



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus São José do Rio Preto

Mônika Aparecida Coronado

Estrutura e mecanismo de um peptídeo célula-penetrante extraído do veneno da
serpente brasileira *Crotalus durissus terrificus*

São José do Rio Preto
2013

Mônika Aparecida Coronado

Estrutura e mecanismo de um peptídeo célula-penetrante extraído do veneno da
serpente brasileira *Crotalus durissus terrificus*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, Área de Concentração – Cristalografia de Proteínas, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Raghuvir K. Arni

São José do Rio Preto
2013

Coronado, Mônica Aparecida.

Estrutura e mecanismo de um peptídeo célula-penetrante extraído do veneno da serpente brasileira *Crotalus durissus terrificus* / Mônica Aparecida Coronado. -- São José do Rio Preto, 2013
122 f. : il., tabs.

Orientador: Raghuvir K. Arni

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biologia molecular. 2. Biofísica. 3. Proteínas - Estrutura.
4. Serpente peçonhenta - Peçonha. 5. Cristalografia. 6. Raios X –
Difração. I. Arni, Raghuvir K. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.
III. Título.

CDU – 577-112

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Campus de São José do Rio Preto

Mônika Aparecida Coronado

Estrutura e mecanismo de um peptídeo célula-penetrante extraído do veneno da serpente
brasileira *Crotalus durissus terrificus*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, Área de Concentração – Cristalografia de Proteínas, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Raghuvir K. Arni
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Patrick Jack Spencer
IPEN – São Paulo

Prof^a. Dr^a. Solange M. T. Serrano
Butantã – São Paulo

Prof. Dr. José Ramón B. Abrego
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Roberto da Silva
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
21 de Novembro de 2013

"Tudo o bem que pudermos fazer, toda a ternura que pudermos demonstrar a qualquer ser humano, que seja feita agora, que não seja adiada ou esquecida, pois nós não passaremos duas vezes pelo mesmo caminho"
(James Greene)



Uma das mais belas obras da natureza!

Für mich.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer as fontes financeiras deste projeto/tese, sem elas nada seria possível.

- Deutsche Forschungsgemeinschaft (Projeto BE 1443/18-1)
- CNPq e DAAD (PROBRAL 50754442).
- CAPES (GRANT NR-8248/12-5) pela bolsa de intercâmbio.

Um especial agradecimento para:

- Dra. Banumathi Sankaran (Centro Berkeley de Biologia Estrutural/Berkeley, USA).
- Dr. Azat Gabdulkhakov (Instituto de Pesquisa de Proteínas RAS/Moscou, Rússia).
- Dr. Alexey Kikhney (EMBL / Hamburgo, Alemanha).

Agradeço aos meus orientadores pela confiança em mim depositada:

- Prof. Dr. Raghuvir K. Arni (UNESP/Ibilce, Brasil).
- Prof. Dr. Christian Betzel (Universidade de Hamburgo, Alemanha).

Sem citar nomes, quero imensamente agradecer a todos os colegas que sempre me auxiliaram quando as dúvidas surgiam.

Estrutura e mecanismo de um peptídeo célula-penetrante extraído do veneno da serpente brasileira *Crotalus durissus terrificus*.

Mônika Aparecida Coronado

RESUMO

Este trabalho relata a cristalização e a difração de raios-X de duas proteínas do veneno da cascavel sul-americana, *Crotalus durissus terrificus* e a determinação estrutural da crotamina, um polipeptídeo básico com ação miotóxica e célula-penetrante. A estrutura da crotamina foi determinada por meio da técnica de SAD e refinada a 1,7 Å de resolução. O modelo trimérico é formado pela associação de três monômeros estabilizados por meio de contactos intermoleculares, pontes de hidrogênio e contactos de *van der Waals*. Estudos (DLS e SAXS) indicaram que a crotamina se comporta como um monômero em solução, e o comportamento trimérico é formado provavelmente, por componentes presentes na cristalização. A estrutura secundária compreende uma pequena região N-terminal α -hélice, seguido por uma folha- β e uma segunda α -hélice, a segunda folha- β é antiparalela à primeira. A estrutura apresenta uma topologia $\alpha_1\beta_1\alpha_2\beta_2$ e revela regiões de superfícies hidrofóbicas e catiônicas distintas, que estão localizadas em lados opostos da molécula. Esta distribuição de carga da superfície indica seu possível modo de interação com fosfolipídios carregados negativamente e outros alvos moleculares, que explicam suas diversas atividades farmacológicas. Embora a identidade de sequência entre a crotamina e as β -defensinas humanas seja baixa, a estrutura tridimensional destes peptídeos, funcionalmente relacionados, exibem um *fold* semelhante e um comparável potencial eletrostático de superfície. Sendo a crotamina um dos principais membros de uma grande família de peptídeos com função miotóxica, sua estrutura servirá de base para ao desenvolvimento de novas moléculas com função célula-penetrantes.

Palavras-chave: *Crotalus durissus terrificus*, cascavel, miotóxica, peptídeo célula-penetrante, crotamina, giroxina, crotoxina, cristalografia, raios-X.

Structure and mechanism of a cell penetrating peptide from the Brazilian rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* venom.

Mônika Aparecida Coronado

ABSTRACT

This work reports the crystallization and X-ray data collection of two proteins from the venom of the South American rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*, and structure determination of myotoxic, cell penetrating, basic polypeptide crotoxin. The crotoxin structure was determined by SAD techniques and refined at 1.7 Å resolution. The trimer model is formed by association of three monomers stabilized by intermolecular contacts, hydrogen bond and van der Waals contacts. Solution studies (DLS and SAXS) indicated that, crotoxin exists as a monomer in solution and the trimeric arrangement is likely due an artifact of crystallization. The secondary structure comprises a short N-terminal α -helix followed by a strand β -sheet and a second short α -helix, the second strand β -sheet is antiparallel to the first. The structure is an $\alpha 1\beta 1\alpha 2\beta 2$ topology and reveals distinct cationic and hydrophobic surface regions that are located on opposite sides of the molecule. This surface charge distribution indicates its possible mode of interaction with negatively charged phospholipids and other molecular targets to account for its diverse pharmacological activities. Although the sequence identity between crotoxin and human β -defensins is low, the three-dimensional structures of these functionally related peptides display a similar fold and a comparable net positive potential surface. Since crotoxin is a leading member of a large family of myotoxic peptides its structure will provide the basis for designing novel, cell penetrating molecules.

Keywords: *Crotalus durissus terrificus*, rattlesnake, myotoxin, cell-penetrating polypeptide, crotoxin, gyroxin, crotoxin, crystallography, X-ray.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vi
LISTRA DE ABREVIACÕES	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Crotalus durissus terrificus</i>	2
1.2 Composição do veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	5
1.2.1 <i>Convulxina</i> :	6
1.2.2 <i>Giroxina uma trombina-símile</i> :	7
1.2.3 <i>Crotoxina</i> :	12
1.2.4 <i>Crotamina</i>	16
1.2.4.1 <i>Crotamina e defensinas</i>	19
1.2.4.2 <i>Atividade farmacológica da crotamina</i>	19
1.2.4.3 <i>Atividade antimicrobiana (AMP) e célula-penetrante (CPP) da crotamina</i>	20
1.2.4.4 <i>Modelo tridimensional por NMR</i>	22
2. OBJETIVOS	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Peçonha	24
3.2 Protocolo de purificação	24
3.2.1 <i>Cromatografia de troca iônica</i>	24
3.3 Coloração em comassie do gel SDS-PAGE	25
3.4 Determinação da massa molecular por espectrometria de massa	25
3.5 Dosagem proteica	25
3.6 Concentração das proteínas crotoxina, giroxina e crotamina	26
3.7 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)	26
3.8 Métodos para análise da estrutura tridimensional	26
3.9 Preparação da amostra e cristalização	26
3.10 Otimização das condições iniciais de cristalização	27
3.11 Metais pesados	28
3.12 Coleta de dados usando radiação sincrotron	31
3.13 Processamento dos dados e construção do modelo	32
3.14 Difração anômala	32
3.15 Coleta de dados MAD e determinação da estrutura pela metodologia SAD e refinamento da estrutura	33
3.16 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)	33

3.17 Modelagem molecular por homologia da giroxina	33
3.17.1 Busca por moldes	33
3.17.2 Alinhamento	34
3.17.3 Modelagem	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
4.1 Fracionamento do veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	35
4.1.1 Novo protocolo de purificação da giroxina e crotamina	37
4.2 Cristalização, coleta de dados e análise estrutural da giroxina	40
4.2.1 Cristalização da giroxina	40
4.2.2 Difração de raios-X da giroxina	42
4.2.3 Modelagem molecular da giroxina	42
4.3 Cristalização, coleta de dados e análise estrutural da crotoxina	43
4.3.1 Cristalização da crotoxina	43
4.3.2 Análise da difração de raios-X da crotoxina	46
4.4 Cristalização da crotamina	48
4.4.1 Difração de Raios-X dos Cristais Nativos e Derivados de Átomos Pesados	50
4.4.1.1 Tentativas iniciais de resolução da estrutura por substituição molecular	50
4.4.1.2 Coleta de dados de cristais marcados com átomos pesados	51
4.4.1.3 Construção da estrutura cristalográfica marcada com átomos pesados	53
4.4.1.4 Refinamento da estrutura	54
4.4.2 Análise estrutural da crotamina	57
4.4.2.1 Estrutura geral da crotamina	57
4.4.2.2 Arranjo quaternário da crotamina	59
4.4.2.3 Semelhança estrutural entre crotamina e peptídeos antimicrobianos	63
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
6. PERSPECTIVAS	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
Apêndice A	84
PUBLICAÇÕES	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Serpente Brasileira <i>Crotalus durissus terrificus</i> (Fonte desconhecida).....	3
Figura 2 Efeito da peçonha da cascavel. A) Ptose palpebral, flacidez da musculatura da face. B) Coleta de urina sequencial entre a admissão e 48 horas após o acidente: diurese escurecida (direita para esquerda, respectivamente) (Fonte desconhecida).	5
Figura 3 Estrutura oligomérica da convulxina. Representação em <i>cartoon</i> do tetrâmero ($\alpha\beta$) ₄ da convulxina, a subunidade α (vermelho) e a subunidade β (verde). Cadeia lateral das cisteínas envolvidas nas ligações dissulfídicas intra-subunidades, conectando os $\alpha\beta$ -heterodomínios e as cisteínas formando as ligações inter-subunidades, formando o tetrâmero ($\alpha\beta$) ₄ . As cisteínas são mostradas em <i>ball stick</i> (carbono em cinza e enxofre em amarelo), indicadas por setas. As regiões N- e C-terminal estão destacadas (18).....	7
Figura 4 Estrutura tridimensional da trombina humana (1PPB) representada em <i>cartoon</i> , em ciano a cadeia A e em púrpura a cadeia B. Em vermelho, a clássica tríade catalítica presente nas serino proteinases (His57, Asp102 e Ser195). Em amarelo os exossítios I e II.	9
Figura 5 Mecanismo de catálise da quimiotripsina. Na ligação do substrato, His57 atrai o próton do grupo OH de Ser195 que lança um ataque nucleofílico no átomo de carbono terminal (passo 2). Um intermediário tetraédrico é formado e estabilizado por ligações de hidrogênio com o oxigênio da cadeia lateral de Gly193 e a cadeia principal do grupo NH de Ser195. A amida aceita um próton da His57 e se dissocia (passo 3). Depois da ruptura da ligação peptídica um intermediário acil-enzima é formado (passo 4). His57 recebe um próton da água que desloca a amina. O íon -OH resultante ataca o átomo de carbono no grupo acilo (Passo 5). O segundo intermediário tetraédrico é criado e estabilizado pelas mesmas ligações de hidrogênio, conforme descrito anteriormente (Gly 93 e Ser195). O oxigênio na cadeia lateral da Ser195 recebe um próton da His57 (passo 6). O grupo acilo se dissocia e a tríade catalítica é refeita (passo 1) (Berg, John and Lubert, Biochemistry).....	11
Figura 6 Alinhamento da cadeia ácida da Crtx com outras PLA ₂ , as linhas indicam a formação das pontes dissulfeto. No alinhamento é possível observar a alta homologia das três cadeias que compõem a cadeia ácida da Crtx (CrtxA α , β , γ), mostrando os resíduos de cisteínas altamente conservados e o resíduo Asp49 (vermelho), substituído pela Lys49 em <i>C. atrox</i> , responsável pela coordenação do íon de Ca ²⁺	18
Figura 7 Estrutura primária da crotamina, as linhas indicam a ligação entre os pares de cisteínas envolvidas nas pontes dissulfeto.	18
Figura 8 Mecanismo de translocação através de membranas biológicas. Dependente da composição, carga e estrutura, diferentes peptídeos desempenham diferentes mecanismos de interação com a membrana (Galdiero <i>and others.</i> , Peptide-lipid interactions: experiments and applications).....	21
Figura 9 Desenho esquemático de VIL (<i>Vaporizing Iodine Labelling</i>) e HYPER-VIL procedimentos aplicados aos cristais representativos. (a) Os cristais nativos são preparados pelo método de difusão de vapor, gota-suspensa. (b) Uma pequena gota de solução de iodo é colocada junto da gota de cristalização. (c) Moléculas de I ₂ rapidamente difundem-se por toda a gota de cristalização. (d) Depois da incubação, os cristais se apresentam com uma coloração marrom escuro. (e) A técnica HYPER-VIL emprega uma gotícula adicional (~ 1,0 μ l) de 30 % de H ₂ O ₂ colocado em um pequeno cavalete (<i>bridge</i>) de cristalização. A gota de H ₂ O ₂ será introduzida no cristal, após a mudança na coloração dos cristais através da aplicação de VIL, ou o peróxido de hidrogênio redissolve moléculas de I ₂ na gotícula de iodo, o qual diminuirá a quantidade de difusão do I ₂ . (f) Como resultado da reação HYPER-VIL, a geração de bolhas de oxigênio e do branqueamento da cor castanha são observados na gotícula de cristalização, os quais são bons indicadores de iodação (Miyatake, Hasegawa and Yamano, New methods to prepare iodinated derivatives by vaporizing iodine labelling (VIL) and hydrogen peroxide VIL (HYPER-VIL))......	31

- Figura 10 Fracionamento do veneno bruto de *C.d.t.* por exclusão molecular em resina Superdex 75 (eixo x: volume de eluição, eixo y: unidade de absorção (AU) em 280 nm), são mostrados quatro principais frações características do veneno: (I) convulxina, (II) giroxina, (III) crotoxina e (IV) crotamina. Inseto, 15% gel SDS_PAGE, (I – IV) frações oriundas da exclusão molecular, (M) marcador de massa molecular.35
- Figura 11 Cromatografia de troca aniônica da crotoxina em coluna MonoQ (GE-Healthcare Life Sciences). Inseto, Gel 15% não redutora em SDS_PAGE do pico I, referente a crotoxina. No eixo X, o volume de eluição em mililitros (ml), no eixo Y, a unidade de absorção (AU) em 280 nm (Azul) e o gradiente de concentração do tampão B (verde).36
- Figura 12 Cromatografia de troca catiônica do veneno bruto de *C.d.t.* em coluna MonoS (HR 10/10). Frações puras das proteínas giroxina (I, II), PLA₂ (III) e crotamina (IV) foram obtidas em uma única etapa de purificação. No eixo X descrevemos o volume de eluição em mililitros (ml), no eixo Y, unidade de absorção (AU) em 280 nm (azul) e o gradiente de concentração do tampão B (verde).38
- Figura 13 Gel de poliacrilamida a 15% com agente desnaturante (SDS). MW – Padrão de massa molecular. A) Gel da giroxina, linhas 1 a 4 serino proteinase purificada; B) Gel da crotamina, linhas 1 a 3 Cro purificada.39
- Figura 14 Espectrometria de massa da fração da crotamina purificada por troca iônica. Presença de dois picos relacionados à presença de duas isoformas da crotamina com cargas de superfícies próximas e com massa molecular diferenciada. O gráfico mostra massa molecular *versus* intensidade.40
- Figura 15 Fotomicrografia dos cristais da giroxina. Na coluna A os cristais da giroxina em três diferentes condições iniciais: 1) citrato tri-sódico 0,2 M, dihidrogenofosfato de amônio 1 M; 2) acetato de sódio 2 M, pH 4,6, 8% PEG 4000; 3) citrato tri-sódio 0,2 M, dihidrogenofosfato de amônio 0,5 M. Na coluna B os cristais após otimização: 1) citrato tri-sódico 0,2 M, dihidrogenofosfato de amônio 0,6 M; 2) acetato de sódio 2 M, pH 4,6, 12% PEG 4000; 3) citrato tri-sódio 0,2, dihidrogenofosfato de amônio 0,7 M.41
- Figura 16 A) Estrutura da giroxina gerada por modelagem molecular (verde) sobreposta ao modelo (vermelho-2AIP), a região do sítio de glicosilação para a giroxina esta destacado pelo aminoácido Asn105. B) Alinhamento da sequência da giroxina com a sequência da serino proteinases utilizada como molde. As setas vermelhas indicam os aminoácidos envolvidos na tríade catalítica, as setas azuis representam os sítios S1 e S2 e a seta amarela indica a posição da glicosilação na proteína giroxina. As sequências destacadas pelos retângulos mostram as regiões de baixa similaridade.43
- Figura 17 *Heatmap* do DLS da Crtx. A) Crtx antes da centrifugação; B) Crtx centrifugada a 10.000 x g, 60 min., indicando a monodispersividade da solução (*heatmap*). O gráfico mostra o tamanho da partícula (*radius*) em função do tempo (s).44
- Figura 18 Fotomicrografia dos cristais iniciais da crotoxina nas condições: A) sulfato de lítio 0,2 M, trisHCl 0,1 M pH 8,5 e 30% PEG 4000; B) acetato de sódio 0,2 M, trisHCl 0,1 M pH 8,5 e 30% PEG 4000.45
- Figura 19 Fotomicrografia dos cristais da crotoxina obtidos após refinamento nas condições: A) sulfato de lítio 0,2 M, trisHCl 0,1 M pH 8,5 e 10% PEG 4000; B) acetato de sódio 0,2 M, trisHCl pH 8,5 e 10 % PEG 4000.45
- Figura 20 A) *Mosaic crystal* (Rupp, Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to Structural Biology). B) o padrão de difração da Crtx mostra um correspondente espalhamento mosaico nos *spots*. C) Visualização ampliada.47
- Figura 21 DLS. A) *Heat map* da crotamina. As cores indicam a intensidade relativa da partícula, com azul sendo zero e vermelho o máximo. B) Raio hidrodinâmico, o gráfico superior mostra o raio de distribuição (nm) *versus* intensidade, no gráfico inferior é plotado o raio (nm) *versus* tempo (s).48

- Figura 22 Fotomicrografia do cristal da Cro. Dimensões: 0,5 x 0,25 x 0,1 mm.49
- Figura 23 Difração de raios-X do cristal da Cro. Visualização aumentada, difração a 1,84 Å de resolução.50
- Figura 24 Refinamento da molécula da Cro baseado no mapa de densidade eletrônica. A,B) Diferentes regiões da estrutura, mostrando a qualidade do mapa eletrônico e o modelo construído com base na interpretação da densidade eletrônica. C) Visão global do enovelamento da Cro.55
- Figura 25 A) Estrutura 3D da crotamina. As regiões N- e C-Terminal estão sinalizadas, assim como as três pontes dissulfeto entre os resíduos Cys4-Cys35, Cys11-Cys30 e Cys18-Cys37. B) Os resíduos hidrofóbicos estão localizados em um lado da molécula (rosa) e os resíduos carregados positivamente (azul) estão posicionados no lado oposto. C) Representação *space-filling* da crotamine destacando a região anfifílica em rosa e azul. D) Representação esquemática da estrutura secundária.....58
- Figura 26 Sobreposicao dos modelos de NMR da crotamina (Preto) com o modelo cristalográfico (C_{α}). A) Modelo de Nicastro e cols. (1H5O - Pink). B) Modelo de Fadel e cols. (1Z99 - Alaranjado). Rotação em 180 °.59
- Figura 27 Representação dos íons que estabilizam o trimero. A) Representação esquemática, onde o “C” está representado pela cor preta, o “N”, azul e o “O” vermelho. As linhas pontilhadas em verde representam as pontes de hidrogênio. Semi-circulos representam os aminoácidos envolvidos nas interações hidrofóbicas. i, ii, iii) íons de SO_4^{2-} , glicerol e SCN, respectivamente (esquema gerado pelo programa LIGPLOT. B) Representação dos mesmo íons no mapa de densidade eletrônica.61
- Figura 28 A,B)Arranjo quaternário da crotamina (*mesh, cartoon*) com uma visão global do contato intermolecular. C) Representação dos contatos intermoleculares entre as cadeias A-B, A-C, B-D e os aminoácidos envolvidos. As pontes de hidrogênio estão representadas pelas linhas azuis. Contato de *van der Waals* está mostrado pelas linhas tracejadas (alaranjada) (Representação gerada pelo programa LIGPLOT).62
- Figura 29 (A) Alinhamento sequencial dos peptídeos antimicrobianos (AMP). Resíduos conservados de cisteína estão destacados em cinza escuro. Crotamina (PDB 4GV5), peptídeo defensina-símile 2 (PDB 1D6B), heliomicina (PDB 1I2U), toxina-III (PDB 1LQQ), peptídeo antifúngico eucommia 2 (PDB 1P9Z), caribdotoxina (PDB 2CRD), h β -defensina 1 (PDB 1IJU), h β -defensina 2 (PDB 1FD4), h β -defensina 3 (PDB 1KJ6) e h α -defensina 1 (PDB 2PM1). (B) Sobreposição da crotamina (cartoon plot) em cinza, com h β D-1(PDB ID: 1IJU, rosa), h β D-2 (PDB ID: 1FD4, vermelho) e h β D-3 (PDB ID: 1KJ6, ciano). Correspondentes valores de *r.m.s.d.* do C_{α} : 1,8, 1,8 e 2,6 Å, respectivamente.64
- Figura 30 Comparação estrutural (em duas orientações, rotação de 180°) da Cro com homólogos antimicrobianos e peptídeos antimicrobiano-símile de diferentes organismos. 1) O domínio γ -core é mostrado em alaranjado. 2) Plotagem de hidropatia: alaranjado escuro/hidrofóbicos; alaranjado claro/intermediário; azul/hidrofílicos. 3) Carga da superfície: azul/básico, (Arg, Lys); vermelho/ácido, (Asp, Glu). Os dados são: (A) crotamina do veneno de *C.d.t.* (PDB 4GV5), (B) peptídeo defensina-símile 2 (PDB 1D6B), (C) heliomicina (PDB 1I2U), (D) toxina-III (PDB 1LQQ), (E) peptídeo antifúngico eucommia 2 (PDB 1P9Z), (F) caribdotoxina (PDB 2CRD), (G) h β -defensina 1 (PDB 1IJU), (H) h β -defensina 2 (PDB 1FD4), (I) h β -defensina 3 (PDB 1KJ6) e (J) h α -defensina 1 (PDB 2PM1).71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Comparação sequencial de peptídeos célula penetrante.....	22
Tabela 2 Compostos derivados de átomos pesados utilizados nos experimentos de <i>soaking</i>	29
Tabela 3 Compostos derivados de átomos pesados utilizados nos experimentos de <i>quick-cryo-soaking</i>	30
Tabela 4 Parâmetros do cristal e dados estatísticos de coleta.	51
Tabela 5 Dados coletados com as técnicas de <i>soaking</i> , <i>quick-cryo-soaking</i> e VIL.	52
Tabela 6 Comprimento de ondas utilizadas para a coleta de dados de difração, para resolver a estrutura pela técnica MAD.	52
Tabela 7 Parâmetros estatísticos e refinamento da estrutura da crotamina.	56
Tabela 8 Pontes de hidrogênio entres as moléculas da crotamina na unidade assimétrica.	63
Tabela 9 Comparação da sequência de aminoácidos da crotamina com peptídeos α -, β -defensinas e defensina-símile.	65
Tabela 10 Comparação dos resíduos hidrofóbicos e da carga da Cro em comparação com outros peptídeos antimicrobianos; SA: <i>total surface accessibility</i> em Å^2	68

LISTRA DE ABREVIACOES

PLA₂ - Fosfolipase A2

CB - Crotoxina basica

CA - Crotoxina Ácida

Crtx – Crotoxina

Cro - Crotamina

Cvx - Convulxina

PEG - Polietileno glicol

Tris - Tris-hidroximetil amino metano

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

DDT - Ditiotreitol

DLS - em inglês *Dynamic Light Scattering*

r.m.s. - em inglês *Root-mean-square*

PDB - em inglês *Protein Data Bank*

NMR - em inglês *Nuclear Magnetic Resonance*

IRA - Insuficiencia renal aguda

TC - Tempo de coagulação

SVSP - em inglês *Snake Venom Serine Protease*

pI - Ponto isoelétrico

AMP - em inglês *Antimicrobial Peptide*

hBD - em inglês *Human β -defensin*

CPP - em inglês *Cell Penetrating Peptide*

FPLC - em inglês *Fast Protein Liquid Chromatography*

VC - Volume de coluna

MALDI-TOF - em inglês *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of flight*

VIL - em inglês *Vaporizing Iodine Labelling*

DESY - em alemão *Deutsches Elektronen-Synchrotron*

MAD - em inglês *Multiwavelength Anomalous Dispersion*

SAD - em inglês *Single-wavelength Anomalous Dispersion*

SAXS – em inglês *Small Angle X-ray Scattering*

X-ray – Raios-X

1. INTRODUÇÃO

O ser humano, desde a antiguidade faz uso de produtos de origem animal ou vegetal com o intuito de tratar seus males. A Natureza sempre foi fornecedora de matéria prima para “medicamentos” utilizados na forma de infusões e/ou emplastos. Mas com a necessidade de se saber qual o mecanismo bioquímico ou biológico realizado por esses produtos, muitas pesquisas foram realizadas e muito se aprendeu sobre diversos produtos naturais.

