecanismo de ação das Lys49-PLA₂ bem como nos estudos de inibição dessas toxinas.

Também são apresentados nesse trabalho os resultados da expressão em alta escala em *Pichia pastoris*, purificação e cristalização da BnSP-7 heteróloga, em que ficou evidenciado o sucesso da técnica de expressão em sistema em *Pichia pastoris*, sendo que foram obtidas quantidades significativas de material proteico em relação ao rendimento em sistemas bacterianos, o que permitiu que fossem realizados experimentos preliminares de cristalização da proteína recombinante, abrindo perspectivas para que, com a otimização desse sistema, outras Lys49-PLA₂ possam ser expressas no sistema em *P. pastoris* e cristalizadas, incrementando material de estudo para essas toxinas que são fundamentais nos efeitos locais decorrentes do envenenamento ofídico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, P. D.; AFONINE, P. V.; BUNKÓCZI, G.; *et al.* PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**. v.66(Pt 2), p. 213-221. 2010.

AGORO, J. W. Crystalline caffeic acid derivatives and compositions and method for treating snakebite.US 4124724 A. 1978.

ALIROL, E.; SHARMA, S. K.; BAWASKAR, H. S.; KUCH, U.; CHAPPUIS, F. Snake Bite in South Asia: A Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 4(1), e603. 2010.

AMBROSIO, A. L. B.; NONATO, M. C.; DE ARAUJO, H. S. S.; ARNI, R.; WARD, R. J.; OWNBY, C. L.; DE SOUZA, D. H. F.; GARRATT, R. C. A molecular mechanism for Lys (49)-phospholipase A₂ activity based on ligand-induced conformational change. **Journal of Biological Chemistry**, v.280, p.7326-7335, 2005.

ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; ÂNGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Myotoxic phospholipases A₂ in *Bothrops* snake venoms: effects of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of Bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**, v.82, p.755-763, 2000.

ARAGÃO, E. A. **Efeito bactericida de Fosfolipases A₂-Lys49: o papel da região C-terminal na atividade de Bothropstoxina-I em membranas biológicas e artificiais**. 2005. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área: Química) Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2005.

ARAÚJO, F. A. A.; SANTALÚCIA, M.; CABRA, R. F. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr, editors. *Animais Peçonhentos no Brasil*. São Paulo: Sarvier. pp. 6–12.2003.

ARNI, R. H.; WARD, R. J. Phospholipase A₂. A structural review. **Toxicon**. v. 34, p. 827–841, 1996.

BAKER, N.A.; SEPT, D.; HOLST, M.J.; MCCAMMON, J.A. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 98, p.10037–10041.2001.

BOGDASHEV, N.N.; TUKHOVSKAYA, N.A.; POGREBNYAK, A.V. Relationship between biological activity and thermodynamic properties of 5,5-dimethyl-1,3-cyclohexanedione derivatives. **Pharmaceutical Chemistry Journal**. v. 32, p. 31 – 33.1998.

BORGES, R.J.; CARDOSO, F.F.; FERNANDES, C.A.H.; DREYER, T.R.; DE MORAES, D.S.; FLORIANO, R.S.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; FONTES, M.R.M. Functional and structural studies of a Phospholipase A₂-like protein complexed to zinc ions: Insights on its myotoxicity and inhibition mechanism. **Biochim.Biophys. Acta BBA - Gen. Subj**. v. 1861, p. 3199–3209. 2017.

BORGES, R.J.; LEMKE, N.; SAMMITO, M.; MILLÁN, C.; USÓN, I.; FONTES, M.R.M. PLA₂s-like membrane perturbation mechanism: extracting the most of crystallography data, **ActaCrystallogr. Sect. A Found.Adv**. v. 72 s226–s226. 2016.

BRUNGER, 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. Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. **Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography**, v.54, p.905-921, 1998.

BULTRÓN, E.; GUTIÉRREZ, J.M.; THELESTAM, M. Effects of *Bothrops asper* (terciopelo) myotoxin III, a basic phospholipase A₂, on liposomes and mouse gastrocnemius muscle, **ToxiconOff. J. Int. Soc. Toxinology**. v. 31, p. 217–222. 1993.

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A₂ biochemistry. **Cardiovasc. Drugs Ther.** v. 23, p. 49–59, 2009a.

CALVETE, J. J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venomomics. Strategy and applications. **J. Mass. Spectrom.** v. 42, p. 1405-1414, 2007.

CALVETE, J.J. Snake venomomics: from the inventory of toxins to biology, **Toxicon**.v.75, p. 44–62. 2013.

CARDOSO, K. C.; DA SILVA, M. J.; COSTA, G. G.; TORRES, T. T.; DEL BEM, L. E.; VIDAL, R. O.; MENOSSI, M.; HYSLOP, S. A transcriptomic analysis of gene expression in the venom gland of the snake *Bothrops alternatus* (urutu). **BMC Genomics**, v. 11, p. 605, 2011.

CARRASCO, P. A; MATTONI, C. I; LEYNAUD, G. C. SCROCCHI, G. J. Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). **Zoologia Scripta**. v. 41, p. 109–124, 2012.

CARSON, M. Ribbons.Methods. **Enzymol.** v. 277, p. 493–505. 1997.

CHACUR, M.; LONGO, I.; PICOLO, G.; GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B.; GUERRA, J. L.; TEIXEIRA, C. F.; CURY, Y. Hyperalgesia induced by Asp49 and Lys49 phospholipases A₂ from *Bothrops asper* snake venom: pharmacological mediation and molecular determinants. **Toxicon**. v. 41(6), p. 667-678, 2003.

CHACUR, M.; MILLIGAN, E. D.; SLOAN, E. M.; WIESELER-FRANK, J.; BARRIENTOS, R. M.; MARTIN, D.; POOLE, S.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J. M.; MAIER, S. F.; CURY, Y.; WATKINS, L. R. Snake venom phospholipase A₂s (Asp49 and Lys49) induce mechanical allodynia upon peri-sciatic administration: involvement of spinal cord glia, proinflammatory cytokines and nitric oxide. **Pain**. v. 108(1-2), p. 180 -191, 2004.

CHAN, R.; CHEN, V. The effects of electrolyte concentration and pH on protein aggregation and deposition: critical flux and constant flux membrane filtration, **J. Membr. Sci.** v. 185, p. 177–192. 2001.

CHEN, J.H.; HO, C.T. Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds. **J. Agric. Food Chem.** v. 45, p. 2374-2378.1997.

CHIOATO, L.; ARAGAO, E. A.; FERREIRA, T. L.; DE MEDEIROS, A. I.; FACCIOLI, L. H.; WARD, R. J. Mapping of the structural determinants of artificial and biological membrane

damaging activities of a Lys49 phospholipase A₂ by scanning alanine mutagenesis. **Biochim. Biophys. Acta.** v.1768, p. 1247–1257, 2007.

CHIOATO, L.; DE OLIVEIRA, A. H. C.; RULLER, R.; SÁ, J. M.; WARD, R. J. Distinct sites for myotoxic and membrane-damaging activities in the C-terminal region of a Lys49-phospholipase A₂. **Biochem.J.** v.366, p. 971-976, 2002.

CHOI, H.J., KANG, S.W., YANG, C.H., RHEE, S.G., RYU, S.E. Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 Å resolution. **Nat. Struct. Biol.** v. 5. p. 400-406. 1998.

CORREIA-DE-SA, P.; NORONHA-MATOS, J.B.; TIMOTEO, M.A.; FERREIRINHA, F.; MARQUES, P.; SOARES, A.M.; *et al.* Bothropstoxin-I reduces evoked acetylcholine release from rat motor nerve terminals: radiochemical and real-time video-microscopy studies. **Toxicon.** v. 61, p. 16–25. 2013.

CREGG, J. M. (Ed.) **Methods in Molecular Biology**. 2nd. Totowa, NJ. Humana Press. Pichia Protocols. 2007.

DA SILVA-GIOTTO, M. T.; GARRATT, R. C.; OLIVA, G.; MASCARENHAS, Y. P.; GIGLIO, J. R.; CINTRA, A. C. O.; DE AZEVEDO-JR, W. F.; ARNI, R. K.; WARD, R. J. Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: conformational changes I bothropstoxin I, a dimeric Lys49-phospholipase A₂ homologue. **Prot. Struct. Funct. Genet.** v. 30, p. 442 – 454, 1998.

DALY, R.; HEARN, M. T. W. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **J. Mol. Recognit.** v. 18, p. 119–138, 2005.

DE FELICE, F.G.; VIEIRA, M.N.N.; MEIRELLES, M.N.L.; MOROZOVA-ROCHE, L.A.; DOBSON, C.M. & FERREIRA, S.T. Formation of amyloid aggregates from human lysozyme and its disease-associated variants using hydrostatic pressure. **FASEB J**, 2004.

DE OLIVEIRA, A. H.; GIGLIO, J. R.; ANDRIO-ESCARSO, S. H.; ITO, A. S; WARD, R. J. A pH-induced dissociation of the dimeric form of a lysine 49-phospholipase A₂ abolishes Ca²⁺ independent membrane damaging activity. **Biochemistry.** v. 40(23), p. 6912-6920, 2001.

DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. **The Journal of Biological Chemistry.** v. 269 (18), p. 13057-13060, 1994.

DÍAZ, C.; GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B.; GENÉ, J.A. The effect of myotoxins isolated from *Bothrops* snake venoms on multilamellar liposomes: relationship to phospholipase A₂, anticoagulant and myotoxic activities, **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1070, p. 455–460. 1991.

DÍAZ, C.; LEÓN, G.; RUCAVADO, A.; ROJAS, N.; SCHROIT, A.J.; GUTIÉRREZ, J.M. Modulation of the susceptibility of human erythrocytes to snake venom myotoxic phospholipases A₂: role of negatively charged phospholipids as potential membrane binding sites, **Arch. Biochem. Biophys.** v. 391, p. 56–64. 2001.

DOLINSKY, T.J.; NIELSEN, J.E.; MCCAMMON, J.A.; BAKER, N.A. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. **Nucleic Acids Res.**v. 32, p.665–667. 2004.

DOS SANTOS, J. I.; CARDOSO, F. F; SOARES, A. M.; DAL-PAI, M.; GALLACCI, M.; FONTES, M. R. M. Structural and Functional Studies of a Bothropic Myotoxin Complexed to Rosmarinic Acid: New Insights into Lys49-PLA₂ Inhibition. **Plos One.** v. 6, p. e28521, 2011.

DOS SANTOS, J. I.; MARCHI-SALVADOR, D. P.; FERNANDES, C. A. H; SILVEIRA, L. B.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M. Preliminary X-ray crystallographic studies of a Lys49-phospholipase A₂ homologue from *Bothrops pirajai* venom complexed with pbromophenacyl bromide and alpha-tocopherol inhibitors. **Protein Pept.Lett.** v.14, p.698- 701, 2007.

DOS SANTOS, J. I.; SANTOS-FILHO, N. A., SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of a Lys49-phospholipase A₂ homologue from *Bothrops pirajai* venom complexed with rosmarinic acid. **Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.**v. 66, p. 699–701. 2010.

DOS SANTOS, J. I.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M. Comparative structural studies on Lys49-phospholipases A₂ from *Bothrops* genus reveal their myotoxic site. **Journal of Structural Biology.** v. 167, p. 106-116, 2009.

EMSLEY, P.; LOHKAMP, B.; SCOTT, W.G.; COWTAN, K. Features and development of Coot. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography.** v. 66(Pt 4), p. 486-501. 2010.

ENCISO, M.; SCHÜTTE, C.; DELLE-SITE, L. Influence of pH and sequence in peptide aggregation via molecular simulation. **The Journal of Chemical Physics.**v.143(24). 2015.

FANE, A.G.; FELL, C.J.D.; SUKI, A. The effect of pH and ionic environment on the ultrafiltration of protein solutions with retentive membranes, **J. Membr. Sci.** v. 16. p. 195–210. 1983.

FAUST, T.; MEYER, J.; WELLINGHOFF, G.; GOSELE, W.; MARTIN, C.; GRIMMER, J. Removal of riboflavin from fermentation suspensions.US5169759. 1992.

FERNANDES, C. A. H.; BORGES, R. J.; LOMONTE, B.; FONTES, M. R. M. A structure-based proposal for a comprehensive myotoxic mechanism of phospholipase A₂-like proteins from viperid snake venoms. **Biochim Biophys Acta.** v. 1844, p. 2265–2276, 2014.

FERNANDES, C. A. H.; CARDOSO, F. F.; CAVALCANTE, W. G. L.; SOARES, A. M.; DAL-PAI, M.; *et al.* Structural Basis for the Inhibition of a Phospholipase A₂-Like Toxin by Caffeic and Aristolochic Acids. **PLoS ONE.** v.10(7), 2015.

FERNANDES, C. A. H.; COMPARETTI, E. J.; BORGES, R. J.; HUANCHAHUIRE-VEJA, S.; PONCE-SOTO, L. A.; MARANGONI, S.; *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, p. 2772–2781, 2013.

FERNANDES, C. A. H.; MARCHI-SALVADOR, D. P.; SALVADOR, G. H. M.; SILVA, M. C.; COSTA, T. R.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M. Comparison between apo and complexed structures of bothropstoxin-I reveals the role of Lys122 and Ca²⁺ binding loop for the catalytically inactive Lys49-PLA₂s. **J. Struct. Biol.** v. 171, p. 31–43, 2010.

FERREIRA, T.L.; RULLER, R., CHIOATO, L., WARD, R.J. Insights on calcium-independent phospholipid membrane damage by Lys49-PLA₂ using tryptophan scanning mutagenesis of bothropstoxin-I from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie.** v.90, p.1397-1406, 2008.

FITZPATRICK, A.W.; KNOWLES, T.P.J.; WAUDBY, C.A.; VENDRUSCOLO, M. & DOBSON, C.M. Inversion of the balance between hydrophobic and hydrogen bonding interactions in protein folding and aggregation. **PLoS Comput Biol.** v. 7(10):e1002169, 10. 2011.