Estudos com venenos de serpentes têm possibilitado a elucidação de diversos processos bioquímicos e fisiológicos manifestados durante o envenenamento, bem como contribuído na modelagem molecular de novos princípios ativos farmacológicos para diversos fins (GUTIERREZ, 2002).

Os venenos de serpentes em geral, são misturas complexas, sendo que 90% do peso seco são proteínas enzimáticas ou não enzimáticas, carboidratos, lipídios, aminas biogênicas, aminoácidos e peptídeos (BJARNASON; HAMILTON; FOX, 1988; DEUTSCH; DINIZ, 1955). Atualmente, há um grande número de proteínas purificadas e caracterizadas a partir de venenos de serpentes, dentre estas, o complexo enzimático das fosfolipases A₂ (PLA₂). Enzimas proteolíticas que interferem em processos hemostáticos têm sido bem investigadas (HUANG, M. Z.; GOPALAKRISHNAKONE; KINI, 1997; MARKLAND, 1998; SANOMARTINS et al., 1995).

A importância dos estudos dos venenos de serpentes vem contribuindo para o conhecimento de diversos processos fisiológicos. Consequentemente, muitas pesquisas têm sido dirigidas com o intuito de melhorar nossa compreensão sobre a ação dos venenos das serpentes e das toxinas isoladas. Com isso estabelecerem um conhecimento das características farmacológicas e moleculares das toxinas das serpentes, sendo este ainda um campo fértil de pesquisa (CARDOSO et al., 2003). Além disso, o constante desenvolvimento nas metodologias utilizadas em biologia celular e molecular tem oferecido oportunidades que possibilitam descobrir novas e inesperadas atividades biológicas das toxinas e biomoléculas derivadas das mesmas. O presente projeto tem como foco a determinação estrutural por raios-X da crotamina, uma miotoxina presente no veneno da cascavel *Crotalus durissus terrificus*, isolada e purificada pela primeira vez há mais de 60 anos (GONCALVES; POLSON, 1947). Desde então, surgiram diversos trabalhos relacionados à crotamina que vem contribuindo para a compreensão nos aspectos estruturais, genéticos, moleculares, farmacológicos e terapêuticos. No banco de dados PDB (*Protein Data Bank*) estão disponíveis duas estruturas

da crotamina, ambas resolvidas por NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*). Entretanto, estas estruturas apresentam algumas divergências estruturais entre si. Um melhor esclarecimento da estrutura tridimensional será de grande contribuição em linhas de pesquisas para o uso deste polipeptídeo no desenvolvimento de agentes farmacológicos e terapêuticos. Neste trabalho será apresentada a estrutura cristalográfica da crotamina, assim como, resultados estruturais com outras proteínas provenientes do veneno da cascavel.

1.1 *Crotalus durissus terrificus*

As serpentes são encontradas em quase todo globo terrestre, sendo mais frequentes nas regiões tropicais e subtropicais por serem pecilotérmicos (ajustam a temperatura corporal de acordo com o ambiente).

As serpentes da família *Viperidae* possuem o mecanismo de injeção de veneno mais desenvolvido e são divididas em duas outras subfamílias: *Viperinae* e *Crotalinae*. No Brasil, a família *Viperidae* compreende três gêneros: *Crotalus* (conhecidas como cascavéis); *Bothrops* (as chamadas jararacas) e *Lachesis* (surucucus). As serpentes do gênero *Crotalus* são no total de 26 espécies de serpentes de hábitos terrestres e pouco ágeis, representadas no Brasil por uma única espécie (*Crotalus durissus*) com ampla distribuição geográfica, desde os cerrados do Brasil central, regiões áridas e semiáridas do Nordeste, campos e áreas abertas do Sul, Sudeste e Norte. São distinguidas cinco espécies de acordo com a região geográfica: *Crotalus durissus terrificus* (região Sul); *Crotalus durissus cascavella* (região Nordeste); *Crotalus durissus collilineatus* (Centro Oeste); *Crotalus durissus ruruima* (savanas de Roraima) e *Crotalus durissus marajoensis* (ilha de Marajó - Pará).

A espécie *C.d.t* (Figura 1) é conhecida popularmente como cascavel, boiçininga, cascavel de quatro ventas, cobra de cascavel, maracabóia e maracá (BARRAVIERA, 1994b; BARRAVIERA et al., 1989).



Figura 1 Serpente Brasileira *Crotalus durissus terrificus* (Fonte desconhecida)

As serpentes do gênero *Crotalus* encontradas no Brasil apresentam características consideradas também em outras serpentes peçonhentas da família *Viperidae* como, por exemplo, a cabeça triangular, escamas na cabeça, olhos pequenos com pupilas em fendas e um par de fossetas loreal, situada entre as narinas e a boca. Apresentam dentes inoculadores de veneno do tipo solenóglifos (dentes tubulares). A referida fosseta funciona como detector térmico muito sensível, captando também as vibrações do ar por intermédio da membrana que reveste o septo entre suas duas câmaras, na extremidade da cauda encontra-se o guizo ou também chamado de chocalho com anéis que estão relacionados ao número de mudas de pele, uma característica das cascavéis (BARRAVIERA, 1994a).

O acidente crotálico é responsável por cerca de 7,7% dos acidentes ofídicos registrados no Brasil, podendo representar até 30% dos acidentes em algumas regiões. Apresenta o maior coeficiente de letalidade, devido à frequência com que evolui para insuficiência renal aguda (IRA). São três as ações principais do veneno crotálico: neurotóxica, miotóxica e coagulante. A ação neurotóxica produzida principalmente pela crotóxina (Ctx), uma neurotoxina de ação pré-sináptica, atua nas terminações nervosas inibindo a liberação de acetilcolina. Esta inibição é o principal fator responsável pelo bloqueio neuromuscular, do qual decorrem as paralisias motoras apresentadas pelas vítimas. A ação miotóxica produz lesões de fibras musculares esqueléticas (rabdomiólise) e ação coagulante, decorre da atividade do tipo trombina, que converte o fibrinogênio diretamente em fibrina. O consumo do fibrinogênio pode levar à incoagulabilidade sanguínea. As manifestações hemorrágicas, quando presentes, são discretas. São poucas as manifestações locais observadas, não há dor, ou esta pode ser de pequena intensidade. Há parestesia local ou regional que pode persistir por tempo variável, podendo

ser acompanhada de edema discreto ou eritema no ponto da picada. Geralmente ocorre mal-estar, prostração, sudorese, náuseas, vômitos e sonolência ou inquietação. A secura da boca pode aparecer precocemente e estar relacionada a estímulos de origens diversas. As manifestações neurológicas decorrem da ação neurotóxica do veneno, surgem nas primeiras horas após a picada, e caracterizam fácies miastênica (fácies neurotóxica de *Rosenfeld*) evidenciadas por ptose palpebral uni ou bilateral, flacidez da musculatura da face (Figura 2A), alteração do diâmetro pupilar, incapacidade de movimentação do globo ocular (oftalmoplegia) podendo existir dificuldade de acomodação (visão turva) e/ou visão dupla (diplopia). Como manifestações menos frequentes, pode-se encontrar paralisia velopalatina, com dificuldade à deglutição, diminuição do reflexo do vômito, alterações do paladar e olfato. A ação miotóxica provoca dores musculares generalizadas (mialgias) que podem aparecer precocemente. A fibra muscular esquelética lesada libera quantidades variáveis de mioglobina que é excretada pela urina (mioglobinúria), conferindo-lhe uma cor avermelhada ou de tonalidade mais escura, até o marrom (Figura 2B). A mioglobinúria constitui a manifestação clínica mais evidente da necrose da musculatura esquelética (rabdomiólise). Pode ocorrer incoagulabilidade sanguínea ou aumento do Tempo de Coagulação (TC), em aproximadamente 40% dos pacientes, observando-se raramente sangramentos restritos às gengivas (gengivorragia) (SAÚDE, 2001).

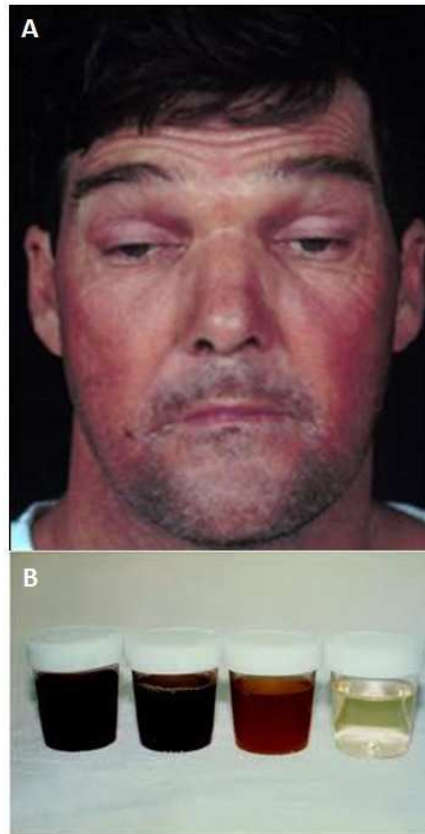


Figura 2 Efeito da peçonha da cascavel. A) Ptose palpebral, flacidez da musculatura da face. B) Coleta de urina sequencial entre a admissão e 48 horas após o acidente: diurese escurecida (direita para esquerda, respectivamente) (Fonte desconhecida).

1.2 Composição do veneno de *Crotalus durissus terrificus*

No caso específico do veneno da subespécie *Crotalus durissus terrificus*, quando fracionado por exclusão molecular, se obtém quatro frações farmacologicamente ativas identificadas até então, são elas: convulxina (PRADO-FRANCESCHI; BRAZIL, 1981), giroxina (SEKI; VIDAL; BARRIO, 1980), crotoxina (SLOTTA, K.; PRIMOSIGH, 1950; SLOTTA, K. H.; PRIMOSIGH, 1951) e crotamina (GONCALVES; POLSON, 1947). Estudos de proteômica (GEORGIEVA et al., 2010) demonstraram que a composição da toxina do veneno correlaciona-se com a manifestação clínica das picadas da serpente *Crotalinae* e explica os efeitos patológicos do veneno, como neurotoxicidade, mionecrose sistêmica, distúrbios hemostáticos, mioglobinúria que pode levar a insuficiência renal aguda. A grande maioria das toxinas está potencialmente envolvida na neurotoxicidade, miotoxicidade e coagulopatia. Os componentes predominantes do veneno neurotóxico são fosfolipases A2 e serino proteinases. O veneno é uma fonte rica de 5'- nucleotidasas (7,8% das toxinas identificadas) que induz desordens hemostáticas. A composição venômica de *C.d.t.* e o transcriptoma da glândula de

veneno da subespécie *C. d. collilineatus* mostraram diferenças na presença de famílias de proteínas e na quantidade das toxinas. Alguns dos componentes do veneno identificados pela análise proteômica não foram relatados no transcriptoma da *C.d.c.*.

1.2.1 Convulxina:

As proteínas semelhantes às lectinas tipo-C dos venenos de serpentes desempenham diversos efeitos biológicos como, por exemplo, a ativação da agregação plaquetária. Entretanto, não apresentam atividade hemoaglutinante, apresentadas para as lectinas tipo-C verdadeiras (MORITA, 2005).

A convulxina (Cvx) é uma lectina tipo-C isolada do veneno de *C.d.t.*, estudos farmacológicos da convulxina observou o aparecimento de movimentos convulsivos, alternados com períodos de torpor e relaxamento, e distúrbios respiratórios, cuja toxicidade foi estudada em vários modelos animais. Quando inoculada por via intravenosa, provoca efeitos como: perda de equilíbrio, alterações circulatórias, gastrointestinais e respiratórias, e alterações visuais logo após sua inoculação, além de ativar e agregar plaquetas na ausência de fibrinogênio (RANDON et al., 1982; VARGAFTIG, 1982). Entretanto, Mello e cols. (1989) demonstraram que a convulxina é um potente ativador de plaquetas do sangue, não apresentando atividade convulsiva (MELLO et al., 1989).

A Cvx é formada por duas cadeias polipeptídicas, $Cvx\alpha$ (13,9kDa) e $Cvx\beta$ (12,6 kDa) conectadas por pontes dissulfeto entre os aminoácidos Cys81 α e Cys77 β , formando um heterodímero (LEDUC; BON, 1998; MURAKAMI; WATANABE; et al., 2003; MURAKAMI; ZELA; et al., 2003).

Murakami e col. (2003) demonstraram que a estrutura da convulxina era formada por um heterodímero. Vários estudos indicaram que a convulxina se apresentava com uma topologia $\alpha\beta\beta$, baseado no comportamento hidrodinâmico da mesma. Entretanto, no mesmo ano, Murakami e cols. determinaram pela primeira vez a estrutura da convulxina através da técnica de cristalografia, eles demonstraram que a presença de uma ponte dissulfeto adicional formada entre a vizinhança do $\alpha\beta$ -heterodímero, resultava em um anel tetramérico $\alpha\beta\beta\beta$, na estrutura da convulxina (Figura 3). A Cvx se comporta em condições fisiológicas como um hetero-octâmero cíclico, o que leva à formação de um grande canal de solvente (Figura 3). Entretanto, o comportamento anômalo da Cvx em cromatografia de exclusão molecular e em gel nativo, sugerindo que a Cvx é uma $\alpha\beta\beta\beta$, pode ser atribuído pela presença desse grande canal de solvente (MURAKAMI; ZELA; et al., 2003).

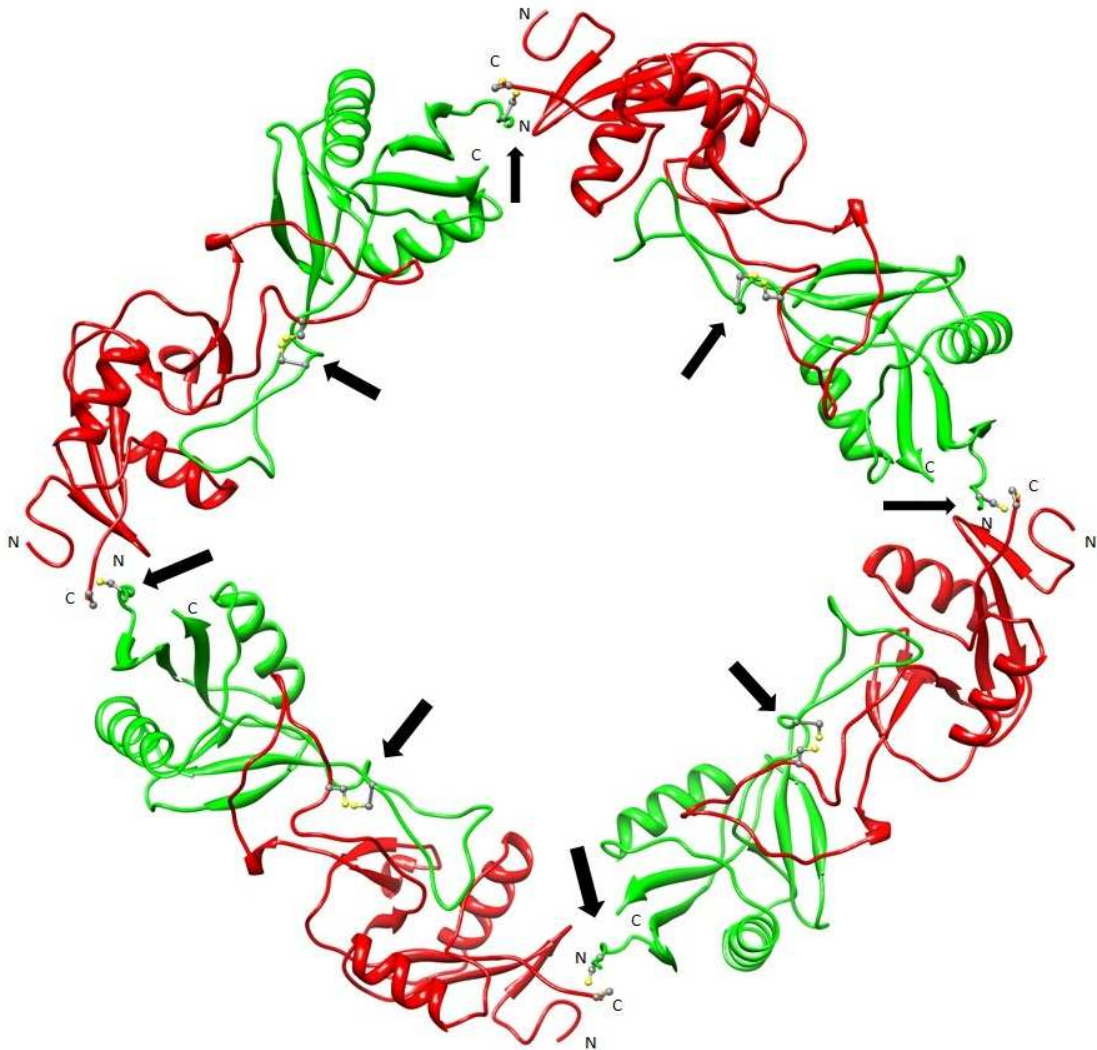


Figura 3 Estrutura oligomérica da convulxina. Representação em *cartoon* do tetrâmero $(\alpha\beta)_4$ da convulxina, a subunidade α (vermelho) e a subunidade β (verde). Cadeia lateral das cisteínas envolvidas nas ligações dissulfídicas intra-subunidades, conectando os $\alpha\beta$ -heterodomínios e as cisteínas formando as ligações inter-subunidades, formando o tetrâmero $(\alpha\beta)_4$. As cisteínas são mostradas em *ball stick* (carbono em cinza e enxofre em amarelo), indicadas por setas. As regiões N- e C-terminal estão destacadas (18).

1.2.2 Giroxina uma trombina-símile:

As serino proteinases são encontradas em microorganismos, plantas e diversos animais, são divididas em sete principais clãs: SA, SB, SC, SE, SF, SH e TA. As serino proteinases são subdivididas em famílias, com base na sequência e similaridade funcional (MEROPS - The Peptidase Database)(MEROPS - The Peptidase Database). As serino proteinases de venenos de serpentes (SPSV) pertencem à família S1 do clã SA (EC=3.4.21.-) (BARRETT; RAWLINGS, 1995). A maioria das enzimas na cascata de coagulação e fibrinólise são serino

proteínases caracterizadas pela tríade catalítica: His57, Asp102 e Ser195. No entanto, a maioria das SVSPs (*Snake Venom Serino Proteases*) é originária da caliceína glandular, que depois evoluiu para adquirir atividades de coagulação, fibrinolítica/fibrinogenolítica. Isto pode explicar os efeitos hipotensores de algumas enzimas, devido à atividade caliceína-símile, produzindo cininas. O maior grupo de enzimas de veneno desta família é conhecido como trombina-símile devido a sua atividade, e não a origem evolutiva.

A trombina é sintetizada no fígado como um precursor de 622 aminoácidos, com um peptídeo sinal de 24 resíduos de aminoácidos e um pro-peptídeo de 19 resíduos de aminoácidos. A cadeia madura pode ser processada em várias formas, incluindo aquelas designadas como α -, β - e γ -trombina, é ativada somente após a clivagem da pro-trombina pelo fator X.

A trombina é uma serino proteinase formada por uma cadeia A com 36 resíduos de aminoácidos, ligada por uma ponte dissulfeto a uma cadeia B com 259 resíduos de aminoácidos (Figura 4). A trombina exibe o enovelamento característico das serino proteinases tipo tripsina, mas apresentam várias regiões características que regulam a interação com outras moléculas e contribuem para a alta especificidade da molécula (STUBBS; BODE, 1995). A alta especificidade da trombina aos seus substratos e receptores é atribuída à ligação aniônica dos resíduos catalíticos denominados exossítios I e II. A trombina apresenta uma fenda que abriga a tríade catalítica (Figura 4), sendo esta cercada por dois polos positivos conhecidos como exossítio I e II. O exossítio I, responsável pela interação da trombina com o fibrinogênio, já o exossítio II é responsável pela ligação da trombina com a heparina.

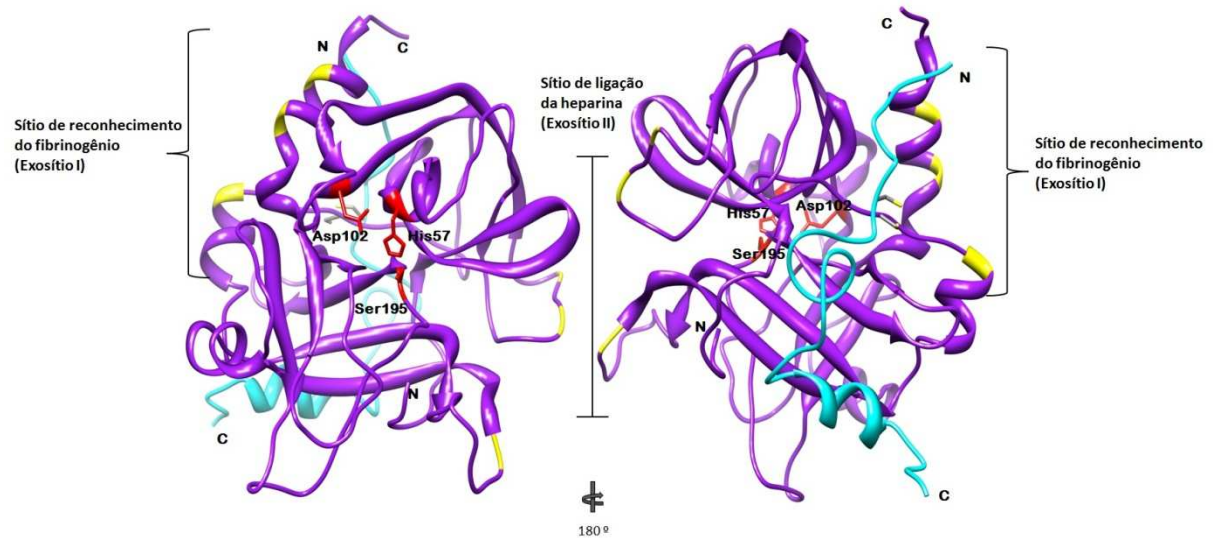


Figura 4 Estrutura tridimensional da trombina humana (1PPB) representada em *cartoon*, em ciano a cadeia A e em púrpura a cadeia B. Em vermelho, a clássica tríade catalítica presente nas serino proteinases (His57, Asp102 e Ser195). Em amarelo os exosítios I e II.

As serino proteinases são abundantes nos venenos de serpentes, o grande interesse pelas enzimas semelhantes à trombina ganhou importância com a possibilidade de utilização no tratamento de doenças trombóticas e como anticoagulantes (OUYANG; TENG; HUANG, 1990). Estas enzimas de venenos de serpentes têm como propriedade estrutural a tríade catalítica que é altamente conservada nas serino proteinases (SERRANO; MAROUN, 2005). Os três aminoácidos da tríade catalítica desempenham um papel essencial na clivagem das ligações peptídicas. Embora os membros da tríade apresentem uma localização distante na sequência primária da proteína, eles se apresentam muito próximos um do outro na estrutura tridimensional, devido ao dobramento da mesma. A geometria particular dos membros da tríade é característica para a específica função. A cadeia lateral da Ser195 forma ponte de hidrogênio com o anel imidazólico da His57. O grupamento -NH deste anel, por sua vez, forma ponte de hidrogênio com o grupo carboxilato do Asp102. Quando a histidina posiciona a cadeia lateral da serina e polariza a sua hidroxila, ela age como catalisador básico geral como receptor de íon de hidrogênio, porque a hidroxila polarizada da serina fica pronta para desprotonação. A retirada do próton da hidroxila gera um nucleófilo. O aspartato ajuda a orientar e a tornar a histidina um melhor receptor de prótons, por efeitos eletrostáticos (BERG; JOHN; LUBERT, 2002; NELSON; COX, 2004). Após a ligação ao substrato, a reação começa com o ataque nucleofílico da hidroxila da Ser195 ao carbono carbonila do substrato. Este ataque altera a geometria em torno deste carbono, de triangular plana para tetraédrica. O

intermediário tetraédrico formado é portador de uma carga negativa no átomo de oxigênio derivado da carbonila. Esta carga é estabilizada por interações com grupamentos NH da proteína em um local denominado cavidade do oxianionte. Estas interações também ajudam a estabilizar o estado de transição que precede a formação do intermediário tetraédrico. Este último intermediário sofre então um colapso, gerando acil-enzima. Esta etapa é facilitada pela transferência de um próton da histidina, com carga positiva, para a amina formada pela clivagem da ligação peptídica. O componente amínico está agora livre para sair da enzima e é então hidrolisado por um processo que é essencialmente as etapas anteriores. Uma molécula de água ataca a carbonila, enquanto um próton é simultaneamente removido pelo radical da histidina, que agora age como catalisador geral, formando um intermediário tetraédrico. Esta estrutura se quebra, formando o ácido carboxílico, produto que deixa pronta a enzima para outra rodada de catálise (BERG et al., 2002; NELSON; COX, 2004). A seguir é mostrada a representação esquemática do mecanismo catalítico das serino proteinases (Figura 5).

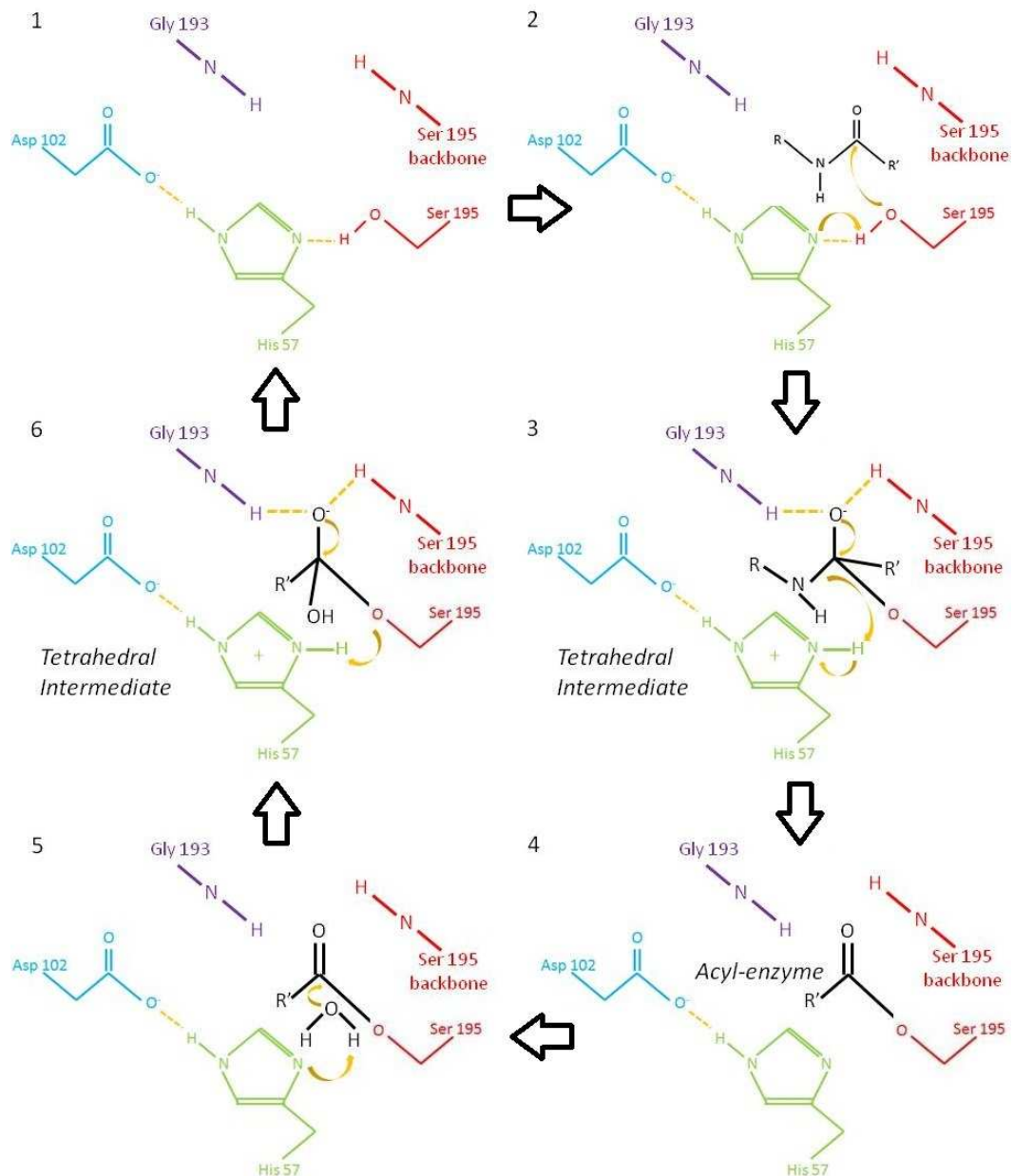


Figura 5 Mecanismo de catálise da quimi tripsina. Na ligação do substrato, His57 atrai o próton do grupo OH de Ser195 que lança um ataque nucleofílico no átomo de carbono terminal (passo 2). Um intermediário tetraédrico é formado e estabilizado por ligações de hidrogênio com o oxigênio da cadeia lateral de Gly193 e a cadeia principal do grupo NH de Ser195. A amida aceita um próton da His57 e se dissocia (passo 3). Depois da ruptura da ligação peptídica um intermediário acil-enzima é formado (passo 4). His57 recebe um próton da água que desloca a amina. O íon -OH resultante ataca o átomo de carbono no grupo acilo (Passo 5). O segundo intermediário tetraédrico é criado e estabilizado pelas mesmas ligações de hidrogênio, conforme descrito anteriormente (Gly 93 e Ser195). O oxigênio na cadeia lateral da Ser195 recebe um próton da His57 (passo 6). O grupo acilo se dissocia e a tríade catalítica é refeita (passo 1) (BERG et al., 2002).

Em 1986, foi isolada do veneno de *C.d.t.*, uma enzima tipo trombina (RAW et al., 1986), sendo esta caracterizada como uma fração farmacologicamente ativa. Quando inoculada em animais foi capaz de induzir alterações de equilíbrio, ocasionando giros aleatórios ao longo do eixo longitudinal do corpo (COHN; COHN, 1975; SEKI et al., 1980). Apresenta atividade coagulante do fibrinogênio no plasma de mamíferos, exercendo uma atividade trombina-símile e esterasica. (ALEXANDER et al., 1988). Proteína com massa molecular de 26,648 Da, com a presença da tríade catalítica comum as serino proteinases, Ser195, His57 e Asp102 (RAWLINGS; TOLLE; BARRETT, 2004).

Várias enzimas isoladas de venenos de serpentes clivam as moléculas de fibrinogênio encontradas no plasma, transformando-as diretamente em fibrina (BORTOLETO et al., 2002; SMOLKA et al., 1998). O agente principal do sistema fibrinolítico é a plasmina, a qual possui capacidade de degradação da rede de fibrina. Estas enzimas estão presentes em quantidades significativas dentro do veneno total de algumas serpentes e são consideradas por vários pesquisadores como importantes fatores tóxicos do veneno (PAWELEK et al., 2000). Elas mostram várias atividades farmacológicas e fisiológicas, sendo que uma delas é a agregação plaquetária (SUHR; KIM, 1996).

A giroxina, também conhecida por sua atividade enzimática trombina-símile. Atua sobre o fibrinogênio humano, clivando a região próxima ao N-terminal da cadeia A α do fibrinogênio, formando o fibrinopeptídeo A. No caso da trombina, ela produz o fibrinopeptídeo A e B, pois também cliva a cadeia B β . Os monômeros de fibrina resultantes polimerizam-se em uma rede que difere da produzida pela trombina. Esta rede é instável e mais susceptível a ação dos agentes fibrinolíticos (KOH; CHUNG; KIM, 2001). A incoagulabilidade sanguínea foi observada em casos de pacientes picados por serpentes da subespécie *C.d.t.*, esta reação é decorrente do consumo de fibrinogênio (BUCARETCHI et al., 2001).

Estudos com serino proteinases de veneno de serpentes (SVSPs), demonstraram que estas moléculas exibem características estruturais comuns a outras proteínas, como a tripsina e a trombina. Os venenos de serpentes apresentam diversas isoformas para serino proteinases. No entanto, devido ao elevado grau de identidade existente entre as SVSPs e suas isoformas, é complexo determinar os tipos de interações entre estas moléculas e seus substratos específicos, apenas com base em suas similaridades com outras enzimas (SERRANO; MAROUN, 2005). Estudos que buscam a investigação de estruturas proteicas tornaram-se fundamentais para a caracterização e diferenciação de novas SVSPs.

1.2.3 Crotoxina:

A Crtx, uma proteína com atividade neurotóxica e miotóxica, atua bloqueando a transmissão de impulsos nervosos na junção neuromuscular, através de uma ação pré-sináptica, inibindo a liberação de acetilcolina pelos impulsos nervosos, provocando paralisia motora e respiratória nos animais (FAURE; BON, 1988; FAURE et al., 1994; FAURE et al., 2003; VITAL BRAZIL, 1961). Wolz-Richter e cols. (2013) demonstraram que a Crtx apresenta uma potente atividade antinociceptiva, que se supõe ser mediada por ações sobre o sistema nervoso central. Os efeitos antinociceptivos da Crtx (45 µg / kg) foram verificados em rato através do aumento das latências de resposta em testes de *Hargreaves* e testes de retirada da cauda. De acordo com experimentos onde a Crtx foi testada para os efeitos antinociceptivos (pata direita) e os efeitos anti-hiperalgésico (pata esquerda), os resultados mostraram que a Crtx exibiu anti-hiperalgésica dominante, mas também efeitos antinociceptivos durante estímulos a dor (WOLZ-RICHTER; ESSER; HESS, 2013).

Crotoxina (Crtx) representa cerca de 50% do peso seco do veneno, é um complexo heterodimérico, composto por uma associação não covalente entre duas subunidades: uma subunidade ácida (CA ou crotapotina) composta por três cadeias (α , β e γ), com ponto isoelétrico (pI) de aproximadamente 3,4 e massa molecular de 4.372, 3.924 e 1.553 Da, respectivamente, uma subunidade básica (CB), composta por 122 resíduos de aminoácidos com pI de 8,6 e massa molecular de 14.199 Da (AIRD et al., 1986; HENDON; FRAENKEL-CONRAT, 1971; RUBSAMEN; BREITHAAPT; HABERMANN, 1971). A fração CA, denominada crotapotina, é ausente de atividade enzimática (HENDON; FRAENKEL-CONRAT, 1971), constituída por três cadeias polipeptídicas com 40, 35 e 14 resíduos de aminoácidos, ligadas por 7 pontes dissulfeto (AIRD; KAISER; BIEBER, 1985; AIRD; KAISER; LEWIS; et al., 1985; AIRD et al., 1990; BREITHAAPT; RUBSAMEN; HABERMANN, 1974). As cadeias da crotapotina foram sequenciadas pela primeira vez em 1985 (AIRD; KAISER; LEWIS; et al., 1985), indicando que a cadeia α apresenta uma sequência comum as fosfolipases de serpentes, com a presença do aminoácido Asp49 que está envolvido na ligação ao íon de cálcio. O segmento β , apresenta uma alta homologia com as PLA₂ de serpentes crotálicas, sendo esta região composta por cinco cisteínas altamente conservadas. Entretanto, a cadeia γ é a região com mais baixa homologia, quando comparado as PLA₂, porém, os dois resíduos de cisteína nesta sequência se mostram conservados (Figura 6). Duas isoformas de crotoxina B (CB1 e CB2) foram isoladas a partir de uma biblioteca de cDNA preparada a partir de uma única glândula de veneno de *C.d.t.* (FAURE et al., 1994). O sequenciamento dos aminoácidos destas duas isoformas mostraram que elas diferem em oito resíduos, resultando em diferenças em suas propriedades enzimáticas e farmacológicas

(FAURE et al., 1994). A isoforma CB1 pode se associar a qualquer isoforma de CA com alta afinidade, resultando em uma crotoxina mais tóxica, entretanto, a associação de CA com a isoforma CB2 demonstrou ser enzimaticamente menos ativa, apresentando um complexo menos estável (FAURE et al., 1994; FAURE et al., 1993). Quando da ligação da crotoxina aos seus alvos, o complexo CA/CB é desfeito, CB liga-se a membrana e CA é liberado em solução. Há dois modelos propostos para explicar o mecanismo molecular envolvido na ligação de CB à membrana: o da dissociação e o do complexo ternário. No primeiro, CA e CB dissociam-se antes da ligação de CB a seu sítio na membrana. Já o modelo do complexo ternário transiente, considera que a crotoxina liga-se à membrana antes da dissociação de CA (BON et al., 1979; BON; JENG, 1979; DELOT; BON, 1993; KRIZAJ et al., 1996). Independentemente de qual modelo seja formado, a reversibilidade da ligação CA/CB é de grande importância para a ação neurotóxica da Crtx, pois a conversão de um complexo dissociável para um não dissociável revoga completamente a sua neurotoxicidade (HENDON; TU, 1979; LENNON; PLUMMER; KAISER, 1990).

A Crtx é a principal fração do veneno de *C.d.t.* causando o bloqueio da transmissão de impulsos nervosos na junção neuromuscular (BRAZIL, 1966), resultando em paralisias motoras, um quadro clínico apresentado pelas vítimas. A junção neuromuscular é uma região especializada da fibra muscular, onde o impulso nervoso, ao atingir a terminação nervosa pré-sináptica, determina a sua despolarização e liberação do neurotransmissor de acetilcolina. A acetilcolina liberada combina-se com os receptores nicotínicos pós-sinápticos. Esta ligação está relacionada ao potencial da placa terminal que induz a contração muscular, ao atingir o limiar de excitabilidade desencadeia o potencial de ação muscular que se propaga ao longo dos túbulos "T". Para explicar a inibição da contração muscular pela crotoxina tem sido proposto um mecanismo de ação molecular envolvendo atividade pré-sináptica (BRAZIL, 1966) e pós-sináptica (BON et al., 1979). Na ação pré-sináptica, a crotoxina genericamente inibe a liberação do neurotransmissor de acetilcolina (BRAZIL; EXCELL, 1971; CHANG; LEE, 1977). Na ação pós-sináptica, atua bloqueando a resposta à acetilcolina através da estabilização do receptor de acetilcolina a um estado inativo (BON et al., 1979). O termo "molécula chaperona" ou simplesmente *chaperon* foi primeiramente empregado por Faure & Bon (1988). Para eles, a crotapotina funcionaria para prevenir a ligação não específica da PLA₂ com outros receptores biologicamente importantes e que não estão envolvidos em suas atividades fisiológicas, bem como farmacológicas (BON et al., 1979; BON; JENG, 1979). Slotta e Fraenkel-Conrat (1938) demonstraram que a Crtx é constituída por uma mistura de PLA₂ e crotopatina, estando também presentes no veneno individual de serpentes. Faure e

Bon (1987) identificara cerca de 15 isoformas de Crtx em vários lotes de veneno de *C.d.t.*, apesar de ser um número relativamente alto não é inesperado, sendo a Crtx formada pela associação aleatória das não idênticas subunidades A e B (FAURE; BON, 1987). A presença destas isoformas de Crtx resulta das diferentes combinações de suas subunidades. Faure e cols. (1993) analisaram 16 complexos de diferentes isoformas de Crtx formados após associação de isoformas de CA com isoformas de CB. Observou-se que a diferença entre as isoformas de Crtx é devida apenas à subunidade CB. As isoformas de CA no complexo podem ser trocadas sem qualquer mudança na toxicidade ou na atividade enzimática. Em contraste, as várias isoformas de CB formam duas classes farmacologicamente distintas de crotoxina. A primeira classe consiste de complexos altamente tóxicos e com baixa atividade enzimática, já a segunda classe é caracterizada por apresentar baixa toxicidade e alta atividade enzimática (FAURE; BON, 1988; FAURE et al., 1993). Com o uso de técnicas de purificação mais eficientes, Oliveira e cols e Toyama e cols. (2003) mostraram que as Crtxs de *C.d.t* são constituídas por uma mistura de duas ou mais isoformas de crotapotinas e três a quatro isoformas de PLA₂, que foram identificadas por técnicas enzimáticas e de sequenciamento de proteínas (DE OLIVEIRA et al., 2003; TOYAMA, M. H. et al., 2003). Em 2003, a estrutura cristalográfica da crotoxina B de *C.d.t.* foi elucidada (MARCHI-SALVADOR et al., 2008). A análise detalhada da estrutura cristalográfica e da disposição dos quatro monômeros que compõem a CB mostrou que o tetrâmero é formado pela associação de dois dímeros, os quais, por sua vez, são constituídos por dois monômeros, cada qual com uma isoforma da crotoxina B. A estrutura tetramérica da crotoxina B é formada pela associação dos dímeros A/C e B/D. A estabilização dímica entre as isoformas CB1 e CB2 é dada, respectivamente, pela interação entre o *loop* que antecede a β -*wing* e a região de ligação de Ca²⁺. No entanto, as regiões de ligação de íon Ca²⁺ dos monômeros A e D (isoforma CB2), não estão aptas a coordenar o íon Ca²⁺ pois, em ambos os monômeros, os resíduos Cys29, Gly30, Gly32 estão invertidos em relação aos mesmos resíduos dos monômeros B e C (isoforma CB1), monômeros aptos a coordenar o íon Ca²⁺. Dois resíduos estão envolvidos na estabilização da estrutura quaternária da CrtxB, sendo eles, Glu92 (CB1) e Ser1 (CB2) que se ligam entre si por pontes salinas duplas, em ambos os dímeros (MARCHI-SALVADOR et al., 2008). Essa conformação pode potencializar a atividade neurotóxica da CB através da criação de novos sítios de ligação, o que aumentariam a afinidade da CB com a membrana pré-sináptica (MARCHI-SALVADOR et al., 2008). Apesar disso, até pouco tempo atrás não se sabia como ocorria à interação da crotapotina com a crotoxina B, para a formação do complexo crotoxina. Recentemente, Faure e cols. (2011) elucidaram a estrutura da crotoxina

em complexo (CA+CB). Para a obtenção da estrutura cristalográfica, foram primeiramente separadas todas as isoformas e um novo complexo da Crtx foi formado, onde apenas uma isoforma de CB foi misturada com uma isoforma de CA, atuando como dímero (FAURE; XU; SAUL, 2011). A estrutura cristalográfica da crotoxina mostra a arquitetura da subunidade ácida, as três cadeias polipeptídicas interligadas por pontes dissulfeto (α , β e γ), complexada não covalentemente com a subunidade básica (PLA₂). A conformação estrutural da associação das subunidades CA e CB indica que a clivagem pós-traducional do precursor pro-CA é um pré-requisito para a montagem do complexo CACB. Estes estudos fornecem informações estruturais inovadoras para explicar o papel da subunidade CA no mecanismo de ação da Crtx. A estrutura cristalina do complexo CA2CBb, permitiu identificar os principais resíduos de aminoácidos responsáveis pelas diferenças significativas nas atividades farmacológicas das duas classes dos complexos da crotoxina. Em particular, mostrou-se que os resíduos Trp31 e Trp70 da subunidade CBb estabelecem contactos intermoleculares com Asp99 e Asp89, respectivamente, da cadeia β CA2 e contribui para a estabilidade e a toxicidade do complexo CA2CBb. Essas interações pode levar à diminuição da atividade PLA₂, bloqueando parcialmente o acesso do substrato a díade catalítica e mascarando vários resíduos na superfície de ligação interfacial, que são importantes para a interação da PLA₂ com fosfolípidios. Identificação da interface de ligação entre as subunidades CA e de CB é importante para a concepção de inibidores anti-neurotóxicos baseados na estrutura. Sabendo-se que a Crtx exibe várias funções fisiológicas, incluindo as propriedades anti-tumorais, o conhecimento da sua estrutura tridimensional, será útil para o entendimento destes efeitos diversos (FAURE et al., 2011).