FRANCIS, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; KAISER, I. I. Myotoxin II from *Bothrops asper* (Terciopelo) venom is a lysine-49 phospholipase A₂. **Arch Biochem Biophys.** v. 284, p. 352-359, 1991.

GIULIANI, C. D.; IEMMA, M. R.; BONDIOLI, A. C.; SOUZA, D. H.; FERREIRA, L. L.; AMARAL, A. C.; SALVINI, T. F.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. Expression of an active recombinant lysine 49 phospholipase A₂ myotoxin as a fusion protein in bacteria. **Toxicon.** v. 39, p. 1595–1600, 2001.

GOWDA, C.D.; RAJESH, R.; NATARAJU, A.; DHANANJAYA, B.L.; RAGHUPATHI, A.R.; *et al.* Strong myotoxic activity of *Trimeresurus malabaricus* venom: role of metalloproteases. **Mol Cell Biochem.** v. 282, p. 147–155. 2006.

GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon.** v. 33, p. 1405-1424, 1995.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipases A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms, in: *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism*. **John Wiley and Sons.** pp. 321-352, 1997.

GUTIÉRREZ, J. M.; THEAKSTON R. D. G.; WARRELL, D. A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: The need for a global partnership. **PLoS Med.** v. 3, p. 727-731, 2006.

GUY, J.; STÅHL, U. & LINDQVIST, Y. Crystal structure of a class XIB phospholipase A₂: rice (*Oryza sativa*) isoform-2 PLA₂ and an octanoate complex. **J Biol Chem.** v.284, p.19371–19379.2009.

HARRISON, R. A.; HARGREAVES, A.; WAGSTAFF, S. C.; FARAGHER, B.; LALLOO, D. G. Snake envenoming: a disease of poverty, **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 3, e569, 2009.

HECHT, M.H. De novo design of beta-sheet proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 91(19), p.8729–8730, 1994.

HOLLAND, D. R.; CLANCY, L. L.; MUCHMORE, S. W.; RYDE, T. J.; EINSPAHR, H. M.; FINZEL, B. C.; HEINRIKSON, R. L.; WATENPAUGH, K. D. 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, p. 17649–17656, 1990.

JERABEK-WILLEMSSEN, M; WIENKEN, C.J.; BRAUN, D.; BAASKE, P.; DUHR, S. Molecular interaction studies using microscale thermophoresis, **Assay and Drug Development Technologies.** v. 9, p.342–353. 2011.

KARPLUS, P. A.; DIEDERICHS, K. Linking crystallographic model and data quality. **Science (New York, N.Y.)**, v. 336, n. 6084, p. 1030–1033, 2012.

KASTURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, A.R.; DE SILVA, N.; GUNAWARDENA, N.K.; PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R.; *et al.* The global burden of snakebite: a literature analysis and modeling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLoS Med.** v. 5, e218. 2008.

KELLY, S.T.; ZYDNEY, A.L. Protein fouling during microfiltration: comparative behaviour of different model proteins, **Biotech. Bioeng.** v. 55, p. 91–100. 1997.

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon.** v. 42, p. 827-840, 2003.

KUNTZ, I. D. Structure-based strategies for drug design and discovery. **Science**, v.257, p.1078-1082, 1992.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** v. 227(5259), p. 680-685, 1970.

LASKOWSKI, R.A.; SWINDELLS, M.B. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. **J Chem Inf Model.** v. 10, p. 2778–2786. 2011.

LEE, W.H.; DA SILVA GIOTTO, M.T.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M.H.; POLIKARPOV, I.; GARRATT, R.C. Structural basis for low catalytic activity in Lys49 phospholipases A₂-A hypothesis: The crystal structure of piratoxin II complexed to fatty acid, **Biochemistry.** v. 40.p. 28–36. 2001.

LIANG, N. S.; PUNGERCAR, J.; KRIZAJ, I.; STRUKELJ, B.; GUBENSEK, F. Expression of fully active ammodytoxin A, a potent presynaptically neurotoxic phospholipase A₂, in *Escherichia coli*. **FEBS lett.** v. 334, p. 55–59, 1993.

LOMONTE, B.; FERNÁNDEZ, J.; SANZ, L.; ANGULO, Y.; SASA, M.; GUTIÉRREZ, J. M.; *et al.* Venomous snakes of Costa Rica: biological and medical implications of their venomproteomic profiles analyzed through the strategy of snake venomomics, **J. Proteomics.** v.105, p. 323–339. 2014.

MAGRO, A. J.; SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R. M. Crystal structures of BnPS-7 and BnSP-6, two Lys-49-phospholipases A₂: quaternary structure and inhibition mechanism insights. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 311, p. 713–720, 2003.

MAKRIDES, S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. **Microbiological reviews**. v. 60, p. 512-538, 1996.

MARSTON, F. A. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. **Biochem. J.** v. 240, p. 1-12. 1986.

MARX, H.; MATTANOVICH, D.; SAUER, M. Overexpression of the riboflavin biosynthetic pathway in *Pichia pastoris*. **Microb Cell Fact.** v. 7, p. 23. 2008.

MCPHERSON, A. **Introduction to Macromolecular Crystallography**. Hoboken: Wiley-Liss. 2003

MONSALVE, R. I.; LU, G.; KING, T. P. Expressions of recombinant venom allergen, antigen 5 of yellowjacket (*Vespula vulgaris*) and paper wasp (*Polistes annularis*), in bacteria or yeast. **Protein Express. Purif.** v. 16, p. 410-416, 1999.

MORA-OBANDO, D.; FERNÁNDEZ, J.; MONTECUCCO, C.; GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Synergism between Basic Asp49 and Lys49 Phospholipase A₂ Myotoxins of Viperid Snake Venom In Vitro and In Vivo. Zhang C, ed. **PLoS ONE**. v. 9(10): e109846. 2014.

MORS, W. B.; NASCIMENTO, M. C.; PEREIRA, B. M.; PEREIRA, N. A. Plant natural products active against snake bite—the molecular approach. **Phytochemistry**. v. 55, p. 627-642, 2000.

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. Interfacial surface charge and free accessibility to the PLA₂-active site-like region are essential requirements for the activity of Lys49 PLA₂ homologues, **Toxicon**. v. 49, p. 378-387. 2007.

NÚÑEZ, C. E.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Identification of the myotoxic site of the Lys49 phospholipase A₂ from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* snake venom: synthetic C-terminal peptides from Lys49, but not from Asp49 myotoxins, exert membrane-damaging activities. **Toxicon**. v. 39 (10), p. 1587-1594, 2001.

OGAWA, T.; SHIMOHIGASHI, Y.; OHNO, M. Evidence for functional involvement of asparagine 67 in substrate recognition by snake venom phospholipases A₂. **J. Biochem.** v. 122, p. 955-960, 1997.

OTWINOWSKI, Z.; MINOR, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. **Macromolecular Crystallography, Pt A**, v.276, p.307-326, 1997.

PALECEK, S.P.; ZYDNEY, A.L. Hydraulic permeability of protein deposits formed during microfiltration: effect of solution pH and ionic strength, **J. Membr. Sci.** v. 95, p. 71-81. 1994.

PETTERSEN, E.F.; GODDARD, T.D.; HUANG, C.C.; COUCH, G.S.; GREENBLATT, D.M.; MENG, E.C.; FERRIN, T.E. UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis, **J. Comput. Chem.** v. 25, p. 1605-1612. 2004.

QORONFLEH, M. W.; HESTERBERG, L. K. Confronting high-throughput protein refolding using high pressure and solution screens. **Protein expression and purification**. v. 55, p. 209-24, 2007.

RAMOS, O. H. P. Produção de uma pró-metaloproteínase recombinante em bactéria, ativação in vitro e modelagem molecular. **Dissertação de mestrado (Universidade Federal de São Carlos)**, 118 p. 2001.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**. v. 2, p. 152–159, 1997.

ROBERTO, P. G.; KASHIMA, S.; SOARES, A. M.; CHIOATO, L.; FAÇA, V. M.; FULY, A. L.; ASTOLFI-FILHO, S.; PEREIRA, J. O.; FRANÇA, S. C. Cloning and Expression of an Acidic Platelet Aggregation Inhibitor Phospholipase A₂ cDNA from *Bothrops Jararacussu* Venom Gland. **Protein Expression and Purification**. v. 37, p.102-108, 2004a.

RODRIGUES, R. S.; BOLDRINI-FRANCA, J.; FONSECA, F.; DE LA TORRE, P.; HENRIQUESILVA, F.; SANZ, L.; CALVETE, J. C.; RODRIGUES, V. M. Combined snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis*. **Journal of Proteomics**. v. 75, p. 2707-2720, 2012.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; MANCIN, A. C.; FONTES, M. R. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R. Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 121, p. 215–222, 1998.

SALVADOR, G.H.M.; DREYER, T.R.; CAVALCANTE, W.L.G.; MATIOLI, F.F.; DOS SANTOS, J.I.; VELAZQUEZ-CAMPOY, A.; GALLACCI, M.; FONTES, M.R.M. Structural and functional evidence for membrane docking and disruption sites on phospholipase A₂-like proteins revealed by complexation with the inhibitor suramin, **Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.** v. 71, p. 2066–2078. 2015.

SALVADOR, G.H.M.; FERNANDES, C.A.H.; MAGRO, A.J.; MARCHI-SALVADOR, D.P.; CAVALCANTE, W.L.G.; *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(4), e60610. 2013.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2001.

SAMY R. P.; THWIN M. M.; GOPALAKRISHNAKONE P.; IGNACIMUTHU S. Ethnobotanical survey of folk plants for the treatment of snakebites in Southern part of Tamilnadu, India. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 115 (2). p. 302-312. 2008.

SANTOS-FILHO, N. A.; SILVEIRA, L. B.; OLIVEIRA, C. Z.; BERNARDES, C. P.; MENALDO, D. L.; FULY, A. L.; ARANTES, E. C.; SAMPAIO, S. V.; MAMEDE, C. C.; BELETTI, M. E.; OLIVEIRA, F.; SOARES, A. M. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inductor phospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**.v. 52, p. 908-917, 2008.

SAÚDE, F.N. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. Brasília: MS/FUNASA.2001.

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochim. Biophys. Acta**. v. 1761, p. 1246-1259, 2006.

SCOTT, D. L. Phospholipase A₂: structure and catalytic properties. In: Kini, R. M. Venon Phospholipase A₂ Enzymes. **John Wiley & Sons England**, Cap. 4, p. 97-128, 1997.

SEHNAL, D.; SVOBODOVÁ-VAŘEKOVA, R.; BERKA, K.; PRAVDA, L.; NAVRÁTILOVÁ, V.; BANÁŠ, P.; IONESCU, C.-M.; OTYEPKA, M.; KOČA, J. MOLE 2.0: advanced approach for analysis of biomacromolecular channels, **J. Cheminformatics**. v. 5, p 39. 2013.

SEKAR, K., SEKHARUDU, C., TSAI, M.-D. & SUNDARALINGAM, M. 1.72 Å resolution refinement of the trigonal form of bovine pancreatic phospholipase A₂. **Acta Crystallogr. sect. D**. v. 54, p. 342–346. 1998.

SEKAR, K.; SUNDARALINGAM, M. High-resolution refinement of orthorhombic bovine pancreatic phospholipase A₂. **Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.** v. 55, p. 46–50. 1999.

SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S., DE SOUZA, E. L., BELTRAMINI, L. M., OWNBY, C. L.; SOUZA, D. H. Expression, refolding and activity of a recombinant nonhemorrhagic snake venom metalloprotease. **ProteinExpress. Purif.** v. 19 (1), p. 41-47. 2000.

SETO, M.; OGAWA, T.; KODAMA, K.; MURAMOTO, K.; KANAYAMA, Y.; SAKAI, Y.; CHIJIWA, T.; OHNO, M. A novel recombinant system for functional expression of myonecrotic snake phospholipase A₂ in *Escherichia coli* using a new fusion affinity tag. **Protein Expr Purif.** v. 58(2), p. 194-202, 2008.

SHARMA, P. Cinnamic acid derivatives: a new chapter of various pharmacological activities. **J Chem Pharm Res.** v. 3, p. 403–423.2011.

SHIMABUKU, P. S.; FERNANDES, C. A. H.; MAGRO, A. J.; COSTA, T. R.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a Lys49-phospholipase A₂ complexed with caffeic acid, a molecule with inhibitory properties against snake venoms. **Acta Crystallographica. Section F**. v. 67, p. 249-252, 2011.

SILVEIRA, L. B.; MARCHI-SALVADOR, D. P.; SANTOS-FILHO, N. A.; SILVA, F. P. Jr.; MARCUSSI, S.; FULY, A. L.; NOMIZO, A.; DA SILVA, S. L.; STÁBELI, R. G.; ARANTES, E. C.; SOARES, A. M. Isolation and expression of a hypotensive and anti-platelet acidic phospholipase A₂ from *Bothrops moojeni* snake venom. **J Pharm Biomed Anal.** v.73, p. 35– 43. 2013.

SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M.; GIGLIO, J. R. Phospholipases A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms: Structure-function relationship. **Curr. Org. Chem.** v. 8, p. 1677-90, 2004.

SOARES, A. M.; GUERR-SÁ, R.; BORJA-OLIVEIRA, C. R.; RODRIGUES, V. M.; RODRIGUES- SIMIONI, L.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R. M.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 378, p. 201–209, 2000b.

SOARES, A. M.; TICLI, F. K.; MARCUSSI, S.; LOURENCO, M. V.; JANUARIO, A. H.; SAMPAIO, S. V.; *et al.* Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. **Curr Med Chem.** v. 12, p. 2625–2641, 2005.