1.2.4 Crotamina

Crotamina (Cro), um polipeptídeo neurotóxico de baixo peso molecular, foi isolada e caracterizada da peçonha de *C.d.t.*, (GONCALVES; DEUTSCH, 1956; GONCALVES; POLSON, 1947), *Crotalus durissus cascavella* (TOYAMA, O. D. et al., 2005) e *Crotalus durissus cumanensis* (PONCE-SOTO et al., 2007). Cro teve sua estrutura primária descrita por Laure em 1975 (LAURE, 1975), é um polipeptídeo composto por 42 aminoácidos e massa molecular aproximada 4.881 Da. Apresenta em sua composição nove lisinas e duas argininas, o que lhe confere uma característica extremamente básica, com pI de 10,3. Estruturalmente, a crotamina é estabilizada por seis cisteínas, formando três pontes dissulfeto nas posições, Cys4-Cys36, Cys11-Cys30, Cys18-Cys37 (Figura 7) (FADEL et al., 2005; LAURE, 1975;

NICASTRO et al., 2003). É um polipeptídeo pertencente à família de toxinas previamente designadas de miotoxinas (SBPM – *Small Basic Polypeptide Myotoxin*), cujos membros estão amplamente distribuídos nos venenos de serpentes do gênero *Crotalus* (OGUIURA; BONI-MITAKE; RADIS-BAPTISTA, 2005). A atividade biológica da Cro, dentro das miotoxinas, está caracterizada pela sua ação específica sobre a membrana muscular esquelética, responsável por causar danos ou a morte destas células. Esta ação ocorre através da dilatação do retículo endoplasmático rugoso e sua consequente degeneração. Isto é uma consequência da alteração provocada pela proteína no transporte de íons de sódio através da membrana da célula muscular. Na membrana celular e nas fibras do músculo esquelético, a Cro ativa canais de sódio quase que exclusivamente, induzindo um influxo desse cátion (SLOTTA, K. H.; FRAENKEL-CONRAT, 1938), o que provoca a excessiva retenção de água pelo retículo sarcoplasmático. A inabilidade da célula em regular seu equilíbrio osmótico leva à sua degradação (SLOTTA, K. H.; FRAENKEL-CONRAT, 1938). Em 1998, Mancin e cols. demonstraram a ação analgésica da Cro, observada primeiramente em ratos, sendo muito maior quando comparada a morfina (MANCIN et al., 1998).

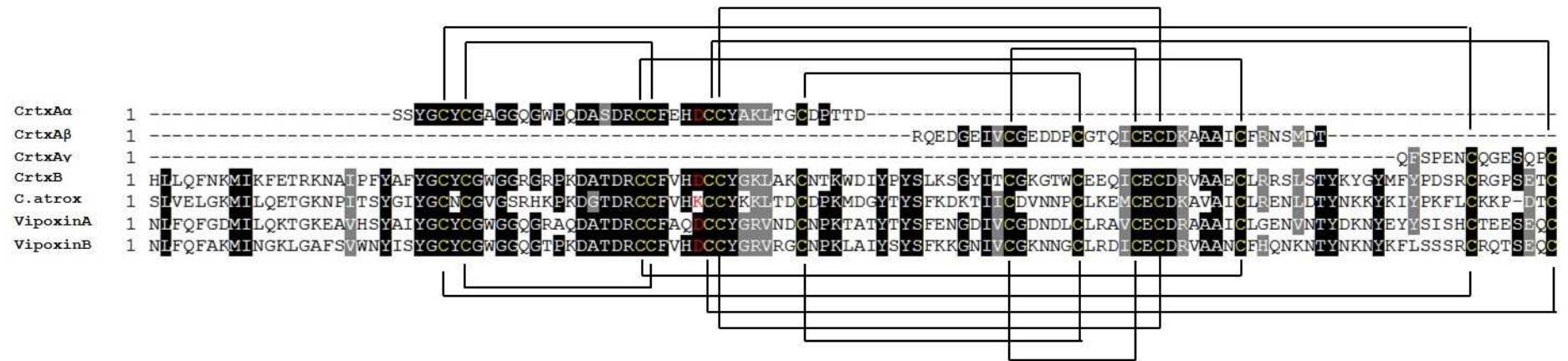


Figura 6 Alinhamento da cadeia ácida da Crtx com outras PLA₂, as linhas indicam a formação das pontes dissulfeto. No alinhamento é possível observar a alta homologia das três cadeias que compõem a cadeia ácida da Crtx (CrtxAα, β, γ), mostrando os resíduos de cisteínas altamente conservados e o resíduo Asp49 (vermelho), substituído pela Lys49 em *C. atrox*, responsável pela coordenação do íon de Ca²⁺.

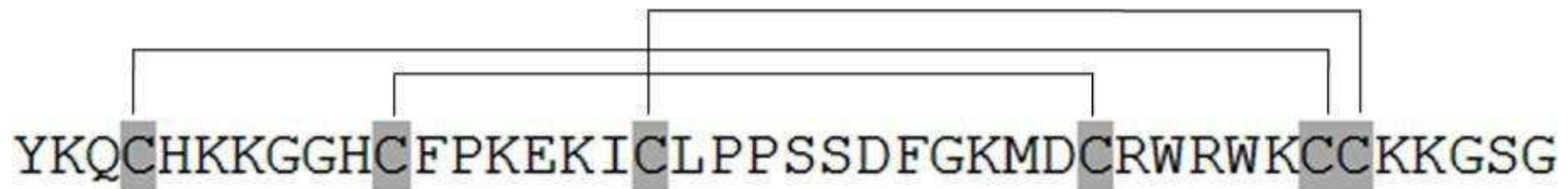


Figura 7 Estrutura primária da crotamina, as linhas indicam a ligação entre os pares de cisteínas envolvidas nas pontes dissulfeto.

1.2.4.1 Crotamina e defensinas

A Cro apresenta seis cisteínas responsável pela formação de três pontes dissulfeto (Figura 7) (BONI-MITAKE et al., 2001) e um grande número de isoformas tem sido caracterizadas (PONCE-SOTO et al., 2007; TOYAMA, M. H. et al., 2000). Apesar da baixa identidade na sequência primária, a crotamina apresenta uma estrutura tridimensional homóloga aos polipeptídeos antimicrobiais (AMPs) pertencentes à família das α -, β -defensinas e família das defensinas provenientes de insetos (*Dimarcq et al., 1998*). Possuem o mesmo número de pontes dissulfeto (HOOVER; CHERTOV; LUBKOWSKI, 2001) e é uma classe de peptídeos ricos em lisina e argininas (NICASTRO et al., 2003; YOUNT et al., 2009). Apesar das diferenças na composição dos aminoácidos, a crotamina apresenta o mesmo *scaffold* que as α - e β -defensinas de mamíferos (GANZ et al., 1985). Funcionalmente, as defensinas apresentam um amplo espectro de atividade e desencadeiam diversos efeitos. Alguns desses peptídeos apresentam atividades anti-bactérias Gram-positiva e participam em reações de defesa antibactérias (COCIANCICH; GHAZI; et al., 1993; COCIANCICH; GOYFFON; et al., 1993).

1.2.4.2 Atividade farmacológica da crotamina

Ao longo dos anos, a Cro tem sido estudada em seus diferentes aspectos biofísicoquímicos. Afeta o funcionamento dos canais de sódio do tecido muscular esquelético, induzindo um influxo de sódio, resultando numa despolarização e contração do músculo esquelético, que é antagonizada pela tetrodotoxina ou por concentração reduzida de Na^+ (CHEYMOL et al., 1971). Essa despolarização e contração muscular, induz a lesão e necrose caracterizadas pela extensa vacuolização do retículo sarcoplasmático e ruptura dos filamentos de actina e miosina (GUTIERREZ; CERDAS, 1984; OWNBY; AIRD; KAISER, 1988). Este polipeptídeo tem atividade miotóxica e faz com que ocorra a paralisia dos membros posteriores de ratos em menos de 15 minutos, quando injetados por via intraperitoneal (RIZZI et al., 2007). Em contrapartida, estudos de *Patch clamp* demonstraram que a Cro não atua em canal de sódio dependente de voltagem ($\text{Na}(v)$), entretanto, exerce sua ação provocando espasmos rápidos do tipo muscular, indicando que os canais de sódio não estão envolvidos na ação da Cro ou não são os principais alvos da mesma. Essa contradição sobre a ação farmacológica da crotamina prossegue sendo uma interrogação. Estudos recentes demonstram a comparação da interação da Cro e β -defensinas-2 humanas (hBD-2), com canais de potássio dependentes de

voltagem (Kv) em células procarióticas e células eucarióticas. Eles chegaram à conclusão que a crotamina obstrui os canais Kv em células eucarióticas, mas não em células procarióticas (YOUNT et al., 2009). Além disso, a crotamina age sobre os mastócitos, causando degranulação e consequente liberação de histamina (MANCIN et al., 1998). Apresenta também atividade contra as bactérias e fungos patogênicos (OGUIURA et al., 2011). De fato, a inibição de canais Kv1.3, como demonstrado por Peigneur e cols. (2012), contribuiu para o esclarecimento das propriedades anti-tumorais da Cro (PEIGNEUR et al., 2012).

1.2.4.3 Atividade antimicrobiana (AMP) e célula-penetrante (CPP) da crotamina

Peptídeos antimicrobianos são muito diversificados em relação à sequência de aminoácidos e à estrutura secundária, mas compartilham certas propriedades, tais como: afinidade para os fosfolípidios carregados negativamente, que estão presentes na superfície da membrana citoplasmática de muitas espécies microbianas. Peptídeos antimicrobianos (AMPs – *Antimicrobial Peptides*) representam uma nova classe de antibióticos. Muitos pesquisadores têm contribuído para a compreensão da relação estrutura-atividade dos AMPs (ALI et al., 2009; AVRAHAMI; OREN; SHAI, 2001). A maioria dos AMPs tem como alvo a membrana celular bacteriana, estas atacam a membrana celular sem a necessidade de receptores específicos e, portanto, tornam-se uma abordagem ideal para transpor o problema da resistência bacteriana, resultante de mutações. Mais de 1000 AMPs foram descobertos em diferentes organismos, desde insetos até seres humanos, apresentando atividade antimicrobiana (WANG et al., 2009). Além disso, peptídeos que demonstram a capacidade de se translocar em membranas celulares e entrar nas células, são chamados de peptídeos célula-penetrantes (CPP - *Cell penetrating peptides*). Os CPPs podem variar em relação à carga e ao tamanho das sequências de aminoácidos. Comumente, os CPPs apresentam sequências catiônicas e anfipáticas (moléculas que apresentam uma região hidrofílica (solúvel em meio aquoso), e uma região hidrofóbica), ricas em resíduos de aminoácidos básicos (lisina e arginina) (KERKIS, A. et al., 2006; RODRIGUES et al., 2012). As características estruturais dos CPPs possibilitam que estes atravessem a membrana celular, por translocação ou endocitose, localizando-se em organelas específicas e/ou no núcleo (Figura 8) (KERKIS, A. et al., 2006; LEE et al., 2011; LUNDBERG; LANGEL, 2003).

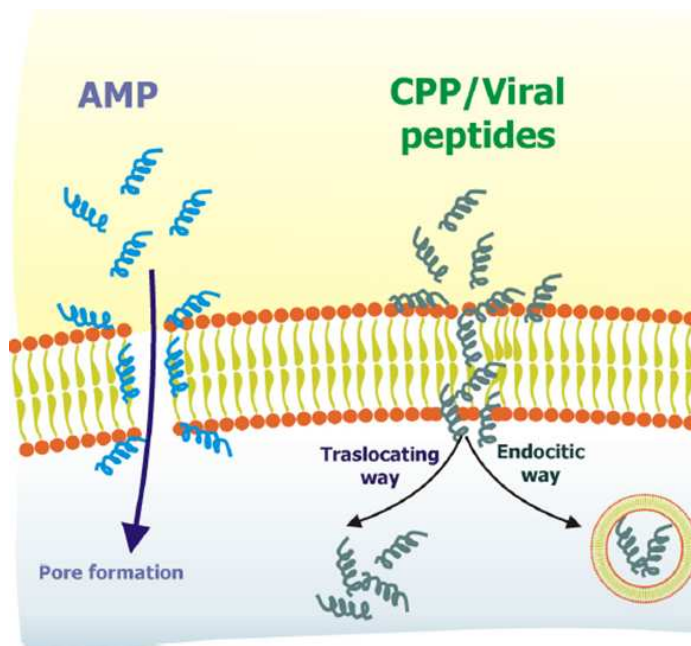


Figura 8 Mecanismo de translocação através de membranas biológicas. Dependente da composição, carga e estrutura, diferentes peptídeos desempenham diferentes mecanismos de interação com a membrana (GALDIERO et al., 2013).

Nos últimos anos, a Cro vem apresentando um grande potencial com relação a sua atividade de penetração em células eucarióticas (CPP - *Cell penetrating peptides*), através da entrega de drogas e agentes anti-cancerígenos (bioativos) (KERKIS, A. et al., 2004; KERKIS, I. et al., 2010). Kerkis e cols. (2004) relataram que a crotamina possui intrinsecamente todas as propriedades funcionais apresentadas pelos CPPs. Além disso, foi observado que este polipeptídeo apresenta propriedades adicionais, tais como: capacidade de penetrar de forma eficiente e seletiva no interior de células em proliferação ativas; peculiar capacidade de interação com algumas estruturas subcelulares e subnucleares (KERKIS, A. et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2007). A crotamina, quando adicionada ao meio de cultivo em concentrações não tóxicas é capaz de penetrar em pelo menos três tipos celulares (fibroblastos primários, linfoblastos humanos e células tronco embrionárias murinas) em apenas cinco minutos (KERKIS, A. et al., 2006).

Todos os peptídeos célula penetrante podem transportar drogas para dentro das células de mamíferos, sem a necessidade de receptores específicos. CPPs também pode mediar à entrega de moléculas bioativas *in vitro* e *in vivo*, proporcionando uma vantagem adicional para a aplicação teranóstica (processo de terapia de diagnóstico para doentes individuais, a chamada medicina personalizada) (LEE et al., 2011).

Apesar da similaridade sequencial, os CPPs podem apresentar mecanismos de ação bastante distintos (Tabela 1). Esta diversidade estrutural resulta em diferentes modos de captação, e diferentes níveis de absorção, dependendo da linhagem celular, e outras condições. Endocitose e translocação direta através da membrana celular, são os principais mecanismos utilizados pelos CPPs para a entrada na célula (MADANI et al., 2011).

Tabela 1 Comparação sequencial de peptídeos célula penetrante.

Peptídeos	Sequências	Referência
Tat (2005)	PGRKKRRQRRPPQ	(SNYDER; DOWDY,
Penetratin (PROCHIANTZ, 2004)	RQIKIWFQNRRMKWKK	(JOLIOT;
Transportan (et al., 1998; POOGA; LINDGREN; et al., 1998)	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL	(POOGA; HALLBRINK;
Crotamine (2004)	KQCHKKGGHCFPKEKIC KMDCRWRWKCKK	(KERKIS, A. et al.,
H-lactoferrin (MCGHEE, 1977)	KCQWQRNMRKVRGPPVSCIKR	(ARNOLD; COLE;

TAT (*viral protein transactivator of transcription, de HIV-1*); Penetratin (*Homeodomain*); Transportan (*Galanin-mastoparan*); Crotamine (*SV-CPP*); H-lactoferrin (*Human lactoferrin protein*). Crotamine: duas prováveis sequencias com função célula-penetrante.

1.2.4.4 Modelo tridimensional por NMR

Nicastro e cols. (2003) apresentaram uma estrutura tridimensional da Cro resolvida por 1H-NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*), composta por três segmentos de folha β e a região N-terminal estruturada como α -hélice, interligados por estruturas aleatórias (NICASTRO et al., 2003). Fadel e cols. (2005), utilizando a técnica de NMR apresentaram resultados coincidentes (FADEL et al., 2005), mas com algumas diferenças em comparação com a estrutura proposta por Nicastro e cols. (2003), embora em condições amostrais diferentes. Tais diferenças se mostram relevantes, sobretudo em relação à estrutura secundária, uma vez que na estrutura publicada por Nicastro, a crotamina apresenta topologia do tipo $\alpha\beta_1\beta_2\beta_3$. Já no trabalho de Fadel, a topologia proposta foi do tipo $\alpha\beta_1\beta_2$.

2. OBJETIVOS

Objetivos Específicos:

- Purificar, cristalizar as frações crotoxina, giroxina e crotamina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*.
- Determinação estrutural pela técnica de raios-X das proteínas crotoxina, giroxina e crotamina.

Objetivos Gerais:

O trabalho aqui apresentado teve como objetivo a caracterização estrutural por cristalografia de raios-X da crotoxina, giroxina e da crotamina. Apesar destas proteínas terem sido isoladas há anos, a cristalização das mesmas tem sido extremamente recalcitrante, provavelmente devido à alta flexibilidade intrínseca, como confirmado por estudos de NMR (ENDO et al., 1989; FADEL et al., 2005; NICASTRO et al., 2003) no caso da crotamina, e a presença de muitas isoformas, etc..

O objetivo geral com efeito de longo termo é a determinação da estrutura tridimensional por cristalografia de raios-X, gerando informações estruturais que guiará na otimização, podendo ser utilizável para melhor entender suas estereo/enantioespecificidade, permitindo assim estudar as interações com substratos e futuramente o desenho de moléculas com alta especificidade em vias e processos biológicos.

Para atingir o objetivo proposto foi necessário o aprendizado de técnicas de biofísica e bioquímica, que envolveram: purificação, cristalização, difração de raios-X, SAXS, DLS, CD, entre outras.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Peçonha

Toda a peçonha foi fornecida pelo Serpentário CEVAP (Centro de Estudos de Venenos) na cidade de Botucatu-SP. A peçonha bruta cristalizada foi estocada a -20 até o momento de uso.

3.2 Protocolo de purificação

3.2.1 Cromatografia de troca iônica

Cerca de 150 mg do veneno bruto liofilizado de *C. d. terrificus* foram suspensos em 1,5 ml de tampão ácido acético (CH₃COOH) 0,05 M, pH 5,0 e centrifugados a 10.000 x g, durante 10 min, a 4 °C. O sobrenadante foi submetido à cromatografia de troca iônica. Uma resina de troca catiônica (MonoS HR 10/10, GE Healthcare), com volume de coluna (VC) de 8 ml foi usada para purificação. A fase móvel utilizada constituiu-se de tampão ácido acético 0,05 M, pH 5,0 (eluente A) e NaCl 1 M em ácido acético 0,05 M, pH 5,0 (eluente B). Para a cromatografia utilizou-se um gradiente não linear de 0 a 100% de eluente B. A cromatografia foi feita a 4 °C no sistema Äkta FPLC (GE - *Healthcare Life Sciences*) e a absorbância monitorada a 280 nm, frações de 1,0 ml foram coletadas.

A fração obtida na etapa de purificação cromatográfica teve sua massa molecular estimada e avaliada quanto à homogeneidade por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE). A eletroforese foi realizada segundo o método de Laemmli (1970) com pequenas modificações em gel de poliacrilamida 15%, em condições desnaturantes, utilizando o detergente duodecil sulfato de sódio (SDS), na presença e na ausência do agente redutor ditioneitol (DDT). Amostras centrifugadas foram aplicadas no gel que estava inserido em um sistema eletroforético (Hoefler Inc, USA), abastecido com tampão SDS de corrida. As proteínas usadas como padrão de massa molecular foram: beta-galactosidase (116 kDa), BSA (66,2 kDa), Ovoalbumina (45,0 kDa), lactato desidrogenase (35,0 kDa), REase Bsp98I (25,0 kDa), beta-lactoglobulina (18,4 kDa) e lisozima (14,4 kDa).

A eletroforese foi efetuada sob uma tensão de 120 V para a separação das amostras durante a migração no gel de empilhamento, e posteriormente teve sua tensão ajustada para 180 V para a migração das amostras no gel de resolução.

3.3 Coloração em comassie do gel SDS-PAGE

Após o término da eletroforese, a presença das bandas proteicas foi detectada com a revelação do gel em uma solução de corante *Comassie Brilliant blue 250 R*, por pelo menos 60 minutos. Em seguida, para a visualização das bandas das proteínas, o gel foi incubado em uma solução descolorante (ácido acético 7%), por aproximadamente 120 minutos.

3.4 Determinação da massa molecular por espectrometria de massa

A determinação da massa molecular relativa foi conseguida em colaboração com o Dr. Hartmut Schlüter, pesquisador do Centro Médico Eppendorf (*University Medical Center Hamburg-Eppendorf*- Alemanha). Para a determinação da massa da proteína, o protocolo a seguir foi aplicado e analisado no instrumento MALDI-TOF - *UltrafleXtreme instrument (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha)*.

Preparação da amostra para espectrometria de massa:

- 2 µl de TFA a 2% em um tubo *Eppendorf* (0,5 ml)
- Adicione 2 µl da amostra
- Adicione 2 µl da solução preparada DHAP (7,6 mg DHAP (*Dihydroxyacetophenone*) Em 375 µl Etanol)
- Esfregar com a ponta da pipeta na parede do tubo de *Eppendorf* para induzir a cristalização até que a solução tenha uma aparência leitosa.
- Pipetar 1 µl da mistura sobre a placa alvo, e esperar secar.

3.5 Dosagem proteica

A determinação da concentração proteica da Cro foi realizada a partir do valor teórico do coeficiente de extinção (ϵ) obtido no *Expasy*, usando-se um espectrofotômetro (Nanodrop 2000c (ThermoScientific, Peqlab, Alemanha). Este aparelho quantifica a concentração de proteínas de acordo com a lei de *Lambert-Beer*

$$A_{280} = \epsilon * b * c$$

Onde A_{280} é a absorvância á 280 nm (corresponde ao pico de absorção de UVs da Cro), ϵ o coeficiente de extinção (que para a Cro é igual a 12.865), b comprimento do percurso no espectrofotômetro (correspondente a 1 cm) e C é a concentração da Cro em mg/mL.

3.6 Concentração das proteínas crotoxina, giroxina e crotamina

As amostras da Crtx, giroxina e Cro foram concentradas em microconcentradores Amicon (*cut-off* 10.000 e 3.000 Da, Millipore) em TrisHCl 0,1 M, pH 7,0 e HEPES 0,1 M, pH 7,0 e água ultra-pura, respectivamente.

3.7 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

DLS (*Dynamic Light Scattering*) foi usado com o intuito de analisar a dispersividade da solução. Em preparação para ensaios de cristalização, amostras previamente purificada foram centrifugadas a 10.000 x g a 4 °C por um período de 60 a 120 minutos e 10 µl da amostra foi transferido para uma cubeta óptica.

3.8 Métodos para análise da estrutura tridimensional

O processo de cristalização é de natureza empírica, ou seja, a obtenção de monocristais para estudos estruturais através de difração de raios-X passa pelo teste de diversas soluções, com a utilização de diferentes tampões, agentes precipitantes e sais (BERGFORS, 1999). Para a otimização deste processo, foram desenvolvidos *kits* comerciais que constituem em conjuntos limitados de soluções, considerando a combinação de diferentes agentes precipitantes e pHs. Existem diversas variáveis que podem ser exploradas na etapa de cristalização, como a presença de aditivos, a concentração da proteína, variação do pH e temperatura.

3.9 Preparação da amostra e cristalização

Ensaio preliminares foram realizados através do *kit* de pré-cristalização (*Pre-Crystallization Test* – Hampton Research, USA) com o intuito de determinar a concentração da proteína mais

favorável para a cristalização, os testes foram realizados de acordo com o protocolo do fabricante.