TICLI, F. K.; HAGE, L. I.; CAMBRAIA, R. S.; PEREIRA, P. S.; MAGRO, A. J.; FONTES M. R. M.; *et al.* Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A₂ inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. **Toxicon.** v. 46, p. 318–327, 2005.

TOYAMA, M.H.; SOARES, A.M.; ANDRIÃO-ESCASO, S.H.; NOVELLO, J.C.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J.R.; FONTES, M.R.M.; MARANGONI, S. Comparative biochemical studies of myotoxic phospholipase A₂ from *Bothrops* venom. **Protein and Peptide Letters, USA.** v. 8, n.3, p. 179-186, 2001.

TSAI, I. H.; WANG, Y. M. Effect of site directed mutagenesis on the activity of recombinant trimucrotoxin, a neurotoxic phospholipase from *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. **Toxicon.** v. 36, p. 1591–1597, 1998.

VERLINDE, C.L.M.J.; HOL, W.G.J. Structure-based drug design: process, seats and challenges. **Structure.** v.2, p.577-587, 1994.

WANG, P.; ZHANG, J.; SUN, Z. Y.; CHEN, Y. H.; LIU, J. N. Glycosylation of prourokinase produced by *Pichia pastoris* impairs enzymatic activity but not secretion. **Protein Express. Purif.** v. 20, p. 179-185. 2000.

WANG, X. Q.; YANG, J.; GUI, L. L.; LIN, Z. J.; CHEN, Y. C.; ZHOU, Y. C. Crystal structure of an acidic phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon halys pallas* at 2.0Å resolution. **Journal of Molecular Biology.** v. 255(5), p. 669-676, 1996.

WARD, R. J., DE OLIVEIRA, A. H.; BORTOLETO, R. K.; ROSA, J. C.; FAÇA, V. M.; GREENE, L. J. Refolding and purification of Bothropstoxin-I, a Lys49-phospholipase A₂ homologue, expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*. **Protein Expr Purif.** v. 21(1), p. 134–140. 2001.

WARRELL, D.A. Snake bite. **Lancet.**v. 375, p. 77–88. 2010.

WATANABE, L.; SOARES, A.M.; WARD, R.J.; FONTES, M.R.M.; ARNI, R.K. Structural insights for fatty acid binding in a Lys49-phospholipase A₂: crystal structure of myotoxin II from *Bothrops moojeni* complexed with stearic acid, **Biochimie.** v. 87, p. 161–167. 2005.

WHITE, C. E.; KEMPI, N. M.; KOMIVES, E. A. Expression of highly disulfide-bonded proteins in *Pichia pastoris*. **Structure.** v. 2, p. 1003-1005. 1994.

WHITE, J. Bites and stings from venomous animals: A global overview. **Ther Drug Monit.** v. 22, p. 65–68. 2000.

XIE, Y.; HUANG, B.; YU, K.; SHI, F.; LIU, T.; *et al.* Caffeic acid derivatives: a new type of influenza neuraminidase inhibitors. **Bioorg Med Chem Lett.** v. 23, p. 3556–3560, 2013.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



ANEXOS



Research paper

Structural studies with BnSP-7 reveal an atypical oligomeric conformation compared to phospholipases A₂-like toxins

Lino Fernando G. de Lima^a, Rafael J. Borges^a, Maria Alejandra Viviescas^{a,b},
Carlos A.H. Fernandes^{a,**}, Marcos R.M. Fontes^{a,*}

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

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 April 2017

Accepted 21 July 2017

Available online 25 July 2017

Keywords:

Myotoxic mechanism

Snake venom

Phospholipases A₂-like toxins

Oligomeric conformation

Cinnamic derivatives

X-ray crystallography

ABSTRACT

There are 2.5 million cases of snakebite per year and approximately 100,000 to 150,000 deaths. Thus, it is considered an important public health problem by the World Health Organization. Snakes from the *Bothrops* genus may cause severe local effects in the victims, so it is important to develop inhibitors to treat local effects in patients. In addition, approximately 30 different species of bothropic snakes have been described that may present differences in their venom composition. Small structural differences in the venom proteins may result in different ligands binding. Herein, BnSP-7, a PLA₂-like protein that causes local myotoxic effects, was analyzed using different biophysical techniques. Crystal structures of BnSP-7 binding to three different cinnamic acid derivatives were solved showing that the ligands bind in the membrane-dockage region (MDoS) of the protein. Spectroscopy fluorescence and microscale thermophoresis (MST) assays showed that these ligands also bind to BnSP-7 in solution and provide comparative information about their affinity to BnSP-7. MST experiments also showed that hydroxyl radicals of the ligands, involved in their binding with the MDoS region of BnSP-7, are essential to increase their affinity with the protein. As this region has been indicated as essential for the myotoxic mechanism, the ligands could potentially be used as inhibitors for BnSP-7. These results provide relevant insights to understand the PLA₂-like proteins myotoxic mechanism and may eventually lead to design of new inhibitors for these toxins. Furthermore, a comparative structural analysis of BnSP-7 with other PLA₂-like proteins showed that BnSP-7 has an atypical quaternary conformation, suggesting an intermediate state that is unlike other PLA₂-like proteins. This information, combined with the absence or partial occupancy of molecules in their hydrophobic channel and the misaligned membrane-disruption region, led us to hypothesize that the protein is not able to fully exert its myotoxic activity like other PLA₂-like proteins.

© 2017 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

1. Introduction

Envenomation by snakebites represents an important public health problem due to its frequency and the associated mortality [1]. The worldwide estimate of snake bites is 2.5 million cases per year, with approximately 100,000 to 150,000 deaths [2,3], especially in rural areas of tropical and subtropical countries in Asia, Africa, Oceania, and Central and South America [4,5]. In Latin

America, snakes from the *Bothrops* genus (Viperidae family) cause approximately 130,000 accidents per year, leading to important local effects that may lead to permanent tissue loss, disability or limb amputation [6,7]. These effects are not efficiently neutralized by conventional serum therapy [4,8]. Similarly, snakes from the *Trimeresurus* genus (Viperidae family), found in Asia, are also responsible for a high number of snakebites, mainly in rural areas of Bangladesh, Bhutan, India, Nepal, Pakistan, and Sri Lanka [4,9]. These bites also produce prominent local effects in the victims, generating high morbidity [9,10].

Metalloproteinases and phospholipases A₂ (PLA₂s) are the toxins responsible by the local myonecrosis in accidents from snakes from Viperidae family. PLA₂s are small (approximate molecular mass of 14 kDa) and stable proteins, which often have seven

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: fernandes@ibb.unesp.br (C.A.H. Fernandes), fontes@ibb.unesp.br (M.R.M. Fontes).

disulfide bridges. These enzymes are able to hydrolyze the *sn*-2 ester bond of phospholipids in the lipid bilayer of micelles, vesicles and membranes, releasing lysophospholipids and fatty acids through a catalytic mechanism that is dependent on calcium ions [11–13]. Snake venoms from *Bothrops* and other genera in Viperidae family contain a subtype of PLA₂s, the PLA₂-like proteins, that have similar tertiary structures to PLA₂s but do not exhibit catalytic activity due to the Y28N and D49K mutations [14,15]. However, they are able to induce high local myotoxicity and show a wide range of biological activities [8].

Several studies have shown that the C-terminal regions of two different PLA₂-like proteins, which include the 115–129 segment, are responsible for the myotoxic activity, due to a variable combination of positively charged and hydrophobic residues [16,17]. More recently, based on structural and functional studies, a myotoxic mechanism has been proposed that involves an allosteric transition and two distinct sites for interaction with the cell membrane, including: i) the MDoS (Membrane-Docking Site) formed by Lys20; Lys115 and Arg118 residues and ii) the MDiS (Membrane-Disruption Site) formed by Leu121 and Phe125 residues [18,19]. These residues are conserved for all bothropic PLA₂-like toxins and, similar putative sites are found in all PLA₂-like toxins [19].

In developing countries, there are folk medicine treatments for snakebite that use several plants species, especially in communities where prompt access to serum therapy is lacking [20]. In recent years, the effects of plant compounds on snakebites have been investigated by various studies through the isolation and characterization of these active constituents and the elucidation of their possible mechanisms of action [21–23]. Cinnamic derivatives, such as caffeic, *p*-coumaric and cinnamic acids, show exceptional biochemical reactivity, such as strong lipoxygenase inhibition, antihepatotoxic activity and are largely found in several species in the Polygonum genus as well as *Prestonia coalita*, *Strychnos nuxvomica*, *Taraxacum officinale* and *Vernonia condensata* [24]. Cinnamic acid derivatives exhibit high antioxidant activity [25,26] due to the presence of an acryl group, and they are highly affected by the radical positions of the phenyl group [27]. Caffeic acid, for example, has a wide variety of potential pharmacological effects, such as antioxidant, anti-cancer and anti-viral activities, and it serves as an antidote to *Bothrops jararaca* and *Bothrops jararacussu* venoms [20,23,28,29]. Furthermore, crystalline caffeic acid derivatives have been used as antidotes for snake venoms by oral or parenteral administration [30]. More recently, structural and functional studies with the PLA₂-like PrTX-I from *Bothrops pirajai* venom complexed to caffeic acid have been performed [23]. These studies revealed that the ligand is able to partially inhibit the myotoxic activity, probably by binding at the MDoS region of the toxin.

BnSP-7, a PLA₂-like protein from *Bothrops pauloensis* venom, has been previously characterized functionally [31,32] and structurally [33,34]. According to these studies, BnSP-7 shows *in vivo* myotoxicity, edema-inducing and bacterial activity in *Escherichia coli* [31], and it shows lower myotoxic activity than other Lys49-PLA₂ proteins [32]. The structural studies revealed the crystal structure of BnSP-7 at 2.3 Å resolution in the apo structure, which the authors hypothesized to be the inactive state of this toxin [34].

To fully understand the myotoxic mechanism of this toxin, we performed a comprehensive study using a combination of biochemical and biophysical assays, including the following: (i) a new two-step purification protocol to produce BnSP-7 with high yield and purity; (ii) spectroscopy studies (circular dichroism and fluorescence spectroscopies); (iii) dynamic light scattering; (iv) crystallographic experiments on BnSP-7 and its complexes with cinnamic acid derivatives (caffeic acid (CaA), cinnamic acid (CiA)

and *p*-coumaric acid (CuA)) and (v) microscale thermophoresis.

2. Material and methods

2.1. Protein purification and inhibitor source

B. pauloensis crude venom was purchased from CETA LTDA Serpenterium (Morungaba – SP, Brazil). BnSP-7 was isolated from the crude venom by ionic exchange followed by a reversed phase (RP) high-performance liquid chromatography (HPLC) (ÅKTA Purifier 10 system, GE Healthcare). Crude venom (50 mg) was dissolved in 50 mM ammonium bicarbonate (pH 8.0) then centrifuged at 10,000 rpm for 10 min at 4 °C. The supernatant was applied to a HiTrap CM Sepharose Fast Flow (CM FF; GE Healthcare) column, previously equilibrated with same buffer. The proteins were eluted with a 50–500 mM linear gradient of ammonium bicarbonate (pH 8.0) at a flow rate of 1.0 mL min^{−1}. Fractions were collected and monitored at 280 nm. The fractions containing BnSP-7 were lyophilized and subsequently, dissolved in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) and applied to a C18 column (SUPELCO, 25 cm × 4.6 mm, 5 µm, Sigma-Aldrich) pre-equilibrated with 0.1% TFA. The proteins were eluted with a 0–70% linear gradient of 0.1% TFA in 66.5% acetonitrile at a flow rate of 1.0 mL min^{−1} and monitored at 280 nm. The obtained fractions were analyzed on SDS-PAGE 15%. BnSP-7 fractions were lyophilized and stored at −20 °C until use. Caffeic acid (CaA), cinnamic acid (CiA) and *p*-coumaric acid (CuA) were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) with purity higher than 98% for CaA and CuA, and 97% for CiA.

2.2. Circular dichroism spectroscopy

The secondary structural integrity of purified BnSP-7 was verified by circular dichroism spectroscopy over the spectral range of 185–260 nm using a JASCO J-815 spectropolarimeter (JASCO Spectroscopic Co., Ltd., Japan) equipped with a Peltier thermocycler. The experiments were performed at 293 K using an optical path length of 0.5 nm, a scanning speed of 100 nm/min, a response time of 1 s, a bandwidth of 2 nm and a data pitch of 0.5 nm. Twenty spectra of BnSP-7 were acquired, averaged and corrected for the buffer solution (baseline). The data were normalized to mean residue ellipticity [θ] (deg.cm².dmol^{−1}.residue^{−1}). The protein was analyzed at 18 µM in deionized water.

2.3. Ultraviolet–visible and fluorescence spectroscopy

Ultraviolet–visible spectroscopy measurements of the cinnamic acid derivatives (caffeic acid (CaA), cinnamic acid (CiA) and *p*-coumaric acid (CuA)) were performed in a UV/visible Ultrospec 2000 spectrophotometer (Pharmacia Biotech) using a 1 mm optical path quartz cuvette at 293 K. The cinnamic acid derivatives were analyzed at 130 µM in 30 mM HEPES (pH 8.0) in 0.5% ethanol and 0.5% pyridine in 200–1000 nm.

Steady-state fluorescent measurements of the emission intensity of CaA and CuA alone and complexed to BnSP-7 were performed in a Hitachi F-7000 spectrofluorimeter using a 10 mm optical path quartz cuvette at 293 K and a bandwidth of 5 nm (for CaA and BnSP-7/CaA measurements) and 10 nm (for CuA and BnSP-7/CuA measurements). Samples were prepared in 30 mM HEPES (pH 8.0) in 0.5% ethanol and 0.5% pyridine at concentrations of 30 µM of protein and 300 µM of both ligands. The fluorescence spectra were measured from 400 to 600 nm (1200 nm.s^{−1}) using as excitation wavelength of 330 nm (for CuA and BnSP-7/CuA measurements) and 345 nm (for CaA and BnSP-7/CaA measurements).