Depois da purificação das proteínas, as amostras da crotoxina, giroxina e crotamina foram concentradas até 6, 10 e 22 mg/ml, respectivamente e centrifugadas a 10.000 x g por 60 minutos (Crtx e giroxina) e 120 minutos para a Cro.

A triagem para obter as condições iniciais de cristalização foi realizada aplicando a pipetagem com o robô *Honeybee* 961 (Genomic Solutions, UK). Proteína e solução precipitante foram transferidas para placas de 96 poços (*Nextal Qial* - Qiagen, Alemanha). Os *screens* disponíveis comercialmente JCSG⁺, Classic, AmSO₄ e Compas Suite (todos Qiagen, Alemanha) foram usados. 300 nl da solução de proteína foram misturados com 300 nl da respectiva solução precipitante para cada um dos 96 poços, o reservatório foi preenchido com 55 µl de solução precipitante. As placas foram seladas e armazenadas a 17 °C, sendo monitoradas a cada sete dias para identificar sucessos de cristalização.

3.10 Otimização das condições iniciais de cristalização

A observação de material cristalino em alguma das condições, mesmo que de tamanho e morfologia inadequados, é ponto de partida para que monocristais apropriados aos experimentos de difração sejam obtidos. Algumas condições promissoras foram obtidas a partir dos *kits* de cristalização e o refinamento consistiu na variação da concentração do agente precipitante, do sal, da proteína e do pH do tampão.

Condições iniciais foram otimizadas em placas CPL-130 (JenaBioscience, Alemanha), aplicando difusão de vapor por gota suspensa, que consiste de 1-2 µl de solução de proteína e 1-2 µl de solução precipitante e o reservatório preenchido com 500-1000 ml de solução precipitante. As condições de temperatura também foram monitoradas e placas foram estocadas a 4 °C ou 20 °C, em uma incubadora livre de vibração (Rubarth, Alemanha) ou a 14 °C em um laboratório com ar condicionado.

Uma única condição inicial fornece várias oportunidades de otimização. Geralmente, técnicas de difusão de vapor por gota sentada e gota suspensa são as mais aplicadas, mas técnicas de cristalização debaixo de óleo ou técnica de *seeding* têm sido consideradas.

Microseeding é uma poderosa ferramenta para evitar a nucleação espontânea e refinar a qualidade do cristal. Uma solução estoque (*seedstock*) foi preparada com um dos cristais iniciais numa solução estabilizadora, utilizando um tubo eppendorf com uma micro-esfera de vidro, de acordo com o protocolo do fornecedor (Jena BioScience, Alemanha). *Seedstock* foi

diluído 1:10 - 1:10.000 com solução proteica contendo metade da concentração de proteína em que o cristal triturado foi obtido (metade da concentração da proteína em comparação com as condições iniciais de cristalização).

3.11 Metais pesados

Primeiramente, foi realizada uma triagem para derivados de átomos pesado. Em muitos casos é necessária a avaliação de muitos (25 a 75) compostos derivados de átomos pesados. Triagem e paciência é uma parte essencial da derivatização por átomo pesado.

A primeira pergunta que fizemos foi: Qual átomo pesado usar?

É preciso ter a certeza de escolher átomos pesados que garantam uma diferença no padrão de difração, devido ao átomo pesado ser maior do que os erros na coleta de dados. O número atômico do átomo pesado e o número dos sítios de derivatizados necessários para o êxito do faseamento são proporcionais à massa molecular da macromolécula. Macromoléculas maiores podem exigir átomos pesados de número atômico superior e mais de um átomo pesado por molécula. Alguns fatores a serem levados em consideração são:

Composição dos aminoácidos:

- Ausência de resíduos de cisteínas livres ou histidinas: Não usar derivados de mercúrio (Hg).
- Distribuição normal de aminoácidos: Platina (Pt) que se liga principalmente a resíduos de metionina, histidina e cisteínas.
- Resíduos carregados positivamente: $\text{Pt}(\text{CN})_2$.
- Resíduos de cisteínas e histidinas livre: Hg.

Existem dois métodos básicos para a obtenção de cristais derivados de átomos pesados, a co-cristalização e o *soaking*, foram utilizados neste trabalho e são descritos brevemente a seguir.

Co-cristalização: a solução contendo o átomo pesado escolhido é adicionada a gota de cristalização em uma determinada proporção. O objetivo é que os átomos pesados incorporem-se a regiões específicas da proteína durante o processo de cristalização.

Soaking: consiste em mergulhar o cristal da proteína em uma solução contendo uma determinada concentração de átomos pesados. O objetivo é que tais átomos difundam-se pelos canais de solvente, incorporando-se à rede cristalina.

Inicialmente, os experimentos são realizados alterando-se a concentração dos sais de átomos pesados e o tempo de imersão. Para cada cristal de proteína, necessita-se otimizar estes parâmetros. Outra maneira de se utilizar o método de *soaking* é através da técnica chamada

quick-cryo-soaking onde o átomo pesado é adicionado na própria solução crio-protetora onde o cristal é mergulhado. A diferença para o método de *soaking* tradicional é que o período de tempo em que os cristais são deixados na solução com átomos pesados são menores, e as concentrações utilizadas são maiores (NAGEM; DAUTER; POLIKARPOV, 2001).

Inúmeros experimentos foram realizados na tentativa de obtenção de cristais derivados de átomos pesados, a partir da análise sequencial da proteína (YKQCHKKGGHCFPKEKICLPPSSDFGKMDCRWRWKCKKGS). Em particular, para os experimentos de *soaking* foram utilizados os seguintes compostos, como demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2 Compostos derivados de átomos pesados utilizados nos experimentos de *soaking*.

Nome	Fórmula
Platina (Pt)	
Tetracloroplatinato de potássio	K_2PtCl_4
Tetracloroplatinato de amônio	$(NH_4)_2PtCl_4$
Hexacloroplatinato de potássio	K_2PtCl_6
Hexaiodoplatinato de potássio	K_2PtI_6
Mercúrio (Hg)	
Cloreto de Mercúrio II	$HgCl_2$
Acetato de Mercúrio II	$Hg(OOCCH_3)_2$
Tetraiodomercurato de potássio	$K_2(HgI_4)$
Cloreto de etil-mercúrio	C_2H_5HgCl
Brometo de Mercúrio	$HgBr_2$
Iodeto de Mercúrio	HgI_2
Sumário (Sm)	
Hexahidratocloreto de sumário (III)	$SmCl_3$
Hidratoacetato de sumário (III)	$Sm(O_2C_2H_3)_3$
Hexahidratonitrato de sumário (III)	$Sm(NO_3)_3$
Ouro (Au)	
Cloreto de ouro (III)	$AuCl_3$
Ácido cloroáurico	$HAuCl_4$

Muitos dos compostos de átomos pesados testados, não são solúveis na solução de cristalização. Assim, a estratégia adotada, foi transferir os cristais para gotas de soluções com átomos pesados.

Para os experimentos de *quick-cryo-soaking* foram utilizados os seguintes compostos descritos na Tabela 3.

Tabela 3 Compostos derivados de átomos pesados utilizados nos experimentos de *quick-cryo-soaking*.

Nome	Fórmula
Triiodeto de potássio	KI ₃
Tribrometo de carbono	Br ₃ C
Triiodeto de carbono	I ₃ C (<i>Magic Triangle</i>)
Brometo de sódio	NaBr
Brometo de tântalo (<i>Cluster</i>)	T ₆ Br ₁₂

As concentrações de átomos pesados, tipicamente usadas nos experimentos de *quick-cryo-soaking* foram de 50 mM a 500 mM durante 30 a 60 segundos. Além dos métodos clássicos de co-cristalização e *soaking*, a técnica de marcação de vaporização de iodo (VIL-*Vaporizing Iodine Labelling*), foi utilizada neste trabalho (Figura 9). O método, recentemente descrito por Miyatake e cols. (2006), consiste em posicionar uma pequena gota de uma solução contendo KI/I(2) ao lado da gota de cristalização que apresenta os cristais (MIYATAKE; HASEGAWA; YAMANO, 2006). O KI/I(2), devido à sua grande volatilidade, estará presente em forma gasosa no ambiente do poço, e pode incorporar-se à gota de cristalização e difundir-se pelos cristais. O iodo liga-se preferencialmente a cadeias laterais de tirosinas, que podem tornar-se mono- ou di-iodinizadas (MIYATAKE et al., 2006). Em segundo lugar, quando a iodação apresentou-se insuficiente, a técnica de peróxido de hidrogênio VIL Hyper-VIL - (*Hydrogen Peroxide VIL*) foi aplicada para aumentar ainda mais a razão de difusão, realizada através da adição de uma pequena gota de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) ao lado da gota de cristalização. O H₂O₂ também se difunde para a gota de cristalização para potencializar o processo de difusão. Um problema observado frequentemente nos experimentos para incorporação de átomos pesados, é que os cristais submetidos ao processo de *soaking* podem sofrer danos micro ou macroscopicamente. O processo de *soaking* causa, muitas vezes, a completa dissolução do cristal.

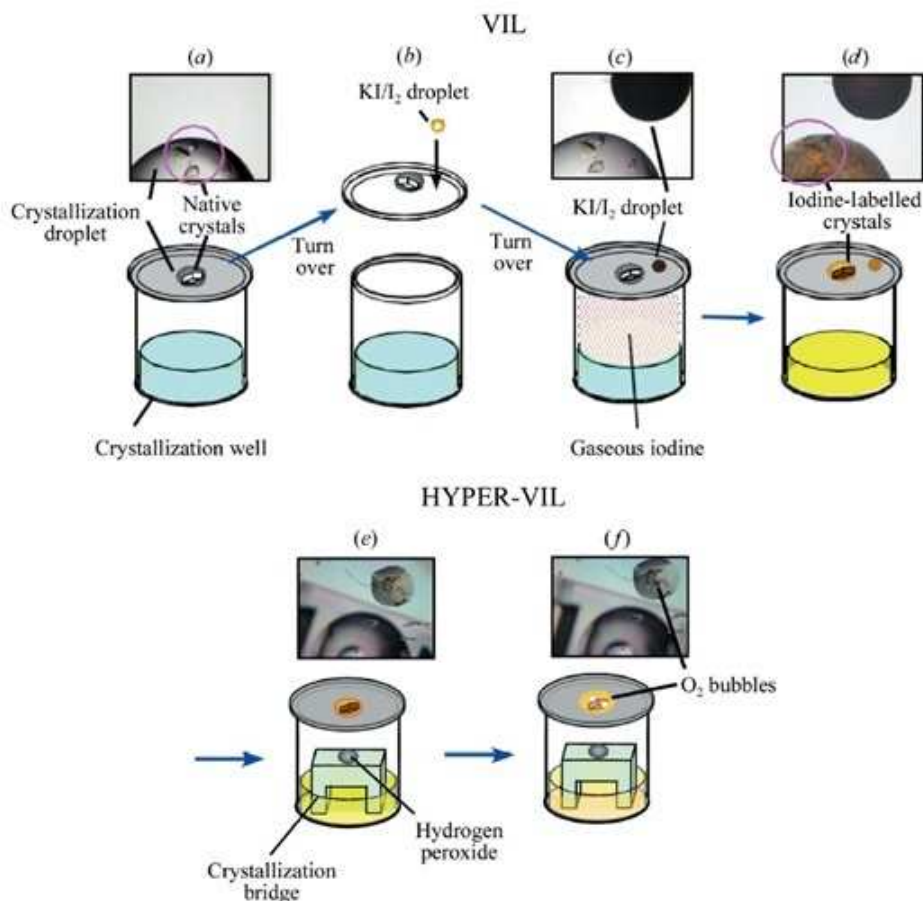


Figura 9 Desenho esquemático de VIL (*Vaporizing Iodine Labelling*) e HYPER-VIL procedimentos aplicados aos cristais representativos. (a) Os cristais nativos são preparados pelo método de difusão de vapor, gota-suspensa. (b) Uma pequena gota de solução de iodo é colocada junto da gota de cristalização. (c) Moléculas de I₂ rapidamente difundem-se por toda a gota de cristalização. (d) Depois da incubação, os cristais se apresentam com uma coloração marrom escuro. (e) A técnica HYPER-VIL emprega uma gotícula adicional (~ 1,0 µl) de 30 % de H₂O₂ colocado em um pequeno cavalete (*bridge*) de cristalização. A gota de H₂O₂ será introduzida no cristal, após a mudança na coloração dos cristais através da aplicação de VIL, ou o peróxido de hidrogênio redissolve moléculas de I₂ na gotícula de iodo, o qual diminuirá a quantidade de difusão do I₂. (f) Como resultado da reação HYPER-VIL, a geração de bolhas de oxigênio e do branqueamento da cor castanha são observados na gotícula de cristalização, os quais são bons indicadores de iodação (MIYATAKE et al., 2006).

3.12 Coleta de dados usando radiação sincrotron

Consórcio *beamline* X12, X13 (HASYLAB/DORISIII/DESY) e P14 (HASYLAB/PETRAIII/DESY) na Alemanha, foram utilizados para a caracterização dos cristais obtidos através da coleta de diversos conjuntos de dados. A crio-proteção foi avaliada com a exposição do *loop*, contendo uma gota da solução de cristalização, posicionada diretamente a uma corrente de nitrogênio. Quando ocorreu a formação do gelo, o glicerol foi adicionado à gota de cristalização ou,

cristais foram mergulhados em uma solução crio-protetora e incubados durante cerca de 30 segundos. Os cristais foram montados com *loops* de nylon ou *loops Micromount* (Mitegen, EUA), e *flash frozen* em uma corrente de nitrogênio gasoso. Os dados de difração de raios-X dos cristais da proteína crotamina (conjunto nativo) foram coletados na linha de luz P14 (Hasylab/PetraIII/DESY), na cidade de Hamburgo, Alemanha, um detector CCD foi utilizado para registro dos dados de difração. Os cristais foram mantidos a 100K durante a coleta de dados utilizando-se um “soprador” de nitrogênio gasoso. Os dados de difração de raios-X dos cristais da proteína marcada com metais pesados foram coletados na linha de luz X12 do *Deutsches Elektronen-Synchrotron* (Hasylab/DorisIII/DESY, Alemanha) utilizando um detector MAR-225. Os dados de difração para os cristais da crotoxina e da giroxina foram coletados na linha de luz X13 (Hasylab/DorisIII/DESY, Alemanha) utilizando um detector MAR165. Na linha de luz X12, X13 e P14, a coleta de dados foi conduzida pelo pacote de programas DNA.

3.13 Processamento dos dados e construção do modelo

Os dados nativos, tanto como os dados com metais pesados foram processados utilizando-se o programa HKL2000/Denzo ou *iMOSFLM* (BATTYE et al., 2011; OTWINOWSKI; MINOR, 1997), para as etapas de escalonamento foram utilizados os programas SCALA ou SCALEPACK (COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, 1994).

Para análise dos dados e refinamento da estrutura, programas provenientes do pacote de programas CCP4 (COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, 1994) ou PHENIX (ADAMS et al., 2002) foram aplicados. Construção do modelo foi realizada usando o programa COOT (EMSLEY; COWTAN, 2004).

3.14 Difração anômala

Como alternativa às técnicas de substituição molecular, aplicou-se o método de difração anômala. Cristais complexados com metais pesados foram requeridos para a determinação da estrutura da crotamina pelo método de cristalização. Cristais pertencentes ao grupo espacial $I2_12_12_1$, foram imersos em soluções contendo metais pesados por um período entre 30 minutos a 36 horas, depois, diversos conjuntos de dados de difração de raios-X do cristal da proteína marcada com metais pesados foram coletados em condições criogênicas e processados como descrito acima. A busca resultou na presença adequada do metal pesado,

com a presença de um pico no mapa de *Patterson* do hexacloroplatinato de potássio (K_2PtCl_6), o qual foi possível de ser utilizado nos experimentos de MAD (*Multiwavelength Anomalous Dispersion*) e SAD (*Single-wavelength Anomalous Diffraction*). Para a coleta de dados para o experimento de MAD, o cristal foi imerso em uma solução contendo 0.1 M de (K_2PtCl_6) por um período de 12 e 24 horas e subsequentemente mantido a 100 K usando 20 % de glicerol como crio-proteção.

3.15 Coleta de dados MAD e determinação da estrutura pela metodologia SAD e refinamento da estrutura

Os dados para o experimento MAD foram coletados na linha de luz PetraIII no DESY (Hasylab/Hamburgo, Alemanha). Os comprimentos de ondas selecionados foram (1) espalhamento anômalo do pico; (2) ponto de inflexão do espalhamento anômalo e (3) remoto de baixa energia. Entretanto, os dados anômalos do pico foram suficientes para a determinação de fases através da técnica de SAD. Os conjuntos de dados foram processados e escalonados como descritos anteriormente.

3.16 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

Para a análise através da técnica de SAXS, pelo menos três diferentes diluições da proteína foram necessárias, 1 a 10 mg/ml, tipicamente, 1, 2, 5 e 9,7 mg/ml foram preparadas e centrifugada a 15.000 x g por 60 minutos a 4 °C. Dados de DLS foram analisados para monitorar a dispersividade da solução. Somente soluções monodispersas foram usadas para a coleta de SAXS na linha de luz P12 (EMBL/PetraIII, Alemanha) a 295 K, com uma distância do detector de 2,1 m e um comprimento de onda de 1,5 Å. Todos os conjuntos de dados foram normalizados para a intensidade do feixe incidente e corrigidos para a resposta do detector usando o pacote de programas ATSAS (PETOUKHOV et al., 2007).

3.17 Modelagem molecular por homologia da giroxina

3.17.1 Busca por moldes

Nesta etapa, foi adquirida a sequência primária da proteína alvo (B0FXM1) no banco de dados *Expasy*. Através da ferramenta *BlastP*, foi realizada a busca por proteínas homólogas

com estrutura tridimensional resolvida e as sequências que apresentaram média e alta identidade foram selecionadas. A estrutura correspondente a proteína C da serpente *Agkistrodon contortrix contortrix* (2AIP) foi selecionada como molde para a construção do modelo teórico da giroxina.

3.17.2 Alinhamento

De posse da sequência alvo e da sequência molde, iniciou-se o processo de alinhamento. O ClustalW foi o programa utilizado para o alinhamento através da ferramenta *on-line* Muscle (EMBL-EBI) e o servidor BoxShade (*Expasy*), para o alinhamento entre as sequências selecionadas.

3.17.3 Modelagem

O modelo construído por modelagem comparativa foi realizado através da ferramenta MODELLER 9v10. Nesta etapa, foi realizado o alinhamento da sequência da estrutura molde (2AIP) com a sequência da proteína alvo, através do *script* do MODELLER *malign.py* (Apêndice A1). Este alinhamento gerou um arquivo (Arquivo.ali/pap) que foi posteriormente utilizado pelo programa como arquivo de entrada para a construção do modelo (*script model.py*) (Apendice A2). A otimização do modelo foi realizada através do *script optimize.py* (Apêndice A3). Este último realiza uma melhor minimização de energia do modelo em si. A idéia principal desse método é que “aquecendo-se” a molécula, os átomos adquirirão altas velocidades e quando atingirem a temperatura ambiente, a estrutura alcança o seu mínimo energético.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Fracionamento do veneno de *Crotalus durissus terrificus*

O veneno bruto é primeiramente fracionado utilizando uma coluna de exclusão molecular seguida de troca iônica (HENDON; FRAENKEL-CONRAT, 1971). 22 mg do veneno bruto de *C.d.t.* foi aplicado em uma coluna de exclusão molecular Superdex 75 GL 10/300 (GE-Healthcare Life Sciences), previamente equilibrada com tampão 0,1 M formiato de amônio, pH 3,0 com 0,1 M NaCl, foram coletados 1 ml/tubo em um fluxo de 0,8 ml/min. a temperatura 4 °C (Figura 10).

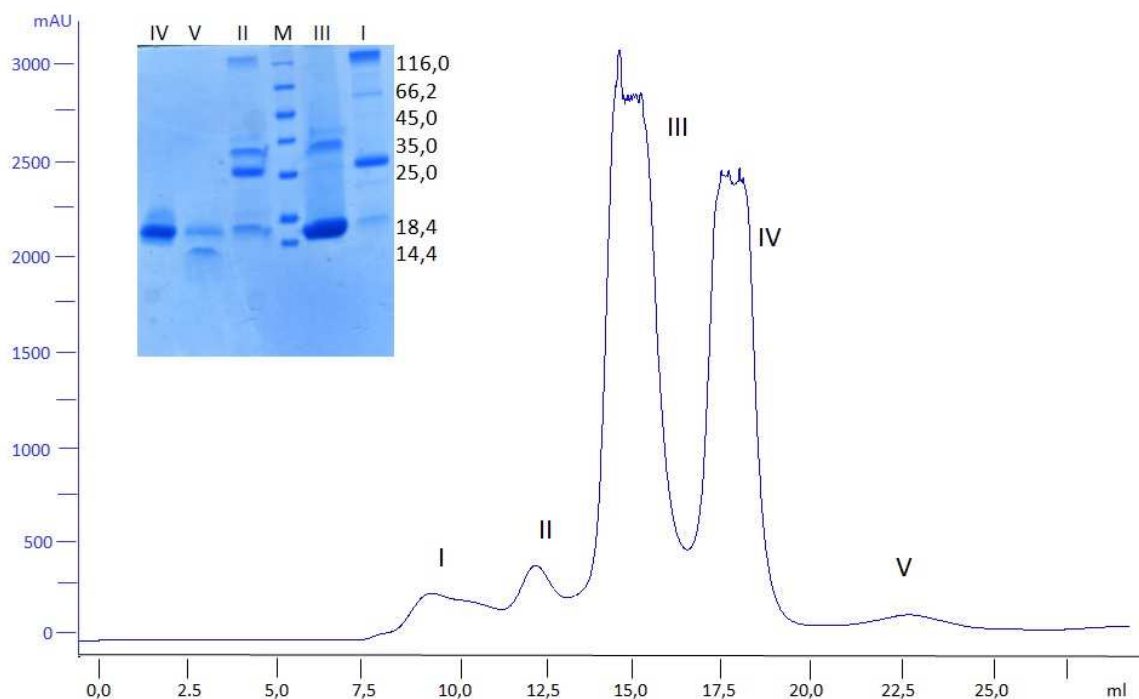


Figura 10 Fracionamento do veneno bruto de *C.d.t.* por exclusão molecular em resina Superdex 75 (eixo x: volume de eluição, eixo y: unidade de absorção (AU) em 280 nm), são mostrados quatro principais frações características do veneno: (I) convulsina, (II) giroxina, (III) crotoxina e (IV) crotamina. Inseto, 15% gel SDS_PAGE, (I – IV) frações oriundas da exclusão molecular, (M) marcador de massa molecular.

As frações contidas no pico referente à crotoxina (Pico III, figura 10) foram agrupadas (*pool*) e aplicadas em uma coluna de troca aniônica previamente equilibrada com tampão TrisHCl 0,05 M, pH 8,2 (Tampão A). A eluição foi realizada em tampão TrisHCl 0,05 M, pH 8,2 com

gradiente linear de NaCl 1 M (Tampão B Fluxo de 1,0 ml/min., sendo coletados 1 ml/tubo a temperatura de 4 °C (Figura 11). No inserto (Figura 11), característico gel da crotoxina mostrando duas bandas, a primeira banda, acima de 25 kDa se refere ao complexo da crotoxina, a segunda banda se refere a fração da PLA2, entretanto não é possível de se observar a fração da crotapotina, provavelmente devido a baixa massa molecular de cada uma das cadeias.

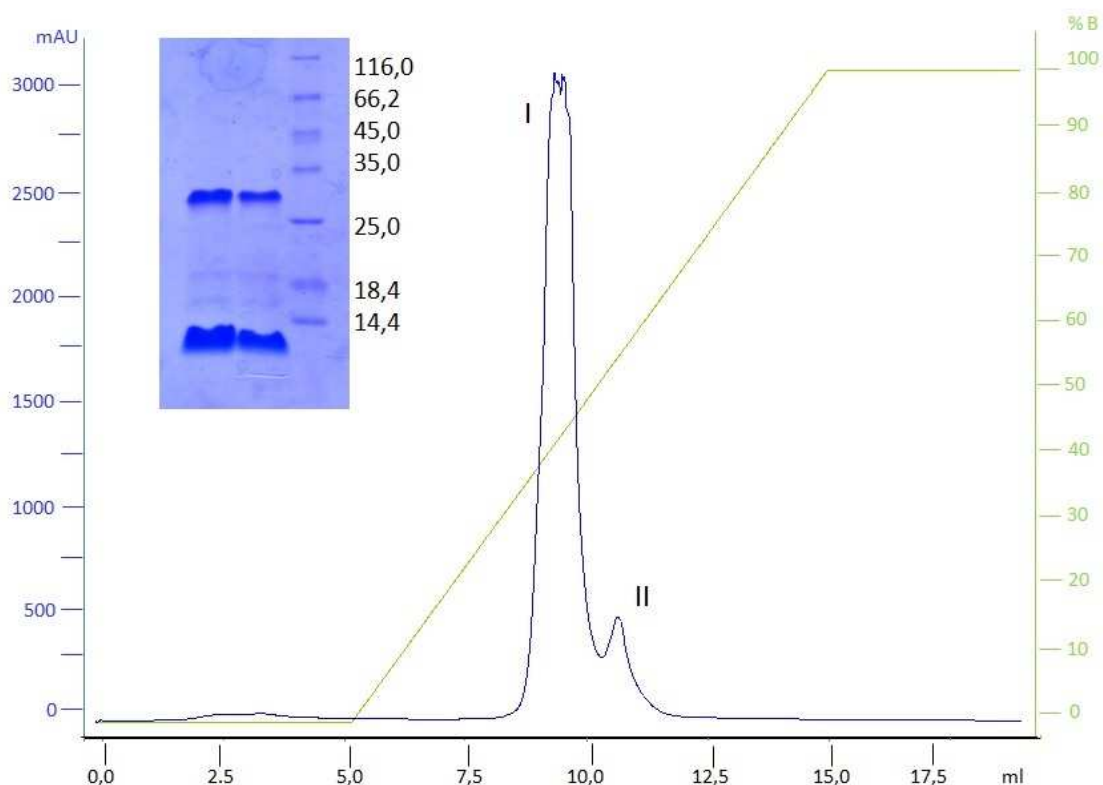


Figura 11 Cromatografia de troca aniônica da crotoxina em coluna MonoQ (GE-Healthcare Life Sciences). Inseto, Gel 15% não redutora em SDS_PAGE do pico I, referente a crotoxina. No eixo X, o volume de eluição em mililitros (ml), no eixo Y, a unidade de absorção (AU) em 280 nm (Azul) e o gradiente de concentração do tampão B (verde).

A fração referente à Cro (Pico IV, figura 10) foi submetida há uma segunda corrida cromatográfica em uma coluna Resorce S (troca catiônica) (GE-Healthcare Life Sciences) previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,8 (Tampão A). A eluição foi realizada em fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,8 com gradiente linear de NaCl 2 M. Fluxo de 2 ml/min., sendo coletados 1 ml/tudo.

4.1.1 Novo protocolo de purificação da giroxina e crotamina

Ensaio cristalográfico foram realizados para as proteínas purificadas pelo método descrito acima, entretanto, sem qualquer sucesso na obtenção de cristais para a proteína Cro. Com o intuito de se obter cristais, um novo protocolo de purificação foi desenvolvido.

O novo protocolo de purificação resultou em frações puras de giroxina e Cro em uma única etapa cromatográfica. Em cada corrida cromatográfica, 150 mg do veneno total cristalizado foram dissolvidos em 1,5 ml de tampão ácido acético 0,05 M, pH 5,0 (tampão A). A seguir, a solução foi centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi aplicado em uma coluna de troca catiônica do tipo MonoS_HR 10/10 (GE-Healthcare Life Sciences), previamente equilibrada com o mesmo tampão, conectada a um sistema de HPLC/Äkta. As proteínas absorvidas à coluna foram eluídas pela passagem de um gradiente segmentado de NaCl, de 0 a 1 M, em tampão idêntico ao A, exceto pela adição do sal, com fluxo de 1 ml/min. As amostras foram coletadas em um volume de 1 ml/tubo. A eluição das proteínas foi monitorada a 280 nm e resultaram em quatro proteínas puras em uma única etapa cromatográfica, identificadas como giroxina-I, giroxina-II, PLA₂ e Cro. Posteriormente a giroxina e a Cro foram concentradas em concentradores Amicon-Millipore (*cut-off* de 10.000 e 3.000 Da, respectivamente). O perfil cromatográfico de purificação das proteínas é mostrado na figura 12 e a fração correspondente a giroxina se encontra no pico I e II e a Cro no pico IV.

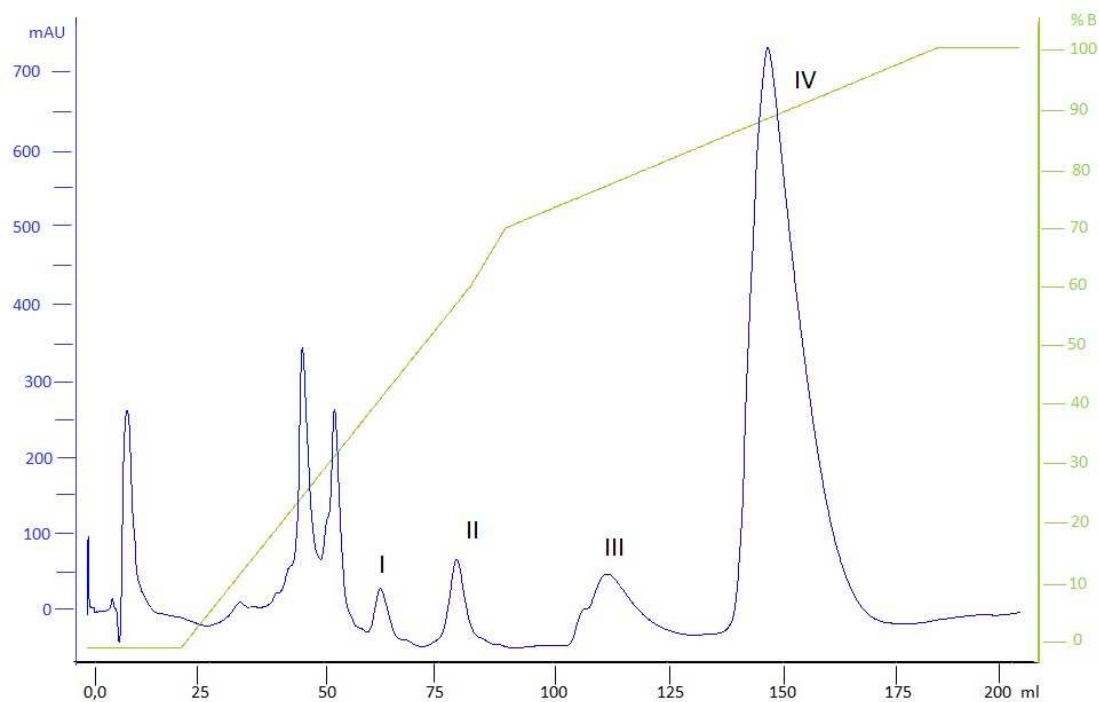


Figura 12 Cromatografia de troca catiônica do veneno bruto de *C.d.t.* em coluna MonoS (HR 10/10). Frações puras das proteínas gioxina (I, II), PLA₂ (III) e crotamina (IV) foram obtidas em uma única etapa de purificação. No eixo X descrevemos o volume de eluição em mililitros (ml), no eixo Y, unidade de absorção (AU) em 280 nm (azul) e o gradiente de concentração do tampão B (verde).

O grau de pureza da gioxina e da Cro (proteínas alvo do nosso estudo) foi confirmado por análise eletroforética, realizada em gel SDS-PAGE 15%, onde revelou o aparecimento de uma única banda (Figura 13).

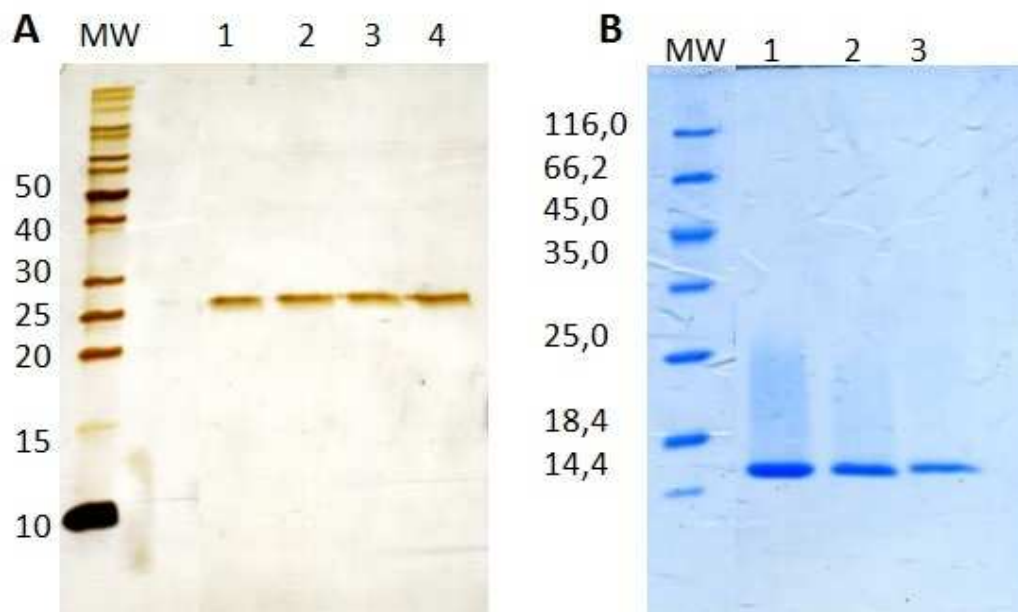


Figura 13 Gel de poliacrilamida a 15% com agente desnaturante (SDS). MW – Padrão de massa molecular. A) Gel da giroxina, linhas 1 a 4 serino proteinase purificada; B) Gel da crotamina, linhas 1 a 3 Cro purificada.

A fração cromatográfica referente à crotamina foi submetida à espectrometria de massa (Figura 14). Na espectrometria de massa foi possível notar um pico de 4.736 Da, o que indica a presença de uma isoforma do polipeptídeo. Essas isoformas são bastante difíceis de separar pelos métodos cromatográficos usuais utilizados na purificação de proteínas. A ocorrência de um único pico cromatográfico que produza dois picos distintos e próximos em um espectro de massa, confirma a presença de duas proteínas com cargas de superfícies próximas.

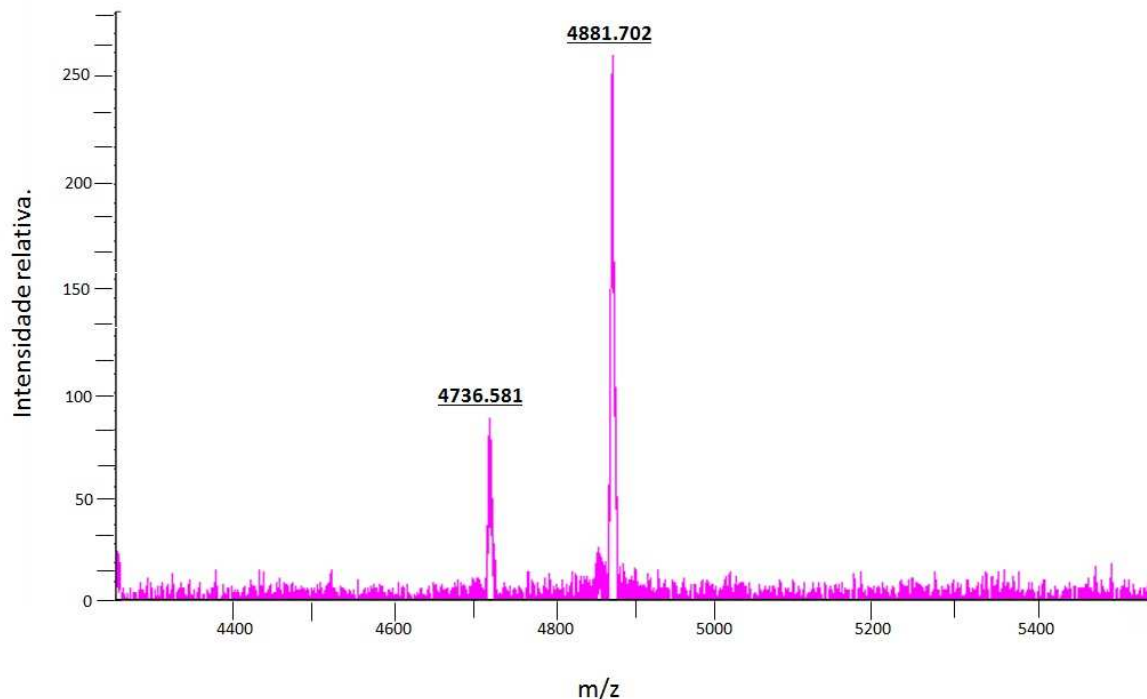


Figura 14 Espectrometria de massa da fração da crotonamina purificada por troca iônica. Presença de dois picos relacionados à presença de duas isoformas da crotonamina com cargas de superfícies próximas e com massa molecular diferenciada. O gráfico mostra massa molecular *versus* intensidade.

4.2 Cristalização, coleta de dados e análise estrutural da giroxina

4.2.1 Cristalização da giroxina

Para a busca de condições iniciais de cristalização, a giroxina foi centrifugada a 10.000 x g a 4 °C por 60 minutos. A dispersividade foi monitorada por DLS: 10 µl foram aplicados em uma cubeta óptica para as medidas de DLS. Para cristalização, a solução da proteína foi concentrada até 10 mg/ml em HEPES 0,05 M, pH 7,5 usando um microconcentrador (*cut-off* de 10.000 Da Millipore, USA). Um total de 384 condições de cristalização foram testadas, aplicando os *screens* disponíveis comercialmente JCSG+, Classic, AmSO4 e Compas Suite (todos Qiagen, Alemanha). 300 nl da solução de proteína foram adicionadas a 300 nl da respectiva solução precipitante usando o robô de pipetagem Honeybee 961 (Genomic Solution, USA) para cada um dos 96 poços, utilizando a técnica de gota sentada (NeXtalQIA1 µplates, Qiagen, Alemanha). O reservatório foi preenchido com 35 µl de solução precipitante. Após 30 dias a 22 °C, cristais iniciais cresceram em três diferentes condições (Figura 15A).

As condições iniciais foram otimizadas variando a concentração do precipitante, do tampão e/ou a concentração do sal em torno das concentrações iniciais em placas de 24 poços (CPL-130 *plates* Jenabioscience, Alemanha), utilizando a técnica de gota suspensa, onde combinamos 1 μ l da solução da proteína previamente centrifugada (10.000 x g, 4 °C, 60 min.) e 1 μ l da solução de cristalização. Os cristais cresceram em um período de 12 – 30 dias.

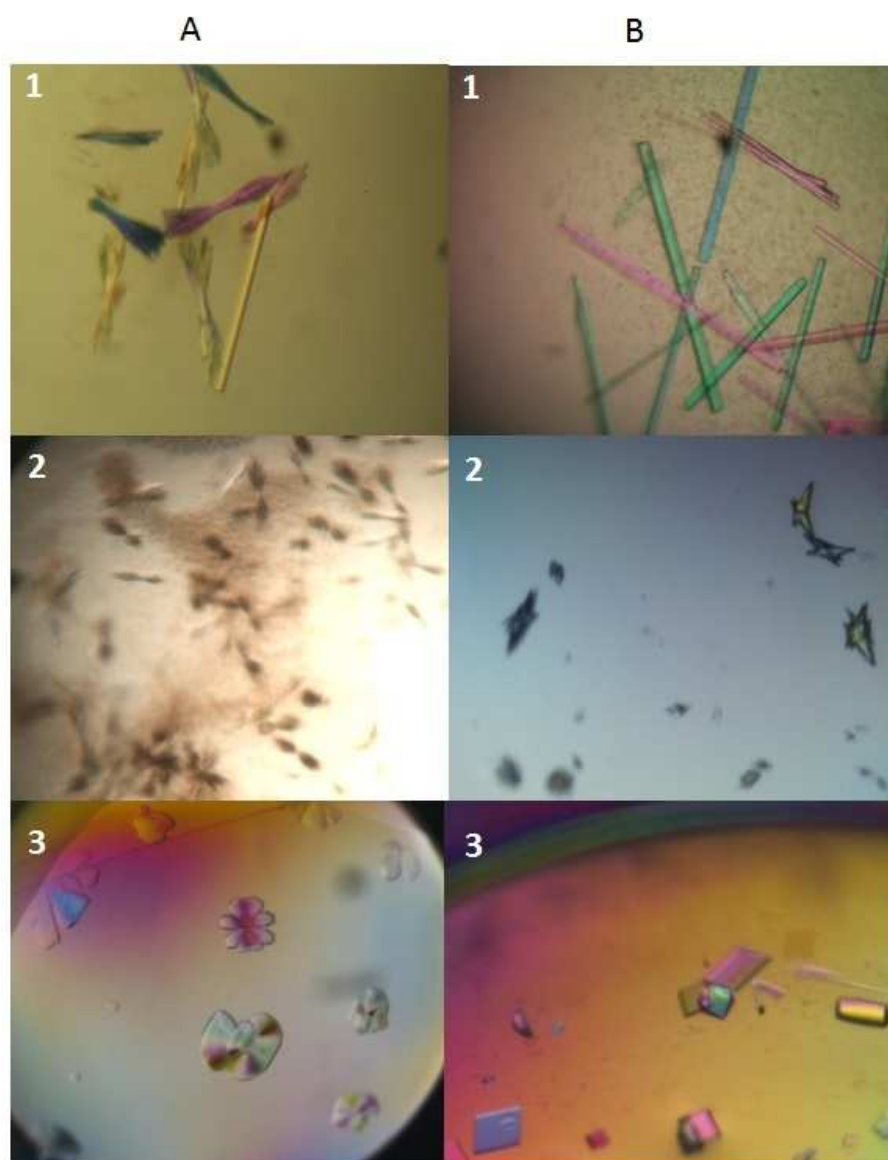


Figura 15 Fotomicrografia dos cristais da giroxina. Na coluna A os cristais da giroxina em três diferentes condições iniciais: 1) citrato tri-sódico 0,2 M, dihidrogenofosfato de amônio 1 M; 2) acetato de sódio 2 M, pH 4,6, 8% PEG 4000; 3) citrato tri-sódico 0,2 M, dihidrogenofosfato de amônio 0,5 M. Na coluna B os cristais após otimização: 1) citrato tri-sódico 0,2 M, dihidrogenofosfato de amônio 0,6 M; 2) acetato de sódio 2 M, pH 4,6, 12% PEG 4000; 3) citrato tri-sódico 0,2, dihidrogenofosfato de amônio 0,7 M.

4.2.2 Difração de raios-X da giroxina

Antes da coleta de dados, o cristal foi transferido para uma solução contendo glicerol (solução crio-protetora), por um período de aproximadamente 30s e *flash frozen* em um jato de nitrogênio gasoso. Os dados de difração foram coletados na linha de luz X13 (HasyLab/Desy, Alemanha). Os cristais da giroxina obtidos após a otimização (Figura 15 B1 e B3) foram testados em experimentos de difração de raios-X. Estes cristais difrataram a resoluções máximas de 4 Å, resolução insuficiente para permitir a obtenção de dados estruturais da proteína. De acordo com a literatura, a presença de uma ou mais cadeias de açúcar pode ser um fator desfavorável no processo de cristalização, caracterizando uma desordem interna na cristalização.

4.2.3 Modelagem molecular da giroxina

A estrutura primária de uma proteína determina sua estrutura tridimensional. Contudo, o algoritmo que permita com precisão absoluta determinar a estrutura tridimensional de uma proteína partindo de sua sequência primária, ainda está por ser determinado com alta precisão. A modelagem molecular comparativa tem como objetivo gerar modelos confiáveis. A condição necessária é que a semelhança entre a sequência designada e a estrutura do modelo seja detectável e que o alinhamento entre elas possa ser construído (LESK; LO CONTE; HUBBARD, 2001).

O alinhamento sequencial entre a giroxina e serino proteinases de serpentes obtidas através da ferramenta *BlastP*, foi realizada afim de se obter informações estruturais sobre a giroxina. O objetivo do alinhamento é justapor resíduos estruturalmente equivalentes, levando em consideração características estruturais comuns, como por exemplo, a estrutura secundária. O alinhamento revelou sequências conservadas que determinam o *fold* da proteína (Figura 16B), a sobreposição entre o modelo e o molde pode ser observada na figura 16A.

A figura 16A mostra o modelo da giroxina gerado por modelagem molecular, foi no intuito de verificar o provável direcionamento do sítio de glicosilação e a especificidade da proteína, que decidimos gerar o modelo teórico. De acordo com o modelo gerado, há uma forte indicação de que a cadeia do açúcar pode estar desfavorecendo o empacotamento do cristal, estando à cadeia exposta ao solvente, o que confere alta flexibilidade das glicanas, podendo impedir tanto a cristalização, quanto a aquisição de densidade eletrônica adequada para a resolução das estruturas. As sequências destacadas pelos retângulos na figura 16AB

demonstram as regiões de baixa similaridade entre o modelo e o molde.