2.4. Dynamic light scattering

The dynamic light scattering (DLS) measurements were conducted with BnSP-7 lyophilized, dissolved in ultra-pure water at a concentration of 3.5 mg.mL⁻¹ at 291 K using the instrument DynaPro TITAN (Wyatt Technology). Data were measured one hundred times and results were analyzed with Dynamics v.6.10 software.

2.5. Microscale thermophoresis (MST)

Microscale thermophoresis (MST) [35] was used to measure the affinity between the purified BnSP-7 and the three ligands (caffeic acid (CaA), cinnamic acid (CiA) and *p*-coumaric acid (CuA)). MST measurements were performed on a Monolith NT.115 instrument (NanoTemper Technologies) located at Institute of Physics of São Carlos - USP. The BnSP-7 was previously prepared in a buffer solution containing 50 mM HEPES, pH 8.0. To perform MST assays, BnSP-7 at 2.3 mg.mL⁻¹ was labeled with 10 mg.mL⁻¹ fluorescein isothiocyanate isomer I (FITC) (Sigma-Aldrich), dissolved in DMSO. This mixture was incubated for 2 h in the dark with constant agitation in the presence of labeling buffer (50 mM HEPES, pH 8.0). The FITC-labeled protein was separated from unbound FITC using a desalting resin. Ligands were solubilized in buffer containing 50 mM HEPES, pH 8.0 and 1% Ethanol. For the assays, 16 different protein:ligand mixtures were prepared, each containing an equal volume of FITC-labeled BnSP-7 (0.425 mM) in addition to increasing concentrations of each ligand, being the stock concentrations of the ligands as follows: CaA - 0.5 mM, CuA - 1 mM and CiA - 2.5 mM. After 10 min of incubation, each mixture was individually transferred to a capillary (NT.115, NanoTemper Technologies) and each thermophoresis was measured at a LED power of 20–40% and an MST power of 40%. The K_d (dissociation constant) was determined by nonlinear fitting of the thermophoresis responses using thermophoresis with T jump as MST Evaluation Strategy at MO. Affinity Analysis v.2.1.2 software.

2.6. Crystallization, X-ray data collection and processing

Crystallization experiments were performed employing BnSP-7 diluted in ultrapure water at a concentration of 10 mg mL⁻¹. Ligands were dissolved in a 50% ethanol and 50% pyridine to give a 10:1 M ratio of inhibitor:protein in the crystallization drops. Native BnSP-7 crystals were obtained setting drops of 1 µL protein solution and 1 µL reservoir solution, which was composed of 30% polyethylene glycol (PEG) 4000, 100 mM Tris-HCl pH 8.5 and 150–200 mM lithium sulfate. Complex crystals were obtained from drops of 1 µL protein solution, 0.2 µL ligand solution and 0.8 µL of same previous reservoir solution. Drops were equilibrated against 500 µL of the reservoir solution. The best crystals were obtained at 291 K after approximately 15 days, mounted in nylon loops and flash-cooled in a stream of nitrogen gas at 100 K using no cryoprotectant. X-ray diffraction data were collected at a wavelength range of 1.459–1.500 Å using a synchrotron-radiation source (MX2 station, Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, LNLS, Campinas, Brazil) and a PILATUS 2M detector (DECTRIS Ltd.). The data were processed using the HKL program package [36].

2.7. Structure determination

The crystal structures were solved by molecular replacement using the Phaser-MR program [37] and the coordinates of the apo-BnSP-7 [34]. The modeling processes were performed by manual rebuilding with the program Coot [38] using electron density maps calculated with the coefficients $2|F_{obs}| - |F_{calc}|$. The models were

improved, by analysis of the free R-factor [39], through cycles of crystallographic refinement (positional and restrained isotropic individual B-factor refinement, with an overall anisotropic temperature factor and bulk solvent correction) using PHENIX refine program [40,41]. In the structure of the native BnSP-7 (just referred as BnSP-7 here), due to a lack of electron density, side chains atom(s) of the following residues were excluded: E86(B) (Glu86 of monomer B), K115(B), K127(A,B) and K129(B). In the structure of the BnSP-7/caffeic acid (BnSP-7/CaA) complex, side chains atom(s) of the following residues were excluded: K57(B), K78(B), E86 (A,B), K116(A), K127(A,B) and K129(A,B). In the structure of the BnSP-7/cinnamic acid complex (BnSP-7/CiA), side chains atom(s) of the following residues were excluded: K57(A,B), R72(B), K78(A), N87(A,B), K93(B), K115(B), K127(A,B) and K129(A,B). In the structure of the BnSP-7/*p*-coumaric acid complex (BnSP-7/CuA), side chains atom(s) of the following residues were excluded: E86(A,B), K127(A) and K129(B). The crystal structures were deposited in the Protein Data Bank (PDB) under the identification codes 5VFH (BnSP-7), 5VFJ (BnSP-7/CaA), 5VFN (BnSP-7/CiA) and 5VFM (BnSP-7/CuA).

2.8. Comparison and characterization of the hydrophobic channel and tunnels by bioinformatics analyses

For the hydrophobic channel characterization, it was used the following structures, with the Protein DataBank identification code in parentheses (PDB id): BthTX-I/PEG4k (3IQ3), dimeric BthTX-I/BPB (*p*-bromophenacyl bromide) (3HZW) [15], BthTX-I/ α -tocopherol (3CXI), PrTX-I/ α -tocopherol (3CYL) [42], PrTX-I/rosmarinic acid + PEG330 (3QNL) [22], PrTX-I/caffeic acid + PEG4k (4YU7), PrTX-I/aristolochic acid + PEG4k (4YZ7) [23], MjTX-II/stearic acid (1XXS) [43], MjTX-II/PEG4k (4KF3) [44] and MjTX-II/suramin + PEG4k (4YV5) [45]. To ensure correct physico-chemical characterization, the impartial residues of each model were modeled automatically by COOT mutate, autofit and 3.0 Å sphere refinement functions using deposited diffraction data [37].

MOLE program [46] was used to locate and characterize the chemical properties of the hydrophobic channel. It analyzed the hydrophobic channel accessibility through tunnel computations, which is the pathway within the hydrophobic channel, using each His48 residue as the starting point. This amino acid is the deepest residue that interacts with different ligands found in the hydrophobic channel, such as zinc ions, *p*-bromophenacyl bromide (BPB), fatty acids and polyethylene glycol (PEG) molecules [47].

3. Results

3.1. Isolation of the BnSP-7

B. pauloensis crude venom was applied in CM-FF ion exchange column, with a 50–500 mM linear gradient of ammonium bicarbonate (pH 8.0). It was obtained three fractions, named CM1, CM2 and CM3 (Fig. 1A). The latter contained phospholipases A₂ with molecular mass ~14 kDa, as observed by SDS-Page (Fig. 1C). It was submitted to a RP-HPLC using a C-18 column (SUPELCO, Sigma-Aldrich) with a 0–70% gradient of 0.1% TFA in 66.5% acetonitrile (Fig. 1B). The RP-HPLC resulted in five peaks, which BnSP-7 corresponds to the first peak, as observed in 15% SDS-PAGE (Fig. 1C).

3.2. In-solution structural assays

The structural integrity of purified BnSP-7 was examined by circular dichroism spectroscopy because the CD spectra present minimum [θ] values at 208 and 222 nm and a maximum [θ] value at 191 nm. These are typical characteristics of α -helical rich proteins,

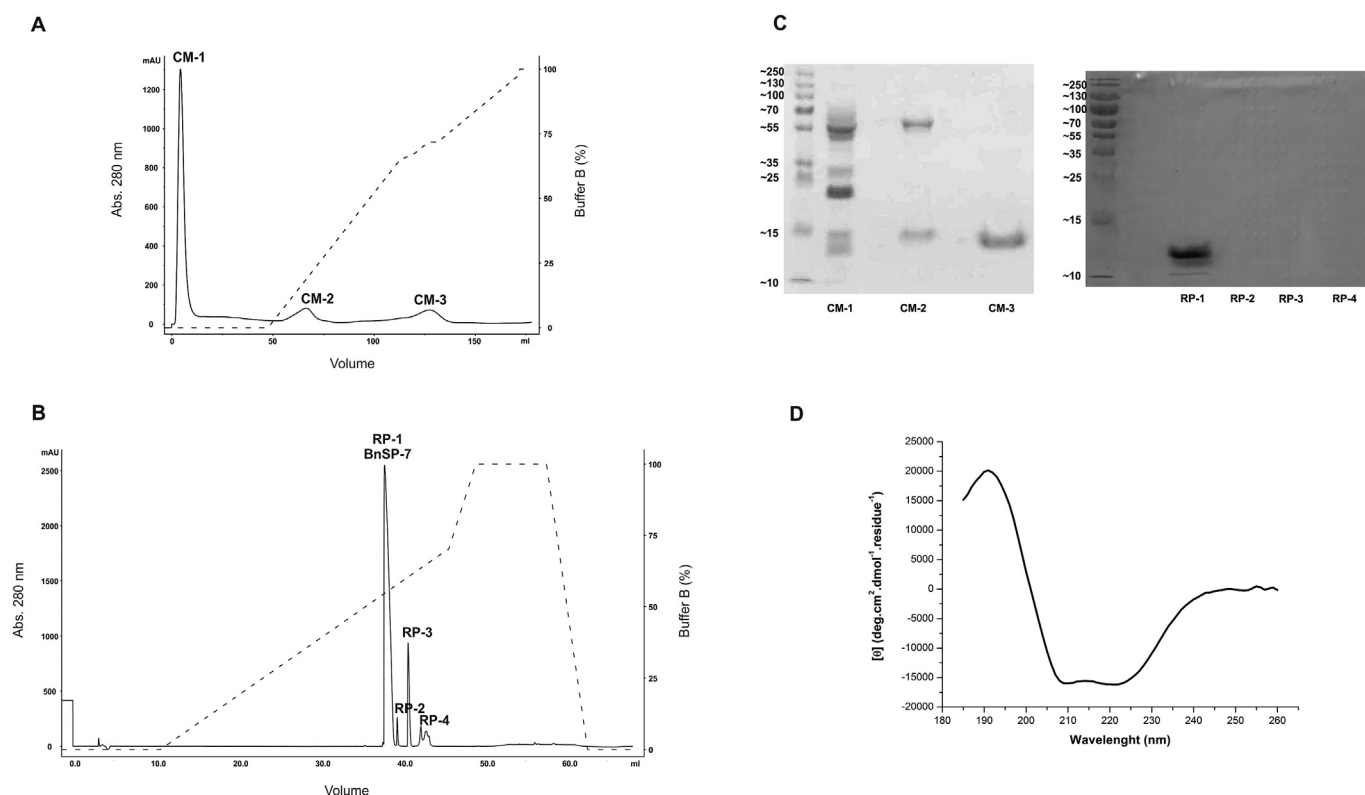


Fig. 1. BnSP-7 isolation from *B. pauloensis* crude venom by two-step chromatography protocol. (A) *B. pauloensis* crude venom fractionation by ion exchange (Hi Trap CM Sepharose Fast Flow) resulting in three fractions, CM1, CM2 and CM3. (B) CM3 fractionation by a C18 reversed phase column (SUPELCO) resulting in four fractions, where BnSP-7 is obtained in RP-1 fraction. (C) 15% SDS-PAGE of ion exchange and reversed phase chromatography steps, attesting the presence of BnSP-7 in CM3 fraction and its isolation in RP-1 fraction. (D) Circular dichroism spectra of purified BnSP-7.

as expected for a typical phospholipases A₂ (Fig. 1D). Dynamic light scattering experiments at 291 K (the same temperature of the crystallization assays) with BnSP-7 indicated a mean hydrodynamic radius (R_H) of 2.2 nm with a polydispersity of 10.7% (Suppl. Fig. 1), equivalent to a dimer. These results are in agreement with results for other dimeric bothropic PLA₂-like proteins [15,44].

Cinnamic acid derivatives (CaA, CiA and CuA) show absorbance at wavelength in the range of 225–300 nm, which are the same absorbance wavelengths shown by typical proteins. However, CaA and CuA also have absorbance wavelengths over 300 nm (up to 400 nm for caffeic acid and 370 nm for *p*-coumaric acid). Thus, differences in the fluorescence emission spectra of CaA and CuA in the presence of BnSP-7 that extend the excitation wavelength over 310 nm can indicate that the ligands are bound to the toxin in solution.

CaA and CuA exhibit their maximum fluorescence emission at 466 nm and 438 nm, respectively (Fig. 2), indicating that CuA is more apolar than CaA. Because the only difference between these molecules is an extra hydroxyl radical in the phenyl group of CaA, this hydroxyl radical is responsible for the difference in the polarity between CaA and CuA observed by fluorescence spectroscopy. The complexation of CaA and CuA with BnSP-7 decreases the ligand's fluorescence emission (Fig. 2). This could be because the ligands are in a more polar environment in the presence of the protein. This can be attributed to the electrostatic interactions formed between the ligands, the polar residues of BnSP-7, and the water molecules in the neighborhood (see section 3.3).

Microscale thermophoresis (MST) assays yield the following dissociation constants (K_d) of each ligand for BnSP-7: $20 \pm 10 \mu\text{M}$ (CaA), $150 \pm 20 \mu\text{M}$ (CuA) and $300 \pm 50 \mu\text{M}$ (CiA). Typical MST curves for each ligand are shown in Suppl. Fig. 2, but only

approximate values could be obtained for CuA and CiA, because the K_d values for both ligands are quite low to obtain accurate values with this technique. The reason for the differences between K_d values for CaA and the other two ligands (CuA and CiA) is probably due to the additional electrostatic interactions formed between CaA and BnSP-7 (refer to section 3.3).

3.3. Structures of the BnSP-7, BnSP-7/CaA, BnSP-7/CiA and BnSP-7/CuA complexes

Crystals of the BnSP-7, BnSP-7/CaA, BnSP-7/CiA and BnSP-7/CuA were obtained under similar conditions (Fig. 3) and diffracted at high resolution (BnSP-7, 1.59 Å) and medium resolution for complexes (~2.0 resolution). All crystals were isomorphous, displaying symmetry of the $P2_1$ space group (Table 1). The structures were determined by the molecular replacement method, using monomer A of the apo-BnSP-7 structure as a model (PDB ID 1PA0) [34]. As observed for the majority of dimeric Lys49-PLA₂ proteins, two possible dimeric conformation could be observed in the unit-cells of the structures obtained. The structures were refined using the “compact dimer” (previously referred to as the “alternative dimer” [19]) because the other dimer possibility (named “large dimer” or “conventional dimer”) presented unfavorable free energy and/or displayed a small interface area when examined in the PISA software package (www.ebi.ac.uk/pdbe/pisa [48]) (Suppl. Table 1). Similar results were obtained for other bothropic Lys49-PLA₂ proteins present in the PDB. Therefore, the compact dimer is the most likely structure to occur in solution [42]. Furthermore, other experimental evidence, such as small-angle X-ray scattering analysis, corroborated the results [49].

The final models (Fig. 4) showed a stereochemical quality

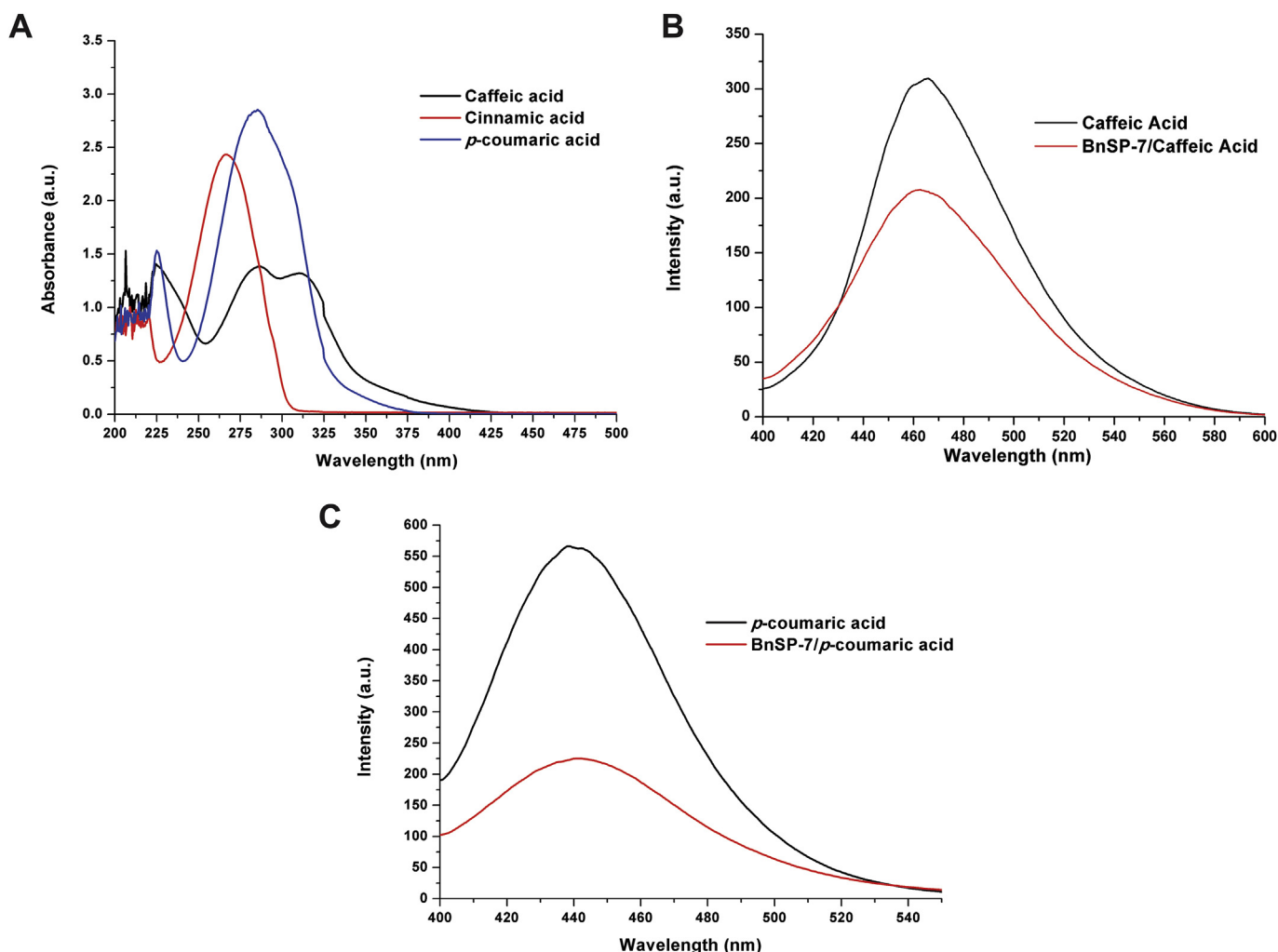


Fig. 2. Ultraviolet–visible and fluorescence spectroscopies of cinnamic acid derivatives and BnSP-7. (A) Ultraviolet–visible spectroscopy of caffeic acid (black line); cinnamic acid (red line) and *p*-coumaric acid (blue line); (B) Steady-state fluorescence of caffeic acid alone (black line) and complexed to BnSP-7 (red line) with an excitation wavelength at 345 nm; (C) Steady-state fluorescence of *p*-coumaric acid alone (black line) and complexed to BnSP-7 (red line) with an excitation wavelength at 330 nm.

compatible with structures with similar resolution (Table 1). There were typical tertiary structures similar to other PLA₂-like toxins [19], including seven disulfide bonds and the following structural features: (i) an N-terminal α -helix; (ii) a “short” helix; (iii) a Ca²⁺ binding loop; (iv) two anti-parallel α -helices (2 and 3); (v) two short strands of an anti-parallel β -sheet (β -wing); and (vi) a distorted C-terminal loop. The monomers of the elucidated models are similar, as shown by the RMSDs below 0.5 Å using the C α atoms of each monomer (Suppl. Fig. 3). Slight differences were observed in the structures, particularly in the loops before and after the β -wing region (residues 57–60 and 86–90). These structural deviations were also found in other bothropic Lys49-PLA₂ structures [15] and are related to higher B-factors than the rest of the models. Superposition between C α atoms of dimers of BnSP-7, BnSP-7/CaA, BnSP-7/CiA and BnSP-7/CuA also revealed very similar oligomeric structures with RMSD values lower than 0.5 Å (Suppl. Fig. 4).

Electronic density maps of the BnSP-7 structures revealed the presence of several sulfate ions (4–7 ions) in all structures. They interact with the MDoS region, but they also interact with other basic residues on the surface of the structures (Figs. 5 and 6). In the complexes, the ligands were found to interact via electrostatic, van der Waals, hydrogen bond and hydrophobic contacts with the MDoS cluster from both monomers, particularly the following

residues: Lys16 (A and B), Lys20 (A and B), Lys115 (A), and Arg118 (A). They also interact with sulfate ions that are present near the cluster (Fig. 5). The three ligands lie in a similar region; the phenolic/phenol/phenyl groups from caffeic/*p*-coumaric/cinnamic acids establish contacts with Lys16 and Lys115 in monomer A (Fig. 5) by way of salt bridges (caffeic acid - two, *p*-coumaric - one) or van der Waals interactions. In addition, the aromatic groups from the ligands interact with sulfate ions. The acrylic groups form hydrogen bonds to Lys20 of monomer B (cinnamic acid shows a long-range interaction, 3.6 Å) and exhibit van der Waals interactions with Lys20 of monomer A.

Sulfate ions are also found to interact with Arg34 in both monomers of all structures. These sulfate ions are found in other PLA₂-like structures and can be attributed to non-specific interactions [18,23,42]. Moreover, parts of the PEG 4000 molecules are found in the entrance of the hydrophobic channel (in contact with Lys7) in monomers A and B from BnSP-7/CiA (8 carbon atoms modeled in monomers A and B in the electron density maps) and BnSP-7/CuA structures (10 and 8 carbon atoms modeled in monomers A and B, respectively).

Hydrophobic channel accessibility was analyzed in the BnSP-7 structures using the MOLE2 algorithm. Hydrophobic channel physicochemical properties were also analyzed, such as their amino

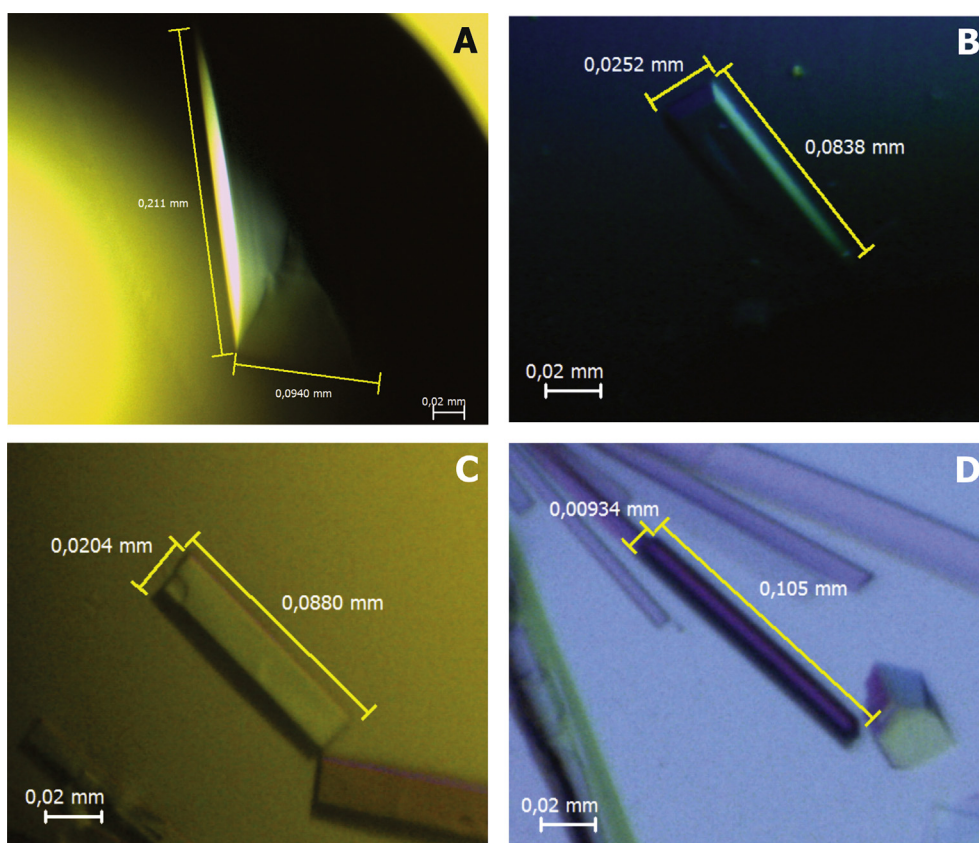


Fig. 3. Crystals of native BnSP-7 isolated from *Bothrops pauloensis* venom native and complexed with ligands. (A) BnSP-7, (B) BnSP-7 co-crystallized with caffeic acid (BnSP-7/CaA), (C) BnSP-7 co-crystallized with cinnamic acid (BnSP-7/CiA) and (D) BnSP-7 co-crystallized with *p*-coumaric acid (BnSP-7/CuA).

acid composition, net charge, hydropathy and polarity. The dimeric BnSP-7 structures have an average cavity volume of 3420 Å³, including the interior and interface regions of both monomers. The

outer faces of the cavities (amino acids with side chains facing the outer portion of the hydrophobic channel) are composed mainly of positive and hydrophobic residues, with a total charge of 9 and

Table 1

X-ray diffraction data collection and refinement statistics.

	BnSP-7	BnSP-7/CaA	BnSP-7/CiA	BnSP-7/CuA
Resolution (Å)	23.6–1.59 (1.65–1.59) ^a	26.3–2.08 (2.16–2.08) ^a	45.5–2.39 (2.47–2.39) ^a	45.5–2.06 (2.13–2.06) ^a
Space group	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁
Unit cell a,b,c (Å), β(°)	45.4, 59.6, 58.6, 95.7	45.6, 59.1, 58.5, 95.8	45.8, 58.7, 58.1, 95.9	45.8, 58.0, 58.0, 96.0
Unique reflections	40,956 (3811) ^a	18,143 (1633) ^a	12,111 (1084) ^a	18,099 (1467) ^a
Completeness (%)	98.1 (92.2) ^a	97.6 (88.8) ^a	98.5 (88.0) ^a	95.9 (80.0) ^a
Mean I/sigma(I)	7.9 (3.9) ^a	4.4 (1.9) ^a	8.5 (1.9) ^a	9.95 (2.3) ^a
CC1/2 (%)	86.3	79.9	79.4	86.8
R _{merge} (%) ^b	9.4 (32.8) ^a	14.3 (45.8) ^a	17.5 (60.3) ^a	15.5 (55.0) ^a
R _{work} (%) ^c	16.3 (17.9) ^a	20.6 (26.5) ^a	21.7 (32.1) ^a	17.1 (23.9) ^a
R _{free} (%) ^d	19.1 (20.9) ^a	24.0 (33.9) ^a	26.0 (39.9) ^a	21.4 (28.3) ^a
Non-hydrogen atoms number ^e	2341	2135	2012	2203
Protein	1882	1870	1858	1890
Ligands	30	38	57	75
Waters	429	227	97	238
RMS (Bonds) ^e	0.022	0.005	0.065	0.007
RMS (angles) ^e	1.81	0.96	2.49	1.09
Ramachandran favored/outliers (%) ^e	95/0	94/0	94/1.4	92/0.9
Clashscore	3.2	5.1	14.1	3.9
Average B-factor ^e	25.4	36.1	37.8	33.6
Protein	22.9	35.0	37.0	31.6
Ligands	40.2	67.9	66.6	74.5
Solvent	35.5	39.9	35.1	37.1

^a Numbers in parentheses represent the values of the higher resolution shell. CC1/2 values are referent at the higher resolution shell.