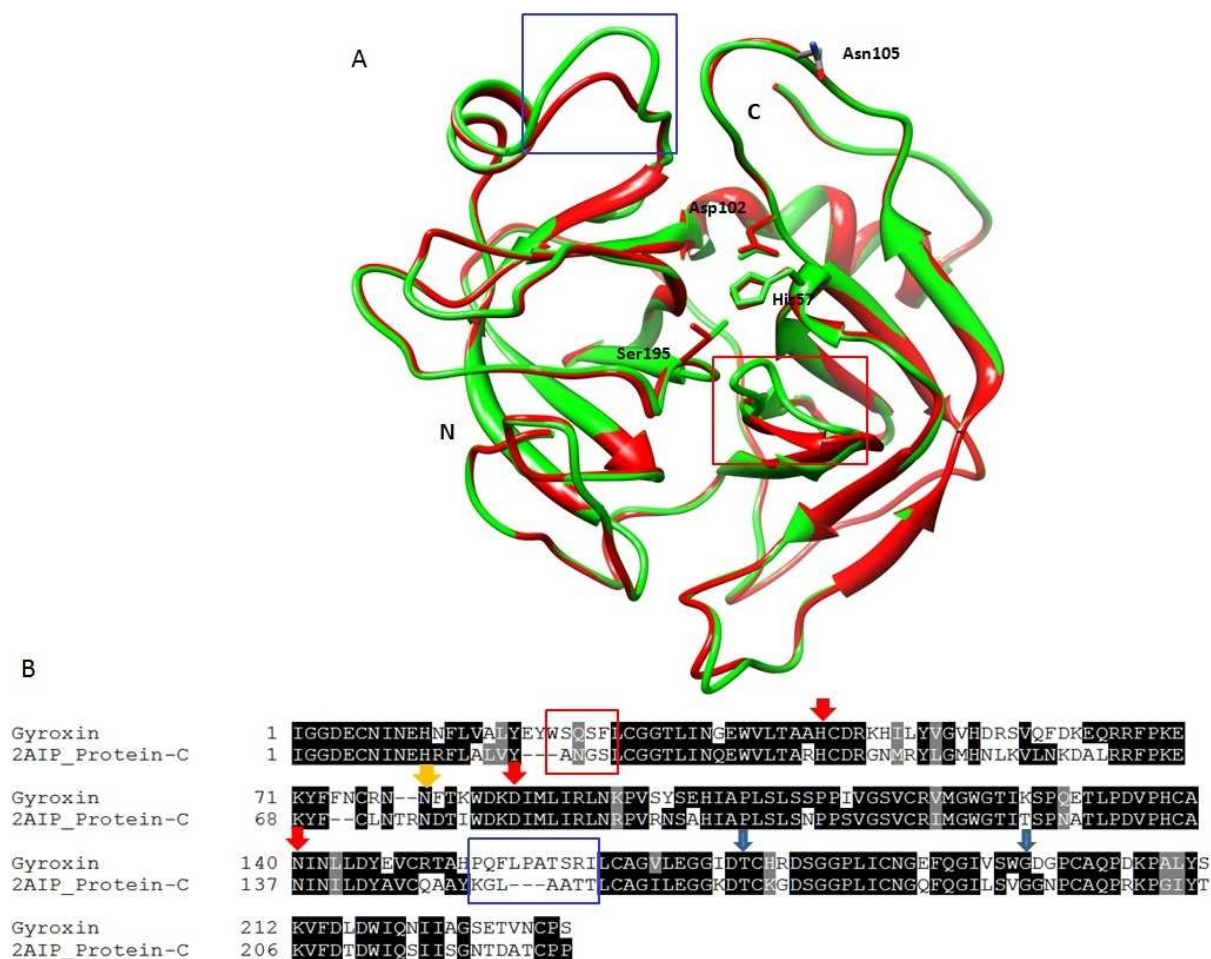


Figura 16 A) Estrutura da giroxina gerada por modelagem molecular (verde) sobreposta ao modelo (vermelho-2AIP), a região do sítio de glicosilação para a giroxina esta destacado pelo aminoácido Asn105. B) Alinhamento da sequência da giroxina com a sequência da serino proteinases utilizada como molde. As setas vermelhas indicam os aminoácidos envolvidos na tríade catalítica, as setas azuis representam os sítios S1 e S2 e a seta amarela indica a posição da glicosilação na proteína giroxina. As sequências destacadas pelos retângulos mostram as regiões de baixa similaridade.

4.3 Cristalização, coleta de dados e análise estrutural da crotoxina

4.3.1 Cristalização da crotoxina

Para ensaios de cristalização a solução da proteína foi monitorada por DLS, para verificar a presença ou ausência de agregados. (Figura 17).

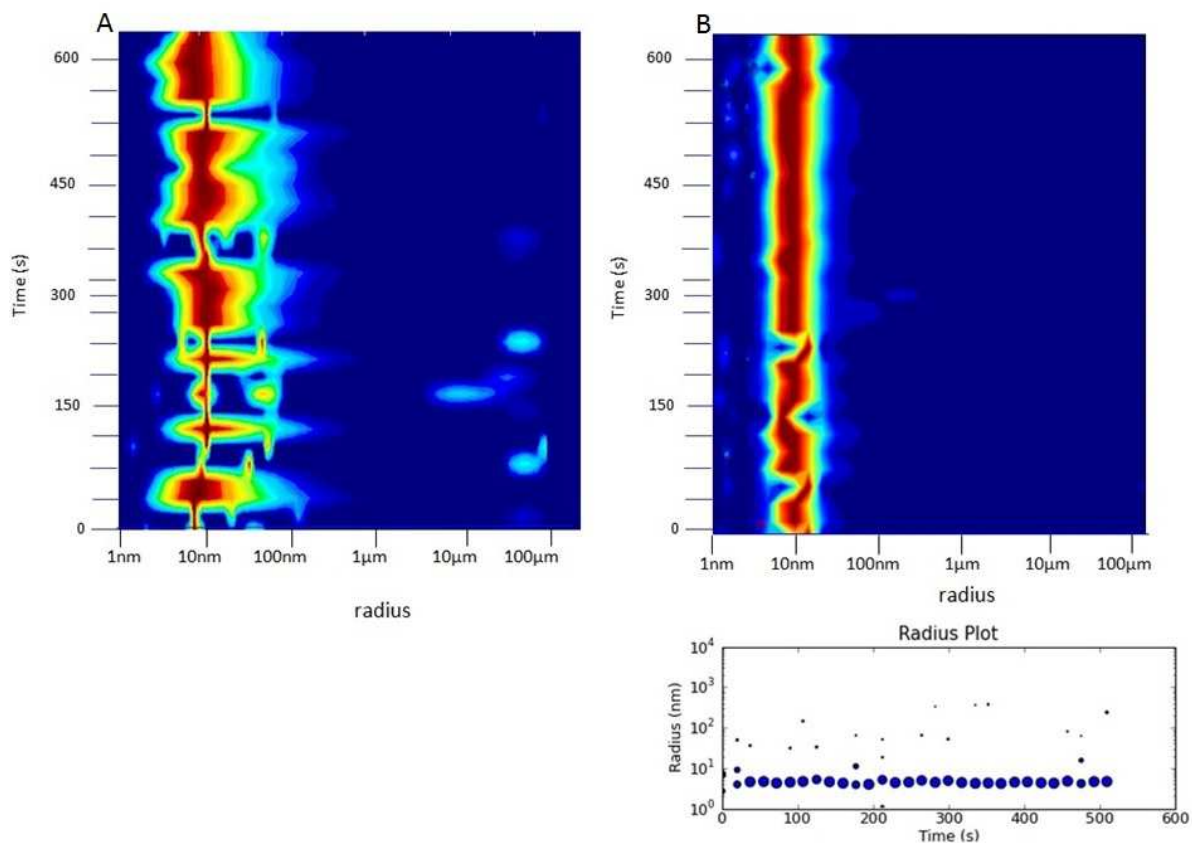


Figura 17 Heatmap do DLS da Crtx. A) Crtx antes da centrifugação; B) Crtx centrifugada a 10.000 x g, 60 min., indicando a monodispersividade da solução (*heatmap*). O gráfico mostra o tamanho da partícula (*radius*) em função do tempo (s).

Antes dos ensaios de cristalização, a Crtx foi centrifugada a 10.000 x g, 4 °C por 60 minutos. Para cristalização, a solução da proteína foi concentrada até 10 mg/ml em 0,1 M TrisHCl, pH 7,0 + 0,1 NaCl usando um microconcentrador Amicon (*cut-off* de 10.000 Da). As condições de cristalização usadas foram as mesmas descritas na seção 4.2.1. Após 30 dias a 17 °C, cristais iniciais cresceram em duas condições (Figura 18).

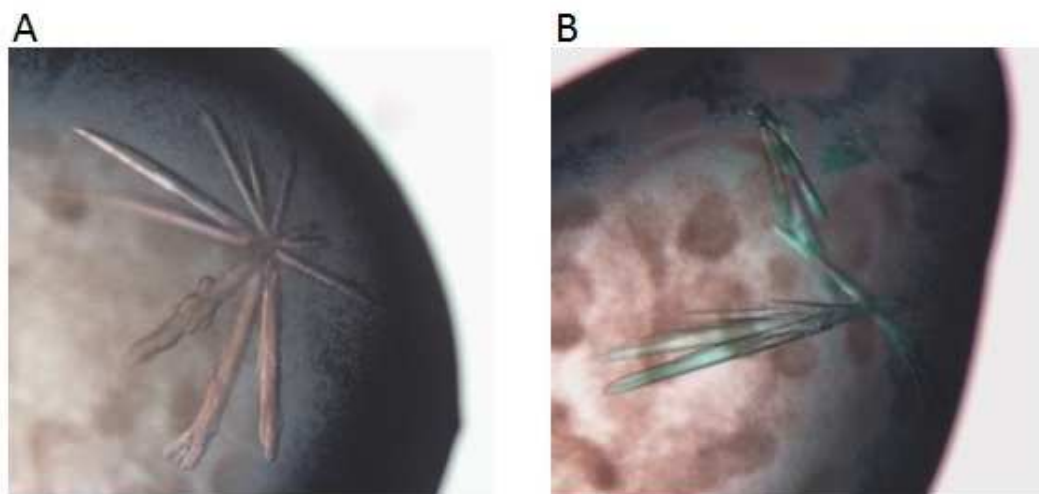


Figura 18 Fotomicrografia dos cristais iniciais da crotoxina nas condições: A) sulfato de lítio 0,2 M, trisHCl 0,1 M pH 8,5 e 30% PEG 4000; B) acetato de sódio 0,2 M, trisHCl 0,1 M pH 8,5 e 30% PEG 4000.

As condições iniciais foram refinadas variando a concentração do agente precipitante (PEG 4000) em torno das concentrações iniciais, em placas de 24 poços (CPL-130 *plates* Jena Bioscience, Alemanha), utilizando a técnica de difusão de vapor por gota suspensa. 1 μ l da solução da proteína foi combinada com 1 μ l da solução de cristalização e 1 μ l de água *milliQ* (concentração final de \sim 7 mg/ml). Cristais foram obtidos após um período de 15 dias (Figura 19).

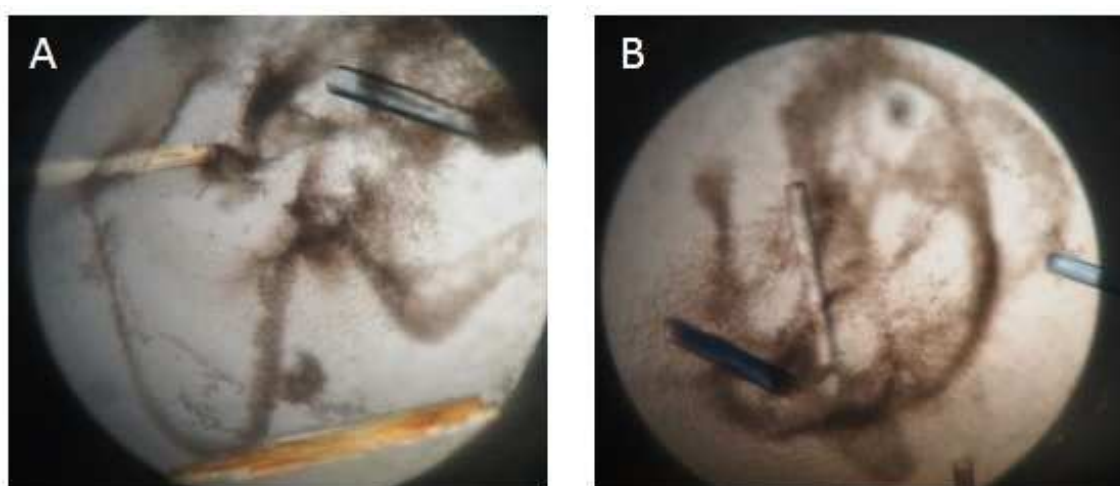


Figura 19 Fotomicrografia dos cristais da crotoxina obtidos após refinamento nas condições: A) sulfato de lítio 0,2 M, trisHCl 0,1 M pH 8,5 e 10% PEG 4000; B) acetato de sódio 0,2 M, trisHCl pH 8,5 e 10 % PEG 4000.

A grande dificuldade no refinamento dos cristais da crotoxina, se deu nas condições sulfato de lítio 0,2 M, TrisHCl 0,1 M pH 8,5 e 30% PEG 4000. Nas condições descritas acima, cristais separados cresceram de diferentes sítios de nucleação (formação dos primeiros agregados ordenados), que podem ser classificados em três tipos: *macroscopic twinning*, *mosaicity* e *non-merohedral* (RUPP, 2010). O que chamamos de *macroscopic twinning*, são visíveis através do microscópio (Figura 19A), o que não nos permitiu a coleta de dados para o mesmo. Os cristais que foram submetidos para coleta de difração de raios-X referem-se à segunda condição (Figura 19B).

4.3.2 Análise da difração de raios-X da crotoxina

Cristais da Crtx foram imersos em uma solução crio-protetora contendo 20% de glicerol por um período de aproximadamente 30s, evitando assim, a destruição do cristal quando exposto por um longo período de radiação, os mesmo cristais foram então, *flash-frozen* em um jato de nitrogênio gasoso. Os dados de difração foram coletados na linha de luz X13 (HasyLab/Desy, Alemanha) e no Laboratório Nacional de Lawrence Berkeley (Lawrence Berkeley National Laboratory – USA). Diversos conjuntos de dados foram coletados e os cristais difrataram entre 2,4 Å e 2,8 Å. Na tentativa de resolução da estrutura pelo método de substituição molecular, foi possível observar que os cristais faziam parte de um grupo de cristais chamados *mosaic crystals* (Figura 20A) (RUPP, 2010). Cristais mosaicos aparecem únicos e perfeitos, e o resultado é que a rede recíproca difratada de cada componente se sobrepõe. Entretanto, o grau de mosaicidade se revelou através do padrão de difração (Figura 20BC).

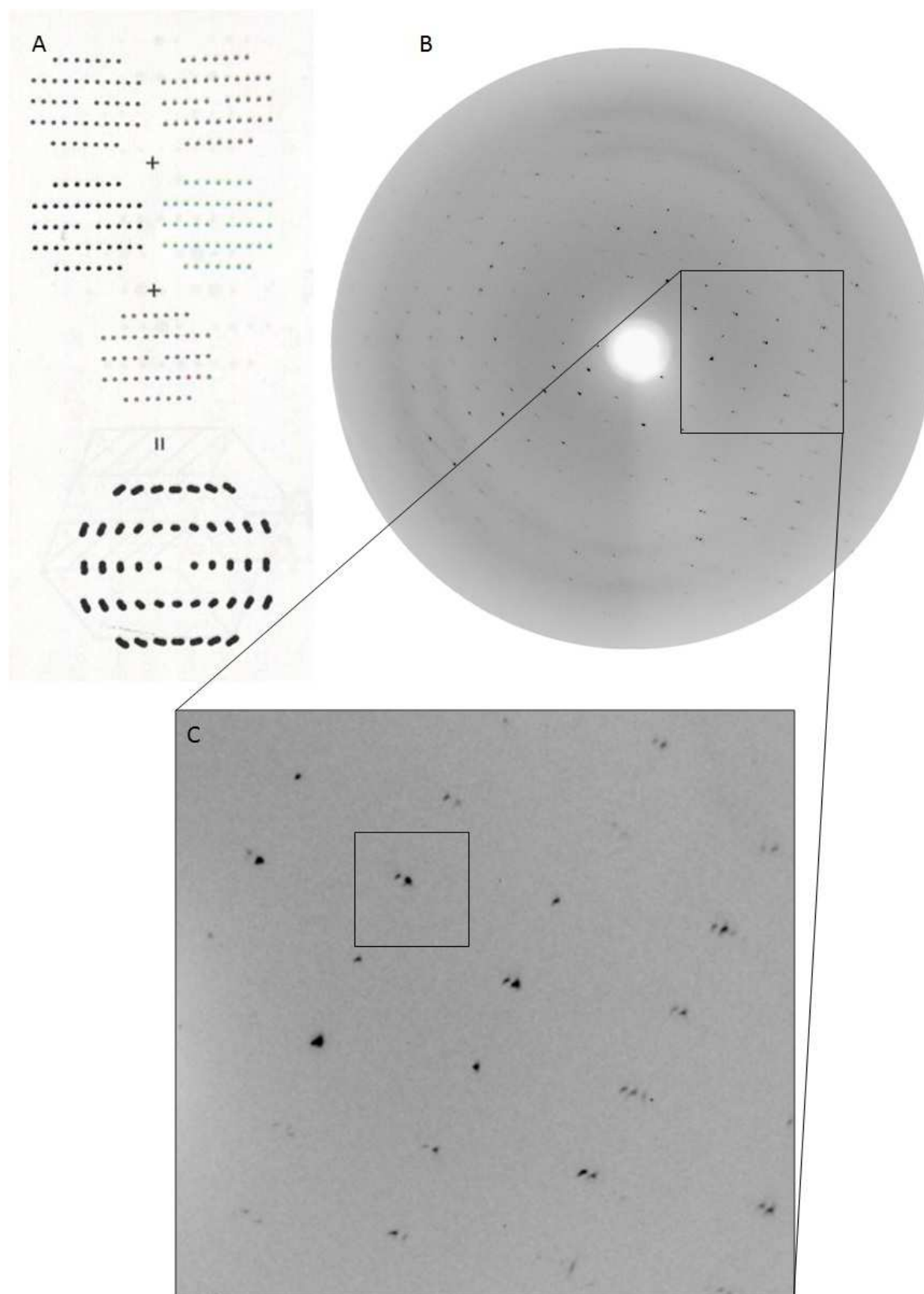


Figura 20 A) *Mosaic crystal* (RUPP, 2010). B) o padrão de difração da Crtx mostra um correspondente espalhamento mosaico nos *spots*. C) Visualização ampliada.

Existem algumas condições que favorecem o crescimento desses cristais, estes então são dependentes de algumas etapas prévias, como: protocolo de purificação, condições de cristalização (pH, temperatura, etc.), impurezas presentes na solução de cristalização e a presença de isoformas.

Para a obtenção de cristais difratáveis seria necessário a separação de cada uma das isoformas, e posteriormente a formação do novo complexo CACB, já que o veneno é composto por várias isoformas (FAURE; BON, 1987).

Cristais que apresentem um grau de mosaicidade, porém com um padrão de difração, são possíveis de serem solucionados. Assim, iniciamos as análises dos dados coletados, porém, no mesmo período Faure e col. (2011) publicaram a estrutura cristalográfica da crotoxina a 1,35 Å de resolução (FAURE et al., 2011), onde eles separaram todas as isoformas da proteína, e posteriormente, formaram um novo complexo com os domínios CA e CB, livres de isoformas.

4.4 Cristalização da crotamina

A solução da Cro foi centrifugada a 10.000 x g, 4 °C por 120 minutos. A dispersividade foi monitorada por DLS, 10 µl foram aplicados em uma cubeta óptica para as medidas de DLS e o raio de distribuição foi revelado como um *heatmap* (Figura 21).

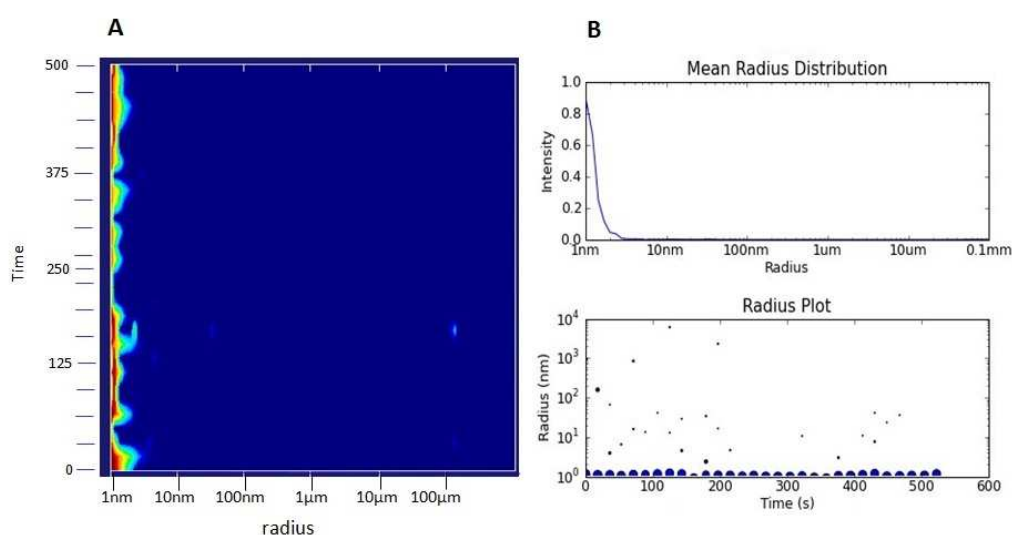


Figura 21 DLS. A) *Heat map* da crotamina. As cores indicam a intensidade relativa da partícula, com azul sendo zero e vermelho o máximo. B) Raio hidrodinâmico, o gráfico superior mostra o raio de distribuição (nm) *versus* intensidade, no gráfico inferior é plotado o raio (nm) *versus* tempo (s).

Para a busca de condições iniciais de cristalização, a solução da proteína foi concentrada até 22 mg/ml usando um dispositivo centrífugo de filtração com um *cut-off* de 3.000 Da. As condições iniciais de cristalização foram as mesmas descritas na seção 4.2.1. Após 30 dias a 17 °C, cristais iniciais cresceram na presença de tiocianato de sódio 0,1 M e sulfato de amônio 2,5 M.

Os cristais iniciais obtidos eram relativamente de baixa qualidade, com o intuito de aprimorar a qualidade e o tamanho dos cristais, eles foram reproduzidos manualmente. A condição inicial foi otimizada variando a concentração do precipitante e a concentração do sal em torno das concentrações iniciais em placas de 24 poços (CPL-130 *plates* Jena Bioscience, Alemanha), utilizando a técnica difusão de vapor através de gota suspensa, mixando 1µl da solução da proteína previamente centrifugada (10.000 x g, 4 °C, 120 min.) e 1µl da solução de cristalização. Centrifugação a 10.000 x g remove grandes agregados e uma solução monodispersa com um raio principal de ~ 1 nm correspondente a massa molecular de aproximadamente 4.800 Da foi aplicada para cristalização.

Variando as concentrações do sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) 1,5 – 2,5 M e do tiocianato de sódio (NaSCN) 0,05 – 0,5 M presentes na condição de cristalização, cristais adequados para difração cresceram na presença de tiocianato de sódio 0,2 M e de sulfato de amônia 1,9 M após dois dias, apresentando as dimensões: 0,5 x 0,25 x 0,1 mm (Figura 22).

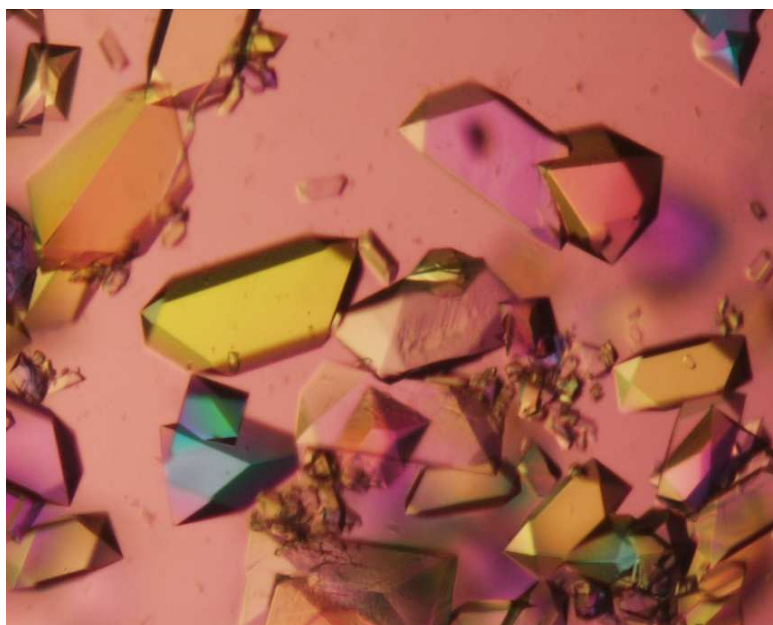


Figura 22 Fotomicrografia do cristal da Cro. Dimensões: 0,5 x 0,25 x 0,1 mm.