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

^c $R_{\text{work}} = \sum_{hkl} (|F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}|) / \sum_{hkl} F_{\text{obs}}$, where $|F_{\text{obs}}|$ and $|F_{\text{calc}}|$ are the amplitudes of the observed and calculated structure factors.

^d R_{free} is equivalent to R_{work} , but calculated on 5% of the reflections omitted from the refinement process.

^e Calculated by PHENIX [52].

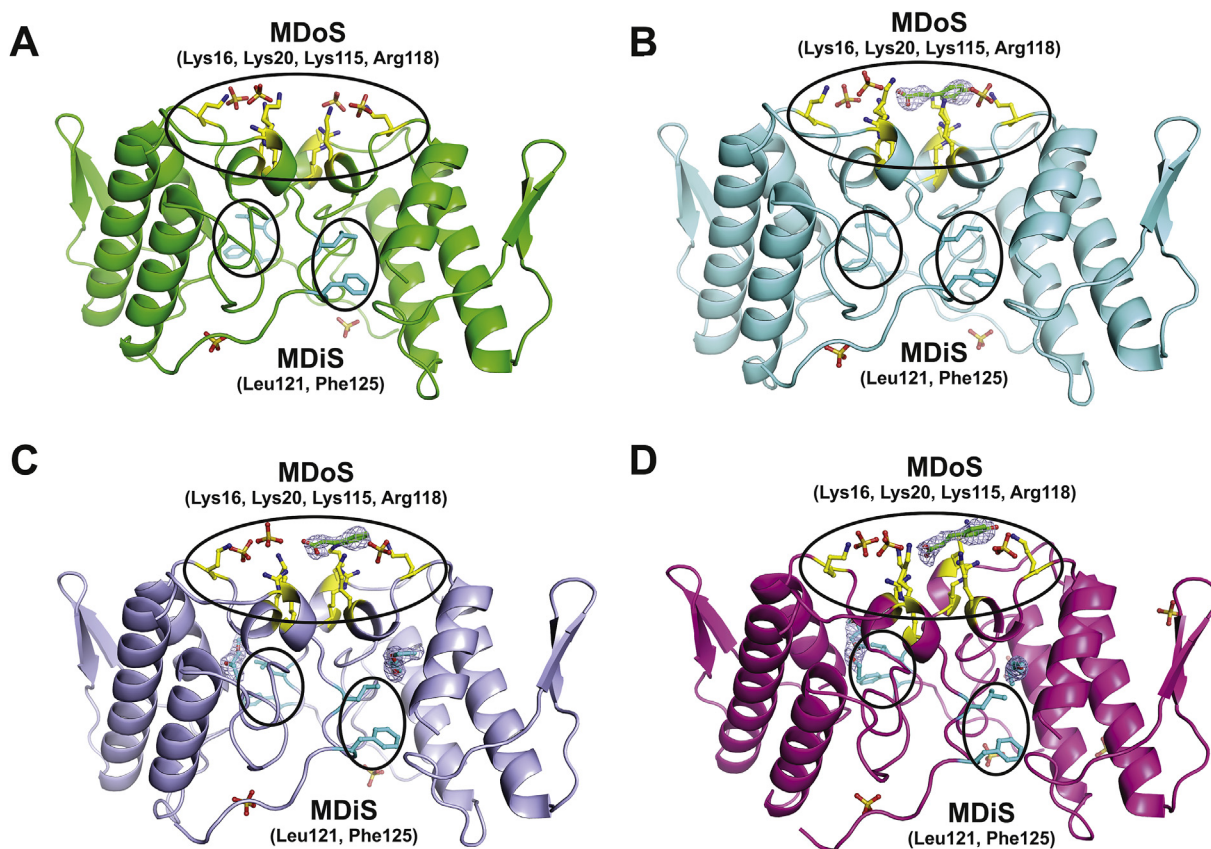


Fig. 4. Cartoon representation of dimeric structures of (A) BnSP-7; (B) BnSP-7/CaA; (C) BnSP-7/CiA and (D) BnSP-7/CuA. The ligands (CaA, CiA and CuA), PEG molecules and sulfate ions are represented in sticks (green, cyan and yellow, respectively). Electronic density $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$ maps countered at 1.0σ of ligands and PEG molecules are showed (gray meshes).

values of hydropathy and polarity of -0.76 and 11.2 , respectively (Suppl. Table 2). The hydrophobic channel (referred to as a tunnel by the MOLE2 algorithm) of each monomer is within this cavity and

has approximately $310 \text{ \AA}^3$ average volume; it is mainly composed of hydrophobic residues (the average hydropathy for both monomers is 0.57) (Suppl. Table 3).

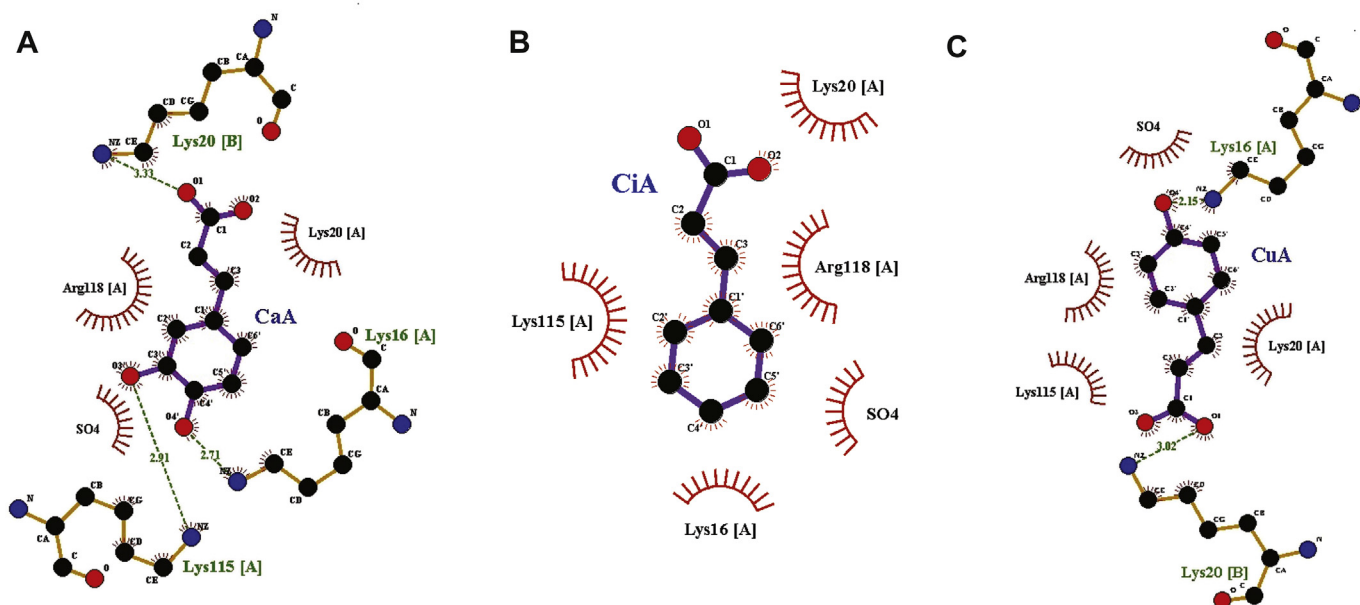


Fig. 5. Interaction of (A) caffeic acid (CaA), (B) cinnamic acid (CiA) and (C) *p*-coumaric acid (CuA) in the BnSP-7 structures. Polar contacts are depicted with broken lines, and hydrophobic contacts are indicated by arcs with radiation spokes. Drawn using Ligplot program [53].

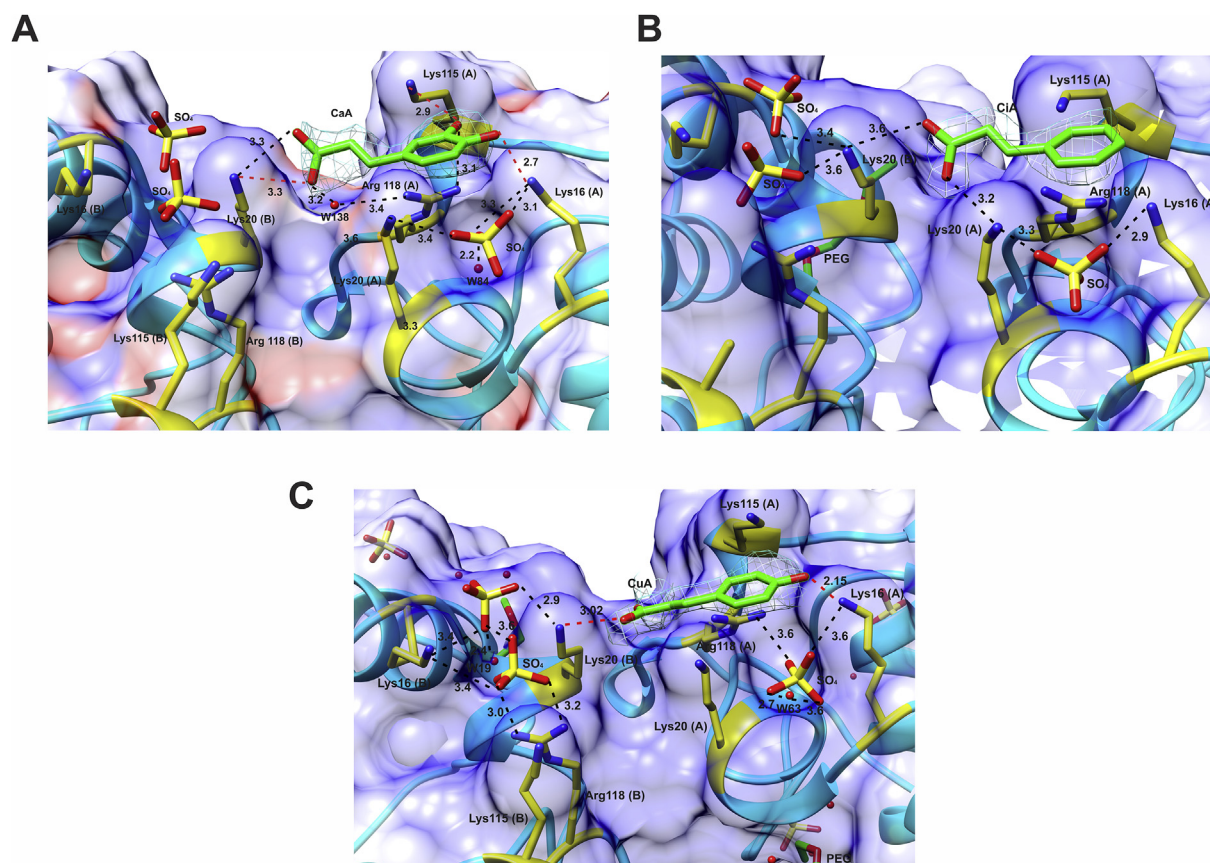


Fig. 6. Electrostatic potential surface of (A) BnSP-7/CaA, (B) BnSP-7/CiA and (C) BnSP-7/CuA crystal structures. The distances (Å) between protein and ligands are shown as black dashes for bump distances and red dashes for hydrogen bonds. Residues of monomers A and B in contact with ligands (green sticks) are represented by yellow sticks. Sulfate ions are represented in yellow sticks and water molecules are represented as red spheres. Electronic density $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$ maps countered at 1.0σ of ligands were showed as gray meshes. The electrostatic potential surfaces were generated by APBS (Adaptive Poisson–Boltzmann Solver) electrostatics calculations at 150 mM NaCl [54], which are available in Chimera v.1.9 [55], after the transformation from a PDB to a PQR file using the online server PDB2PQR at pH 7.0 [56].

4. Discussion

4.1. Binding of cinnamic acid derivatives to BnSP-7 membrane docking site (MDoS)

In this study, even when different cinnamic acid derivatives were used, similar binding sites were found in the BnSP-7 crystal structures (Fig. 7). The hydroxyl radicals from the acryl and phenyl groups of the caffeic and *p*-coumaric acids make three and two electrostatic interactions, respectively, but in the case of cinnamic acid, this ligand just interacts by way of hydrophobic interactions. Cinnamic acid shows slight translocation in the phenyl group direction (Fig. 7), probably to acquire a large number of hydrophobic interactions, even losing an electrostatic interaction between the acryl group and Lys20 (Fig. 5). The affinity assays (MST) demonstrated that caffeic acid presented the highest affinity, followed by *p*-coumaric and cinnamic acids. The electrostatic interactions of the caffeic and *p*-coumaric acids with the toxins seem to be the main reason for increasing the affinity of these ligands compared to the cinnamic acid. In-solution assays (MST and fluorescence) demonstrated that independent of physicochemical conditions used in crystallization experiments (e.g. presence of sulfate ions) the ligands are able to bind to the toxins and conserve the binding characteristic observed in the crystal structures.

As described in Section 3.3, all ligands were found bound to the MDoS region, interacting simultaneously with residues from both monomers. Fluorescence spectroscopy assays show that caffeic acid

and *p*-coumaric acid bind to BnSP-7. The fluorescence emission from the ligands is decreased in the presence of the protein due to the electrostatic interactions formed between CaA and CuA and the Lys and Arg residues of BnSP-7 (Figs. 2, 5 and 6).

The current myotoxic mechanism for PLA₂-like toxins [18,19,47] is based on the docking of the toxin's MDoS region (two strictly

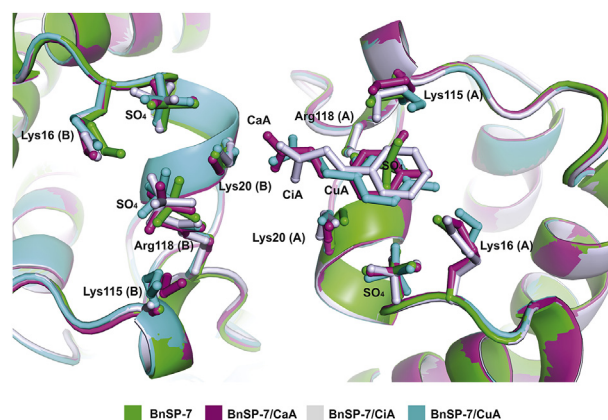


Fig. 7. Superposition of BnSP-7, BnSP-7/CaA, BnSP-7/CiA and BnSP-7/CuA structures in the region of membrane docking site (MDoS). Caffeic acid (CaA) (magenta), cinnamic acid (CiA) (gray) and *p*-coumaric acid (CuA) (cyan) ligands, sulfate ions and main residues whose ligands interact are drawn in a ball and stick representation.

conserved basic clusters - one from each monomer) to the membrane and, subsequently, the disruption of the membrane by hydrophobic residues (MDiS). Based on functional and structural studies, it has been proposed that there are three possible mechanisms of inhibition for PLA₂-like toxins [23,45,47]: (i) physical blocking of the hydrophobic channel, (ii) obstruction of MDoS and/or MDiS region, and (iii) induction of protein oligomerization. Thus, taking into account that the three ligands bind simultaneously to the MDoS regions of both monomers, we can hypothesize that BnSP-7 may be inhibited by these ligands by preventing protein docking. Indeed, the crystal structure of the PLA₂-like PrTX-I complexed to caffeic acid [23] showed that there were three ligands bound to the MDoS region of toxin. Although the ligands were not bound in exactly the same way as BnSP-7 complexes, in both toxins, the caffeic acid molecules interact with the Lys15, Lys20 and Lys115 residues. The authors of this study [23] also demonstrated that this ligand partially neutralized the myotoxic activity of PrTX-I, probably due to MDoS blockage. These data are also consistent with the literature because cinnamic acid derivatives exhibit high antioxidant activity due to the presence of an acryl group [26], and their potency is affected by the position of the hydroxy radical of the phenyl group [27].

4.2. Complexed BnSP-7 structures present an atypical oligomeric conformation and hydrophobic channel characteristics

The structures elucidated herein have identical oligomeric conformations, as shown by the fact that they have C α RMSD values in the range of 0.2–0.5 Å. Although one of the models is in the native state (referred to simply as BnSP-7), it is different from the apo-BnSP-7 structure previously solved by Magro and colleagues [34]. Whereas the latter is not bound to any ligand or ion, the former is bound to sulfate ions. The apo-BnSP-7 structure presents a different oligomeric conformation than BnSP-7 or complexed BnSP-7, as shown by the C α RMSD value: ~15 Å (Suppl. Fig. 4). To investigate the oligomeric conformation of PLA₂-like toxins, dos Santos et al., 2009 [42] developed a two-angle model that classified these proteins into two classes: active and inactive states. More recently, this method was further developed into a more informative strategy with three angles: roll, twist, and tilt [50]. Table 2 shows the angle calculations for the apo and complexed BnSP-7 structures and the average angles for PLA₂-like proteins in active and inactive conformations. Thus, the complexed BnSP-7 presents an atypical angle combination that is unlike the previously classified active and inactive states. It is interesting that the conformation is almost identical to the PrTX-II/fatty acid structure (PDB ID 1QLL [51]), which was another exception to the oligomeric

conformation among PLA₂-like toxins [42,50].

Taking into account the atypical quaternary conformation of the BnSP-7 and the fact that the dimeric orientation is related to the accessibility of the hydrophobic channel through the protein's C-terminal region [47], tunnel calculations were performed with a BnSP-7 protein and other Lys49-PLA₂ proteins (section 3.3). The comparison between the total cavity revealed that the BnSP-7 structures have a volume 35–45% smaller than MjTX-II, BthTX-I and PrTX-I (Table 2). The decrease in the volume of the tunnel for BnSP-7 is even more noticeable when analyzing only the hydrophobic channels because they display a volume 40–60% smaller than other Lys49-PLA₂ toxins (Suppl. Table 2).

In addition, the chemical properties of the BnSP-7 cavity are different from other Lys49-PLA₂s proteins. While their interior is almost identical, the external part of the BnSP-7 cavity has a lower number of positive residues, higher hydropathy and lower polarity (Suppl. Table 3). These properties may be related to a lower affinity to hydrophobic molecules, such as PEG and fatty acids. These data highlight the unusual quaternary conformation of BnSP-7 structures, which partially expose the hydrophobic channel of the protein, because the sequences of Lys49-PLA₂s proteins are highly conserved.

4.3. Are structural differences between BnSP-7 and other Lys49-PLA₂s related to myotoxic activities?

The initial step for the myotoxic mechanism of Lys49-PLA₂s proteins [18,19,47] is the dimeric reorientation caused by the entrance of a fatty acid into the hydrophobic channel. In several structures, the PEG 4K molecule plays the role of the fatty acid. Interestingly, structural analyses of BnSP-7 revealed other unusual characteristic for Lys49-PLA₂s structures: PEG molecules are not found inside the hydrophobic channel (binding to the His48 residue) despite their high concentration in the crystallization assays. There are few cases the literature, but in all of them, the toxins are in the inactive conformation, and usually their crystals belong to the P₃121 space group. The hydrophobic channels of BnSP-7 have smaller volumes compared to other Lys49-PLA₂ proteins, and there are differences in the disposition of basic and hydrophobic residues in the entrance of their cavities (section 4.2). Thus, we suggest that both reasons are related to the absence (or partial occupancy) of PEG molecules (or other hydrophobic molecules, such as fatty acids) in the hydrophobic channels of the BnSP-7 structures.

Complexed BnSP-7 structures present an atypical conformation (section 4.2), with intermediate angles between the active and inactive structures, unlike other Lys49-PLA₂ proteins. These structures include molecules bound to the MDoS region, but their hydrophobic channels are empty or partially occupied (PEG molecules are found in the entrance of hydrophobic channel in BnSP-7/CiA and BnSP-7/CuA structures). Other Lys49-PLA₂ proteins, such as apo-BnSP-7 (no ligand bound in any region) [34] and PrTX-I complexed with caffeic acid (caffeic acid bound to the MDoS and PEG molecules bound to hydrophobic channel), are in the inactive and active states, respectively. Thus, we can hypothesize that complexed BnSP-7 proteins are in an intermediary oligomeric state compared to other PLA₂ proteins. Two additional consequences can be observed for this unusual conformation in the BnSP-7 structures. The first is related to the typical interchain interaction between the Y119 residues of Lys49-PLA₂s in the active state that occur after their dimer reorientation. For BnSP-7, this is a long-range interaction with distance greater than 3.3 Å. The second is result from the positions of residues that are part of the MDiS regions. A comparison of a typical Lys49-PLA₂ in its active state (PrTX-I/caffeic acid) and BnSP-7/CaA reveals that the MDiS region is displaced by more than 12 Å (Fig. 8), which is probably due to the intermediate

Table 2
Quaternary conformation angles for Lys49-PLA₂s crystal structures.

State	Angles (°)		
	Roll	Twist	Tilt
apo BnSP-7*	141.0	26.0	54.0
BnSP-7/sulfate ions	164.4	18.3	80.4
BnSP-7/CaA	164.0	18.8	80.5
BnSP-7/CiA	163.8	19.1	79.9
BnSP-7/CuA	163.6	19.4	80.0
1QLL	163.1	19.9	80.5
INACTIVE	141.0 (0.6)	27.0 (0.4)	54.0 (1.0)
ACTIVE	175.0 (4.4)	26.0 (2.0)	33.0 (8.6)

Numbers in parenthesis refer to the standard deviation. Inactive state represents the structures whose PDB IDs are: 2Q2J, 3HZD, 3I3H, 4K09, 4WTB*, 2H8I. The active state represents the structures whose PDB IDs are: 4KF3, 4YV5*, 1XXS*, 1Y4L*, 3QNL, 4YZ7, 3CYL, 3CXI, 4YU7, 2OK9, 4K06, 3IQ3, 3MLM. * Chain letter A and B were inverted.

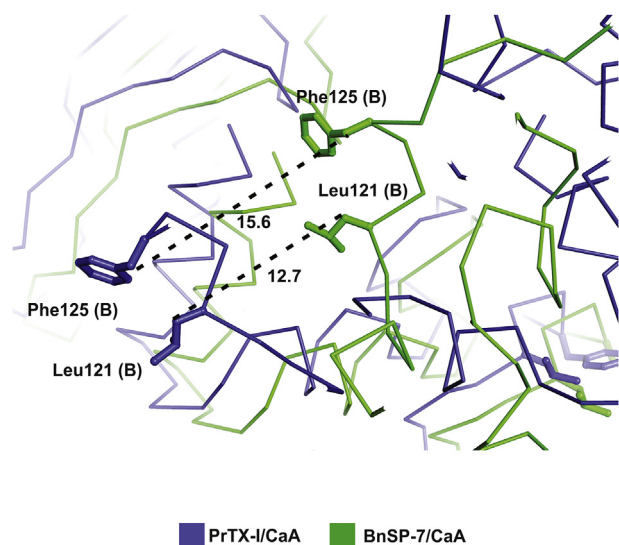


Fig. 8. Superposition of dimeric structures of PrTX-I (violet) and BnSP-7 (green) complexed to caffeic acid detailing the residues (Leu121 and Phe125) of membrane disruption sites from both structures. C_{α} atoms of monomer A from both structures were superposed in order to verify the deviation of residues of monomers B. The distances of the C_{β} atoms from Leu121 and Phe125 residues of both structures are drawn as black dashes.

oligomeric conformation of complexed BnSP-7.

Taking into account all the structural data obtained here, we can infer that BnSP-7 is not able to fully exert its myotoxic activity compared to other Lys49-PLA₂ proteins that have been previously characterized. Indeed, previous studies with BnSP-7 have demonstrated that this protein has lower myotoxic activity than other Lys49-PLA₂ [31,32]. The main reason for its lower toxic activity may be the partial action of hydrophobic residues in the MDiS on the target membrane because it is structurally impossible for MDiS regions from both monomers to interact simultaneously.

5. Conclusion

In this work, we showed that cinnamic acid derivatives bind to the MDiS region of BnSP-7. Taking into account that this region is thought to be responsible for membrane-protein dockage, the three tested ligands can be potentially used as inhibitors for BnSP-7, but as caffeic acid presented the highest affinity, this ligand seems to be the best inhibitor candidate. BnSP-7 structures present an atypical quaternary conformation, suggesting an intermediate state compared to other PLA₂-like proteins. This information, combined with the absence or partial occupancy of molecules in the hydrophobic channel and the misaligned MDiS from both monomers, led us to hypothesize that the protein is not able to fully exert its myotoxic activity, unlike other Lys49-PLA₂ proteins.

Funding

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Acknowledgments

The authors acknowledge the use of the Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Brazil), Dr. Roberto M. Fernandez for fluorescence spectroscopy data analyses support and, Prof. Rafael

Guido and Dr. Andressa P. A. Pinto by the use and support with the Microscale Thermophoresis equipment (FAPESP - 2016/13884-2).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2017.07.009>.

References

- [1] A. Kasturiratne, A.R. Wickremasinghe, N. De Silva, N.K. Gunawardena, A. Pathmeswaran, R. Premaratna, L. Savioli, D.G. Lalloo, H.J. De Silva, The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths, *PLoS Med.* 5 (2008) 1591–1604, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.0050218>.
- [2] J. White, Bites and stings from venomous animals: a global overview, *Ther. Drug Monit.* 22 (2000) 65–68, <http://dx.doi.org/10.1097/00007691-200002000-00014>.
- [3] J.J. Calvete, P. Juárez, L. Sanz, Snake venomics. Strategy and applications, *J. Mass. Spectrom.* 42 (2007) 1405–1414, <http://dx.doi.org/10.1002/jms.124>.
- [4] J.M. Gutiérrez, R.D.G. Theakston, D.A. Warrell, Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership, *PLoS Med.* 3 (2006) 0727–0731, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.0030150>.
- [5] R.A. Harrison, A. Hargreaves, S.C. Wagstaff, B. Faragher, D.G. Lalloo, Snake envenoming: a disease of poverty, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3 (2009), <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000569>.
- [6] R.F. Araújo, F.A.A. Santalúcia, M. Cabra, Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos, in: M.C. Cardoso, J.L.C. F.O.S. França, F.H. Wen (Eds.), *Animais Peçonhentos No Brasil*, Sarvier, São Paulo, 2003, pp. 6–12.
- [7] F.N. Saúde, *Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos*, MS/FUNASA, Brasília, 2001.
- [8] J. Gutiérrez, B. Lomonte, Phospholipase A₂ myotoxins from Bothrops snake venoms, *Toxicon* 33 (1995) 1405–1424, [http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101\(95\)00085-Z](http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101(95)00085-Z).
- [9] E. Aliról, S.K. Sharma, H.S. Bawaskar, U. Kuch, F. Chappuis, Snake bite in south asia: a review, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4 (2010), <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000603>.
- [10] C.D. Raghavendra Gowda, R. Rajesh, A. Nataraju, B.L. Dhananjaya, A.R. Raghupathi, T.V. Gowda, B.K. Sharath, B.S. Vishwanath, Strong myotoxic activity of Trimeresurus malabaricus venom: role of metalloproteases, *Mol. Cell. Biochem.* 282 (2006) 147–155, <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-006-1738-3>.
- [11] R.M. Kini, Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes, *Toxicon* 42 (2003) 827–840, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.11.002>.
- [12] R.H. Schaloske, E.A. Dennis, The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1761 (2006) 1246–1259, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.07.011>.
- [13] J.E. Burke, E.A. Dennis, Phospholipase A₂ biochemistry, *Cardiovasc. Drugs Ther.* 23 (2009) 49–59, <http://dx.doi.org/10.1007/s10557-008-6132-9>.
- [14] D.R. Holland, L. Clancy, S.W. Muchmore, J. Ryde, H.M. Einspahr, B.C. Finzel, C. Finzel, R.L. Heinrikson, J. Rydell, Heinrikson, K.D. Watenpugh, The Crystal Structure of a Lysine 49 Phospholipase A₂ from the Venom of the Cottonmouth Snake at 2.0-Å Resolution, vol. 265, 1990, pp. 17649–17656.
- [15] C.A.H. Fernandes, D.P. Marchi-Salvador, G.M. Salvador, M.C.O. Silva, T.R. Costa, A.M. Soares, M.R.M. Fontes, Comparison between apo and complexed structures of bothropstoxin-I reveals the role of Lys122 and Ca²⁺-binding loop region for the catalytically inactive Lys49-PLA₂s, *J. Struct. Biol.* 171 (2010) 31–43, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2010.03.019>.
- [16] C.E. Núñez, Y. Angulo, B. Lomonte, Identification of the myotoxic site of the Lys49 phospholipase A₂ from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* snake venom: synthetic C-terminal peptides from Lys49, but not from Asp49 myotoxins, exert membrane-damaging activities, *Toxicon* 39 (2001) 1587–1594, [http://dx.doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00141-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00141-6).
- [17] L. Chioato, E.A. Aragão, T. Lopes Ferreira, A. Ivo de Medeiros, L.H. Faccioli, R.J. Ward, Mapping of the structural determinants of artificial and biological membrane damaging activities of a Lys49 phospholipase A₂ by scanning alanine mutagenesis, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1768 (2007) 1247–1257, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.01.023>.
- [18] C.A.H. Fernandes, E.J. Comparetti, R.J. Borges, S. Huancahuire-Vega, L.A. Ponce-Soto, S. Marangoni, A.M. Soares, M.R.M. Fontes, Structural bases for a complete myotoxic mechanism: crystal structures of two non-catalytic phospholipases A₂-like from *Bothrops brazili* venom, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteom.* 1834 (2013) 2772–2781, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.10.009>.
- [19] C.A.H. Fernandes, R.J. Borges, B. Lomonte, M.R.M. Fontes, A structure-based proposal for a comprehensive myotoxic mechanism of phospholipase A₂-like proteins from viperid snake venoms, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteom.* 1844 (2014) 2265–2276, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.09.015>.
- [20] A.M. Soares, F.K. Ticli, S. Marcussi, M.V. Lourenço, A.H. Januario, S.V. Sampaio, et al., Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms, *Curr.*

- Med. Chem. 12 (2005) 2625–2641, <http://dx.doi.org/10.2174/092986705774370655>.
- [21] F.K. Ticli, L.I.S. Hage, R.S. Cambraia, P.S. Pereira, A.J. Magro, M.R.M. Fontes, R.G. Stábili, J.R. Giglio, S.C. França, A.M. Soares, S.V. Sampaio, Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A₂ inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction, *Toxicon* 46 (2005) 318–327, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.04.023>.
 - [22] J.I. dos Santos, F.F. Cardoso, A.M. Soares, M. dal Pai Silva, M. Gallacci, M.R.M. Fontes, Structural and functional studies of a bothropmycotoxin complexed to rosmarinic acid: new insights into Lys49-PLA₂ inhibition, *PLoS One* 6 (2011), <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0028521>.
 - [23] C.A.H. Fernandes, F.F. Cardoso, W.G.L. Cavalcante, A.M. Soares, M. Dal-Pai, M. Gallacci, M.R.M. Fontes, Structural basis for the inhibition of a phospholipase A₂-like toxin by caffeic and aristolochic acids, *PLoS One* 10 (2015) 1–19, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0133370>.
 - [24] W.B. Mors, M.C. Nascimento, B.M. Pereira, N.A. Pereira, Plant natural products active against snake bite—the molecular approach, *Phytochemistry* 55 (2000) 627–642 doi:S0031942200002296 [pii].
 - [25] J.H. Chen, C.T. Ho, Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 2374–2378, <http://dx.doi.org/10.1021/jf970055t>.
 - [26] P. Sharma, Cinnamic acid derivatives: a new chapter of various pharmacological activities, *J. Chem. Pharm. Res.* 3 (2011) 403–423.
 - [27] N.N. Bogdashev, N.A. Tikhovskaya, A.V. Pogrebnyak, Relationship between biological activity and thermodynamic properties of 5,5-dimethyl-1,3-cyclohexanedione derivatives, *Pharm. Chem. J.* 32 (1998) 30–33, <http://dx.doi.org/10.1007/BF02464209>.
 - [28] C. Rice-Evans, N. Miller, G. Paganga, Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends Plant Sci.* 2 (1997) 152–159, [http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)01018-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01018-2).
 - [29] Y. Xie, B. Huang, K. Yu, F. Shi, T. Liu, W. Xu, Caffeic acid derivatives: a new type of influenza neuraminidase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23 (2013) 3556–3560, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.04.033>.
 - [30] J.W. Agoro, Crystalline caffeic acid derivatives and compositions and method for treating snakebite., US 4124724 A, 1978.
 - [31] A.M. Soares, R. Guerra-Sá, C.R. Borja-Oliveira, V.M. Rodrigues, L. Rodrigues-Simioni, V.M. Rodrigues, M.R. Fontes, B. Lomonte, J.M. Gutiérrez, J.R. Giglio, Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Bothrops neuwiedipauloensis* venom, *Arch. Biochem. Biophys.* 378 (2000) 201–209, <http://dx.doi.org/10.1006/abbi.2000.1790>.
 - [32] M.H. Toyama, A.M. Soares, J.C. Novello, B. Oliveira, J.R. Giglio, M.R.M. Fontes, Comparative biochemical studies of myotoxic phospholipase A₂ from Bothrops venom, *Protein Peptide Lett. USA.* 8 (2001) 179–186, <http://dx.doi.org/10.2174/0929866013409445>.
 - [33] M.R.M. Fontes, A.M. Soares, V.M. Rodrigues, A.C. Fernandes, R.J. Da Silva, J.R. Giglio, Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Bothrops neuwiedipauloensis* venom, *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1432 (1999) 393–395, [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4838\(99\)00120-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00120-X).
 - [34] A.J. Magro, A.M. Soares, J.R. Giglio, M.R.M. Fontes, Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A₂: quaternary structure and inhibition mechanism insights, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311 (2003) 713–720, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.10.047>.
 - [35] M. Jerabek-Willemsen, C.J. Wienken, D. Braun, P. Baaske, S. Duhr, Molecular interaction studies using microscale thermophoresis, *Assay Drug Dev. Technol.* 9 (2011) 342–353, <http://dx.doi.org/10.1089/adt.2011.0380>.
 - [36] Z. Otwinowski, W. Minor, Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode, *Methods Enzymol.* 276 (1997) 307–326, [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(97\)76066-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(97)76066-X).
 - [37] A.J. McCoy, R.W. Grosse-Kunstleve, P.D. Adams, M.D. Winn, L.C. Storoni, R.J. Read, Phaser crystallographic software, *J. Appl. Crystallogr.* 40 (2007) 658–674, <http://dx.doi.org/10.1107/S0021889807021206>.
 - [38] P. Emsley, B. Lohkamp, W.G. Scott, K. Cowtan, Features and development of Coot, *Acta Crystallogr. Sect. D. Biol. Crystallogr.* 66 (2010) 486–501, <http://dx.doi.org/10.1107/S0907444910007493>.
 - [39] A.T. Brünger, P.D. Adams, G.M. Clore, W.L. DeLano, P. Gros, R.W. Grosse-Kunstleve, J.S. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N.S. Pannu, R.J. Read, L.M. Rice, T. Simonson, G.L. Warren, Crystallography & NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination, *Acta Crystallogr. Sect. D. Biol. Crystallogr.* 54 (1998) 905–921, <http://dx.doi.org/10.1107/S0907444998003254>.
 - [40] P.V. Afonine, R.W. Grosse-Kunstleve, N. Echols, J.J. Headd, N.W. Moriarty, M. Mustyakimov, T.C. Terwilliger, A. Urzhumtsev, P.H. Zwart, P.D. Adams, Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine, *Acta Crystallogr. Sect. D. Biol. Crystallogr.* 68 (2012) 352–367, <http://dx.doi.org/10.1107/S0907444912001308>.
 - [41] P.V. Afonine, R.W. Grosse-Kunstleve, P.D. Adams, A. Urzhumtsev, Bulk-solvent and overall scaling revisited: faster calculations, improved results, *Acta Crystallogr. Sect. D. Biol. Crystallogr.* 69 (2013) 625–634, <http://dx.doi.org/10.1107/S0907444913000462>.
 - [42] J.I. dos Santos, A.M. Soares, M.R.M. Fontes, Comparative structural studies on Lys49-phospholipases A₂ from Bothrops genus reveal their myotoxic site, *J. Struct. Biol.* 167 (2009) 106–116, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2009.04.003>.
 - [43] L. Watanabe, A.M. Soares, R.J. Ward, M.R.M. Fontes, R.K. Arni, Structural insights for fatty acid binding in a Lys49-phospholipase A₂: crystal structure of myotoxin II from *Bothrops moojeni* complexed with stearic acid, *Biochimie* 87 (2005) 161–167, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2004.11.005>.
 - [44] G.H.M. Salvador, W.L.G. Cavalcante, J.I. dos Santos, M. Gallacci, A.M. Soares, M.R.M. Fontes, Structural and functional studies with mycotoxin II from *Bothrops moojeni* reveal remarkable similarities and differences compared to other catalytically inactive phospholipases A₂-like, *Toxicon* 72 (2013) 52–63, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.06.013>.
 - [45] G.H.M. Salvador, T.R. Dreyer, W.L.G. Cavalcante, F.F. Matioli, J.I. dos Santos, A. Velazquez-Campoy, M. Gallacci, M.R.M. Fontes, Structural and functional evidence for membrane docking and disruption sites on phospholipase A₂-like proteins revealed by complexation with the inhibitor suramin, *Acta Crystallogr. Sect. D.* 71 (2015) 2066–2078, <http://dx.doi.org/10.1107/S1399004715014443>.
 - [46] D. Sehnal, R. Svobodová-Vareková, K. Berka, L. Pravda, V. Navrátilová, P. Banáš, C.M. Ionescu, M. Otyepka, J. Koča, MOLE 2.0: advanced approach for analysis of biomacromolecular channels, *J. Cheminformatics* 5 (2013) 39, <http://dx.doi.org/10.1186/1758-2946-5-39>.
 - [47] R.J. Borges, F.F. Cardoso, C.A.H. Fernandes, T.R. Dreyer, D.S. de Moraes, R.S. Floriano, L. Rodrigues-Simioni, M.R.M. Fontes, Functional and structural studies of a Phospholipase A₂-like protein complexed to zinc ions: insights on its myotoxicity and inhibition mechanism, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1861 (2017) 3199–3209, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.08.003>.
 - [48] E. Krissinel, K. Henrick, Inference of macromolecular assemblies from crystalline state, *J. Mol. Biol.* 372 (2007) 774–797, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2007.05.022>.
 - [49] M.T. Murakami, M.M. Viçoti, J.R.B. Abrego, M.R. Lourenzoni, A.C.O. Cintra, E.Z. Arruda, M.A. Tomaz, P.A. Melo, R.K. Arni, Interfacial surface charge and free accessibility to the PLA₂-active site-like region are essential requirements for the activity of Lys49 PLA₂ homologues, *Toxicon* 49 (2007) 378–387, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.10.011>.
 - [50] R.J. Borges, N. Lemke, M. Sammito, C. Millán, I. Usón, M.M.R. Fontes, PLA₂s-like membrane perturbation mechanism: extracting the most of crystallography data, *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Adv.* 72 (2016) s226, <http://dx.doi.org/10.1107/S2053273316096558>.
 - [51] W.H. Lee, M.T. Da Silva Giotto, S. Marangoni, M.H. Toyama, I. Polikarpov, R.C. Garratt, Structural basis for low catalytic activity in Lys49 phospholipases A₂-A hypothesis: the crystal structure of piratoxin II complexed to fatty acid, *Biochemistry* 40 (2001) 28–36, <http://dx.doi.org/10.1021/bi0010470>.
 - [52] P.D. Adams, P.V. Afonine, G. Bunkóczi, V.B. Chen, I.W. Davis, N. Echols, J.J. Headd, L.W. Hung, G.J. Kapral, R.W. Grosse-Kunstleve, A.J. McCoy, N.W. Moriarty, R. Oeffner, R.J. Read, D.C. Richardson, J.S. Richardson, T.C. Terwilliger, P.H. Zwart, PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution, *Acta Crystallogr. Sect. D. Biol. Crystallogr.* 66 (2010) 213–221, <http://dx.doi.org/10.1107/S0907444909052925>.
 - [53] R.A. Laskowski, M.B. Swindells, LigPlot +: Multiple Ligand A Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery, 2011, pp. 2778–2786, <http://dx.doi.org/10.1021/ci200227uj>.
 - [54] N.A. Baker, D. Sept, S. Joseph, M.J. Holst, J.A. McCammon, Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 10037–10041, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.181342398>.
 - [55] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin, UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis, *J. Comput. Chem.* 25 (2004) 1605–1612, <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.20084>.
 - [56] T.J. Dolinsky, J.E. Nielsen, J.A. McCammon, N.A. Baker, PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 665–667, <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkh381>.