4.4.1 Difração de Raios-X dos Cristais Nativos e Derivados de Átomos Pesados

4.4.1.1 Tentativas iniciais de resolução da estrutura por substituição molecular

Antes da coleta de dados, os cristais foram transferidos para uma solução contendo 20% de glicerol (crio-protetora), esses cristais foram mergulhados por aproximadamente 30 s e *flash frozen* em nitrogênio líquido. Inúmeros conjuntos completos de dados de difração de cristais nativos da Cro foram coletados na linha de luz P14 (PetraIII/DESY), na cidade de Hamburgo, Alemanha. Os cristais da proteína difrataram entre 1,9 Å e 1,7 Å de resolução (Figura 23).

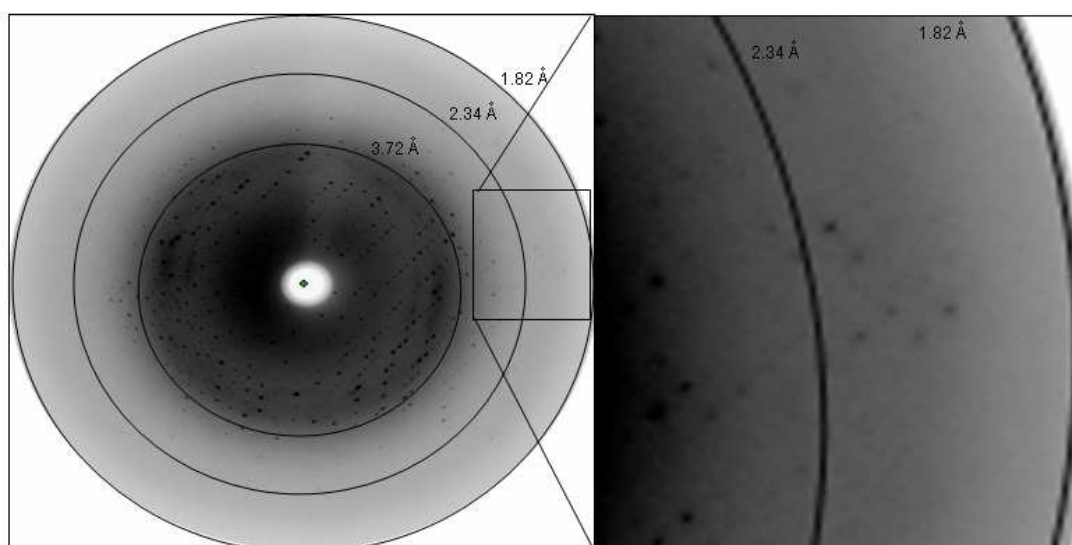


Figura 23 Difração de raios-X do cristal da Cro. Visualização aumentada, difração a 1,84 Å de resolução.

Estes conjuntos de dados foram inicialmente utilizados na tentativa de resolução da estrutura pelo método de substituição molecular (Tabela 4). Entretanto, não foi possível resolver a estrutura utilizando o modelo de NMR da crotamina disponível no PDB (1H50, 1Z99), provavelmente pela alta flexibilidade do modelo. Outros modelos foram usados, como o das β -defensinas humanas (hBDx), entretanto, sem muito sucesso, devido à baixa similaridade sequencial com os modelos disponíveis e a Cro.

Tabela 4 Parâmetros do cristal e dados estatísticos de coleta.

Parâmetros	
Radiation source	Consortiums Beam Line X13 (HASYLAB/DESY)
Detector	MAR CCD
Wavelength (Å)	0.8123
Space Group	$I222/ I2_12_12_1$
Unit-cell parameters (Å)	$a = 67.75, b = 74.40$ and $c = 81.01$
V_M (Å ³ Da ⁻¹)	3.54
Solvent content (%)	65.2
Resolution range (Å)	18.7 – 1.9 (1.90-1.85)
Data completeness (%)	94.8 (76.1)
R_{merge}^\dagger (%)	3.6 (48.9)
$I/\sigma(I)$	34.7 (3.6)

$^\dagger R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - (I(hkl))| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$, onde $(I(hkl))$ representa a intensidade média das observações $I_i(hkl)$ da reflexão hkl . Valores em parêntesis são para alta resolução.

4.4.1.2 Coleta de dados de cristais marcados com átomos pesados

Os cristais da crotamina foram então submetidos a experimentos de *soaking*, com soluções apresentando diferentes concentrações de átomos pesados. A principal dificuldade em se fazer esses experimentos é a grande vulnerabilidade dos cristais, estes se rompem com muita facilidade, quando em contato com soluções de metais pesados. Para transpor essa barreira de dificuldade, várias soluções de átomos pesados foram testadas em diferentes concentrações. Além disso, alternativas de incorporação do metal foram testadas. Além do método clássico de *soaking*, o método de *quick-cryo-soaking*, co-cristalização e a técnica de marcação de iodo por vaporização (VIL), foi testada neste trabalho.

Diversos experimentos de *quick-cryo-soaking*, *soaking*, co-cristalização e VIL resultaram em 11 conjuntos de dados completos que foram coletados em colaboração com o Laboratório Nacional de Lawrence Berkeley (Lawrence Berkeley National Laboratory – USA).

Na Tabela 5 são apresentadas as condições de *soaking*, *quick-cryo-soaking*, co-cristalização e VIL dos cristais derivados que tiveram conjuntos de dados coletados.

Tabela 5 Dados coletados com as técnicas de *soaking*, *quick-cryo-soaking* e VIL.

Técnica utilizada	Átomo pesado	Resolução
VIL	KI ₃	2,06
VIL	KI ₃	2,27
<i>QuickSoak</i>	I ₃ C	2,37
<i>Quick Soak</i>	KI ₃	2,93
<i>Quick Soak</i>	I ₃ C	2,82
<i>Quick Soak</i>	Br ₃ C	2,61
VIL	I ₃ C	2,07
<i>Soaking</i>	Ta ₆ Br ₁₂	2,61
<i>Soaking</i>	Ta ₆ Br ₁₂	2,62
<i>Cocrystalization</i>	NaBr	1,73
<i>Cocrystalization</i>	NaBr	2,08

Todos os conjuntos de dados de difração, que foram coletados de cristais derivados de átomos pesados foram utilizados na tentativa de resolução estrutural do polipeptídeo através das técnicas de substituição isomorfa. Entretanto, estas tentativas não foram bem sucedidas. A razão principal foi a dificuldade na incorporação de átomos pesados nos cristais da proteína. Para superar esse problema, novos dados foram coletados com a utilização da técnica de difração anômala. Cristais foram mergulhados em uma solução de hexacloroplatinato de potássio (K₂PtCl₆) 0,1 M, por um período de 12 a 24 horas. Dois conjuntos de dados foram coletados para cada comprimento de onda (Tabela 6) e usados nos experimentos de MAD e SAD.

Tabela 6 Comprimento de ondas utilizadas para a coleta de dados de difração, para resolver a estrutura pela técnica MAD.

	Pt_1 (12 horas)	Pt_2 (24 horas)
Baixo (<i>Low</i>)	1,0753	1,0753
Inflexão (<i>Inflection</i>)	1,0707	1,0708
Máximo (<i>Peak</i>)	1,0702	1,0702
Resolução (Å)	2,6	2,9

O primeiro conjunto de dados foi coletado selecionando o comprimento de onda incidente para o valor correspondente ao máximo (pico) de f'' (1,0702 Å). Mais dois conjuntos de

dados ajustado na inflexão e no baixo (1,0707 Å, 1,0753, respectivamente), também foram coletados. Para o segundo conjunto de dados coletados os comprimentos de onda para máximo, inflexão e baixo, foram: 1,0702, 1,0708 e 1,0753, respectivamente. Entretanto, foi possível resolver a estrutura pela técnica de SAD, utilizando apenas o conjunto de dados coletados Pt_1 no comprimento de onda do pico de f'' .

4.4.1.3 Construção da estrutura cristalográfica marcada com átomos pesados

Uma vez que as tentativas para resolver a estrutura da crotamina pelo método de substituição molecular, utilizando tanto as coordenadas da Cro pela técnica de NMR (PDB 1H50 e 1Z99) (FADEL et al., 2005; NICASTRO et al., 2003), quanto estruturas das proteínas defensinas conhecidas, os resultados não foram satisfatórios, a técnica de SAD foi aplicada para resolver os problemas de fases. Cristais com derivados de átomos pesados foram obtidos quando cristais foram mergulhados em uma solução contendo hexacloroplatinato de potássio (K_2PtCl_6) 0,1 M, por cerca de 12 h. Três conjuntos de dados anômalos foram coletados para a técnica de MAD na linha de luz X12_DORIS III (DESY/Hamburgo, Alemanha) para pico, inflexão e pontos de baixa energia do Pt. No entanto, os dados do comprimento de onda para máximo exibiram um sinal anômalo muito claro e a técnica SAD foi usada. Redução de dados anômalos, determinação do grupo espacial e os parâmetros de célula unitária foram cuidadosamente determinados usando o programa *iMOSFLM* (BATTYE et al., 2011).

As fases foram determinadas usando o programa *Phaser_EP* no pacote de programas PHENIX (ADAMS et al., 2002) com 2,6 Å de resolução, explorando o sinal anômalo dos íons de platina. O cálculo da posição dos átomos de Pt presentes no cristal, determinou 3 sítios, apresentando um coeficiente de correlação (CC) de 56. As coordenadas atômicas e a ocupação dos átomos pesados foram refinadas utilizando o programa *AutoBuild* (ADAMS et al., 2002). A determinação do conteúdo do solvente do cristal foi de 58,7 % com a presença de três moléculas na unidade assimétrica. O mapa de densidade eletrônica inicial, apresentou qualidade suficiente para construir aproximadamente 90% das três cadeias polipeptídicas da crotamina presente na unidade assimétrica, utilizando construção automatizada no programa *phenix.autobuild* (ADAMS et al., 2002). Inicialmente, a sequência correta dos resíduos foi assinalada ao modelo e em seguida a posição dos resíduos foi ajustada manualmente para os três monômeros (A, B e C) presentes na unidade assimétrica. A construção das cadeias foi monitorada pelos valores *R-factor* e *Rfree* que ao final da construção atingiram os valores 33,1 e 37,3 respectivamente. Dados estatísticos estão apresentados na Tabela 7.

4.4.1.4 Refinamento da estrutura

Um conjunto de dados da proteína nativa foi coletado com 1,7 Å de resolução, na linha de luz P14/PETRA III (DESY/Hamburgo, Alemanha). O modelo inicial construído pelo programa *phenix.autobuild* foi o ponto de partida para o refinamento da estrutura. Os dados experimentais foram substituídos pelo conjunto de dados do cristal nativo, que havia sido coletado anteriormente até 1,7 Å de resolução. O processo de refinamento seguiu com o programa REFMAC (COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, 1994; WINN; MURSHUDOV; PAPIZ, 2003), alternando-se ciclos de construção manual, utilizando o programa gráfico COOT (EMSLEY; COWTAN, 2004). Um total de 65 moléculas de água foram introduzidas no modelo utilizando o programa ARP/wARP (COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, 1994). A qualidade do mapa de densidade (Figura 24) permitiu a construção dos resíduos 1 ao 42 para os três monômeros. O modelo final apresenta ainda, quatro moléculas de glicerol, quatro íons tiocianato e três íons sulfato, com valores finais de *Rfactor* de 16,6% e um *Rfree* de 22,5%. A estatística final do refinamento esta apresentada na Tabela 7.

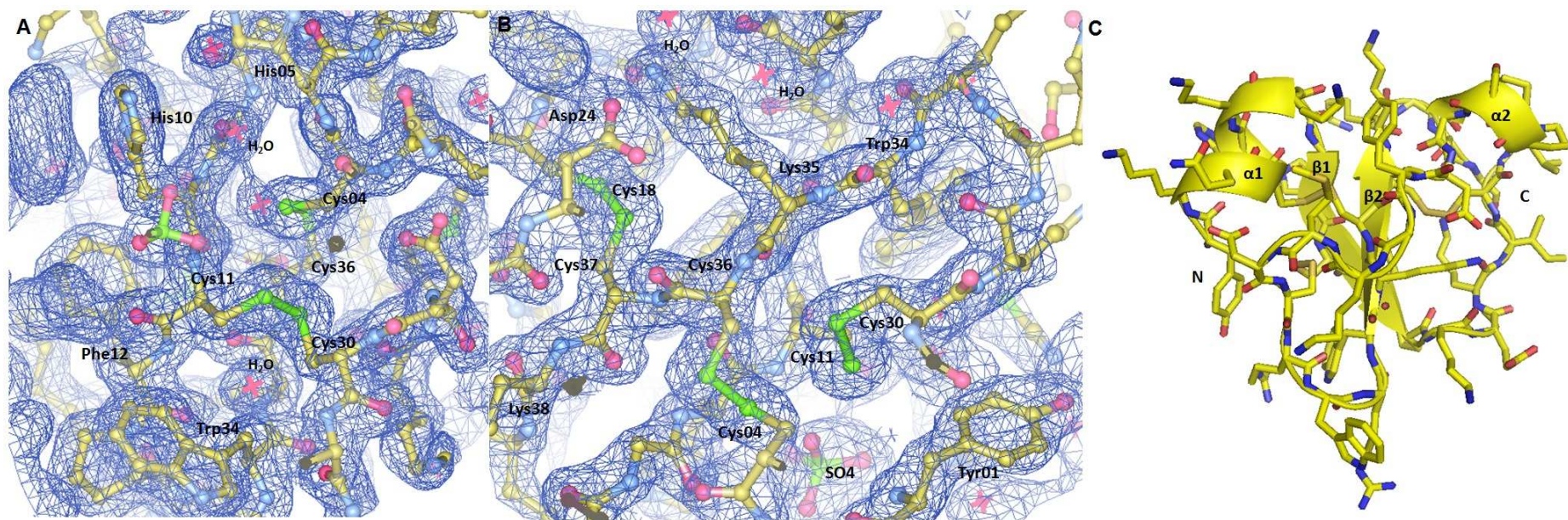


Figura 24 Refinamento da molécula da Cro baseado no mapa de densidade eletrônica. A,B) Diferentes regiões da estrutura, mostrando a qualidade do mapa eletrônico e o modelo construído com base na interpretação da densidade eletrônica. C) Visão global do enovelamento da Cro.

Tabela 7 Parâmetros estatísticos e refinamento da estrutura da crotamina.

Data collection	Pt-derivative	Native
Beamline	X12/Doris III	P14/Petra III
Space group	$I2_12_12_1$	$I2_12_12_1$
Unit-cell parameters (Å)	$a=66.94, b=74.55, c=80.45$	$a=66.92, b=74.33, c=80.19$
Resolution	54.6-2.6 (2.6-2.5)	54.5-1.7 (1.79-1.69)
Measured reflections	36251 (1931)	139383 (13889)
Completeness (%)	99.4 (75.2)	97.7 (85.3)
Averaged redundancy	5.3 (2.5)	6.3 (5.0)
Average $I/\sigma(I)$	26.0 (5.7)	20.8 (1.1)
R_{merge} (%)	3.6 (16.7)	3.7 (14.2)
Structure solution (AutoSol)		
No. of sites	3	
Skew	0.16	
CORR_{RMS}	0.88	
Figure of merit (FOM)	0.36	
Estimated map CC	0.56	
Structure building (AutoBuild)		
Residues built	99	
R_{work}	33.1	
R_{free}	37.3	
Map CC	0.75	
Refinement		
Resolution (Å)		10.0-1.7
R factor (%)		16.6 (17.1)
Free R factor (%)		22.5 (22.9)
Overall B factor (Å ²)		33.3
R.m.s. deviations		
Bond lengths (Å)		0.03
Bond angle (°)		2.85
Ramachandran plot (%)		
Most favoured		95.8

Additionally allowed	4.2
Nº of molecules	
Protein	3
Water	65
Sulphate ions	3
Thiocyanate ions	4
Glycerol	4

$\dagger R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$, onde $\langle I(hkl) \rangle$ representa a intensidade média das observações $I_i(hkl)$ da reflexão hkl . Valores em parêntesis são para alta resolução. *Skew* – Desvio de distribuição Gaussiana; CRR_{RMS} – densidade de correlação local r.m.s.

4.4.2 Análise estrutural da crotamina

4.4.2.1 Estrutura geral da crotamina

Cristais da Cro pertencem ao grupo espacial $I2_12_12_1$, com parâmetros de célula unitária $a = 66,92$, $b = 74,33$ e $c = 80,19$. Cristais da crotamina apresentam três moléculas na unidade assimétrica. O *fold* da crotamina está ilustrado na figura 25A. Resíduos Lys2 - Lys7 formam uma alfa-hélice (α_1) que cerca duas folhas betas antiparalelas, formadas pelos resíduos Gly9 - Pro13 (β_1) e Trp34 - Lys38 (β_2) situado no centro da molécula. Uma curta alfa-hélice (α_2) é formada pelos resíduos Pro20 - Ser23. O polipeptídeo é estabilizado por três pontes dissulfeto: Cys4 - Cys36, Cys11 - Cys30 e Cys18 - Cys37. A ponte dissulfeto entre os resíduos Cys4 - Cys36 ancora o primeiro segmento helicoidal (α_1) com o β_2 . β_1 e α_2 estão conectados através de um *loop* Lys14 - Leu19, e por sua vez, a segunda hélice (α_2) está conectada a β_2 por um longa região flexível formada pelos resíduos Asp24 - Arg33. Em geral, a topologia da crotamina pode ser classificada como $\alpha_1\beta_1\alpha_2\beta_2$. As folhas beta são estabilizadas por ligações de hidrogênio entre β_1 e β_2 , envolvendo os resíduos His10 - Cys37 e Phe12 - Lys35, e ligações de hidrogênio entre β_2 e α_2 , formada pelos resíduos Ser23 - Lys38. Duas pontes de hidrogênio conectam β_2 a região C-terminal β -turn. Como a Cro é relativamente pequena, todos os resíduos carregados, assim como os resíduos hidrofóbicos estão expostos ao solvente, uma condição que faz da Cro uma molécula extraordinariamente adesiva. Resíduos mais hidrofóbicos estão localizados de um lado da molécula e resíduos de carga positiva Lys2, Lys6, Lys7, Lys14, Lys16, Lys27, Lys35, Lys38, Lys39, Arg31 e Arg33 estão agrupados no lado oposto da molécula, como mostrado na figura 25BC.

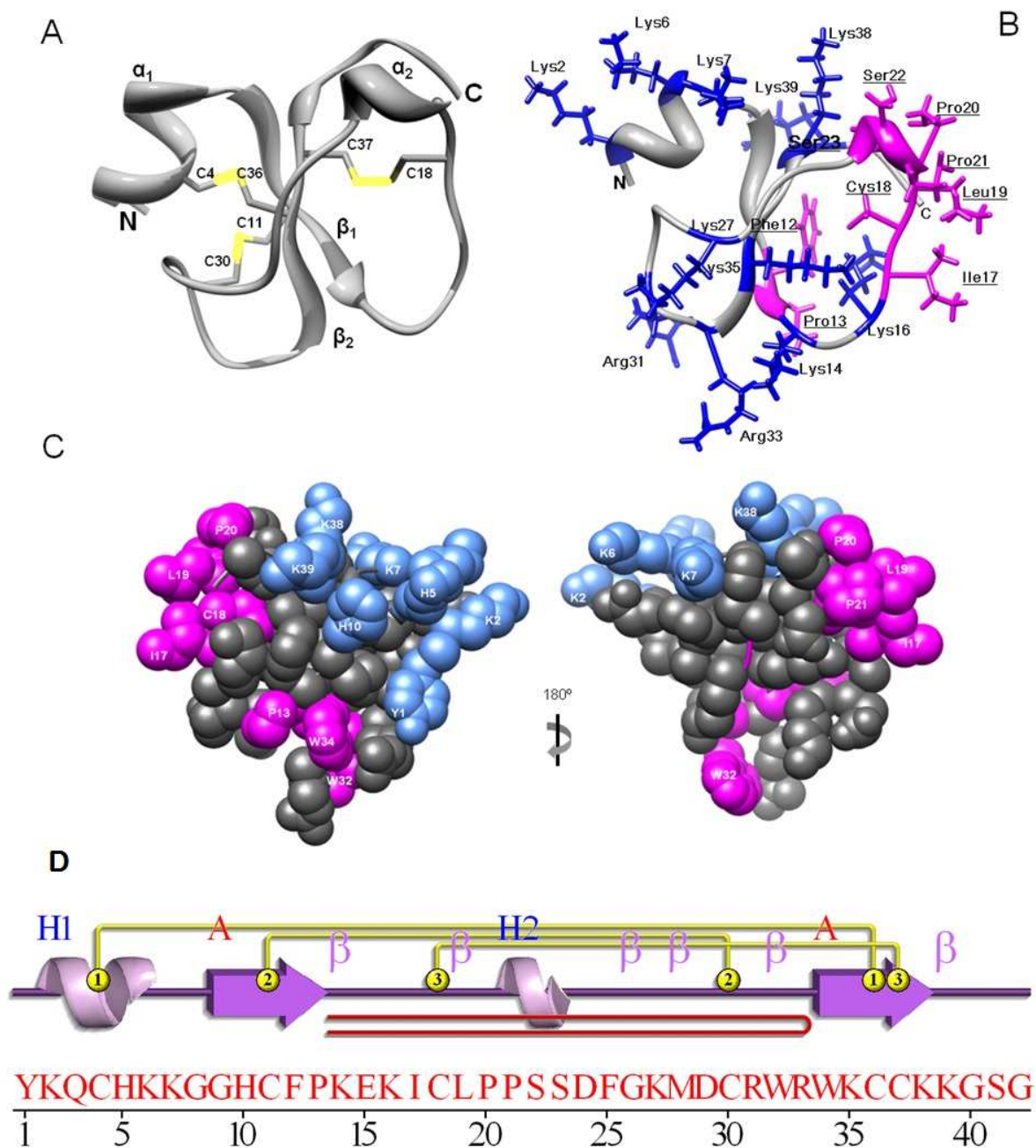


Figura 25 A) Estrutura 3D da crotonina. As regiões N- e C-Terminal estão sinalizadas, assim como as três pontes dissulfeto entre os resíduos Cys4-Cys35, Cys11-Cys30 e Cys18-Cys37. B) Os resíduos hidrofóbicos estão localizados em um lado da molécula (rosa) e os resíduos carregados positivamente (azul) estão posicionados no lado oposto. C) Representação *space-filling* da crotonina destacando a região anfifílica em rosa e azul. D) Representação esquemática da estrutura secundária.

Sobreposição entre a estrutura resolvida por NMR (1Z99) e a cristalográfica resultou em um significativo r.m.s.d. do $C\alpha$, com valor de 2,12 Å, indicando alto desvio espacial entre as estruturas, provavelmente devido à alta flexibilidade da estrutura em solução, determinada pelo método de NMR (Figura 26).

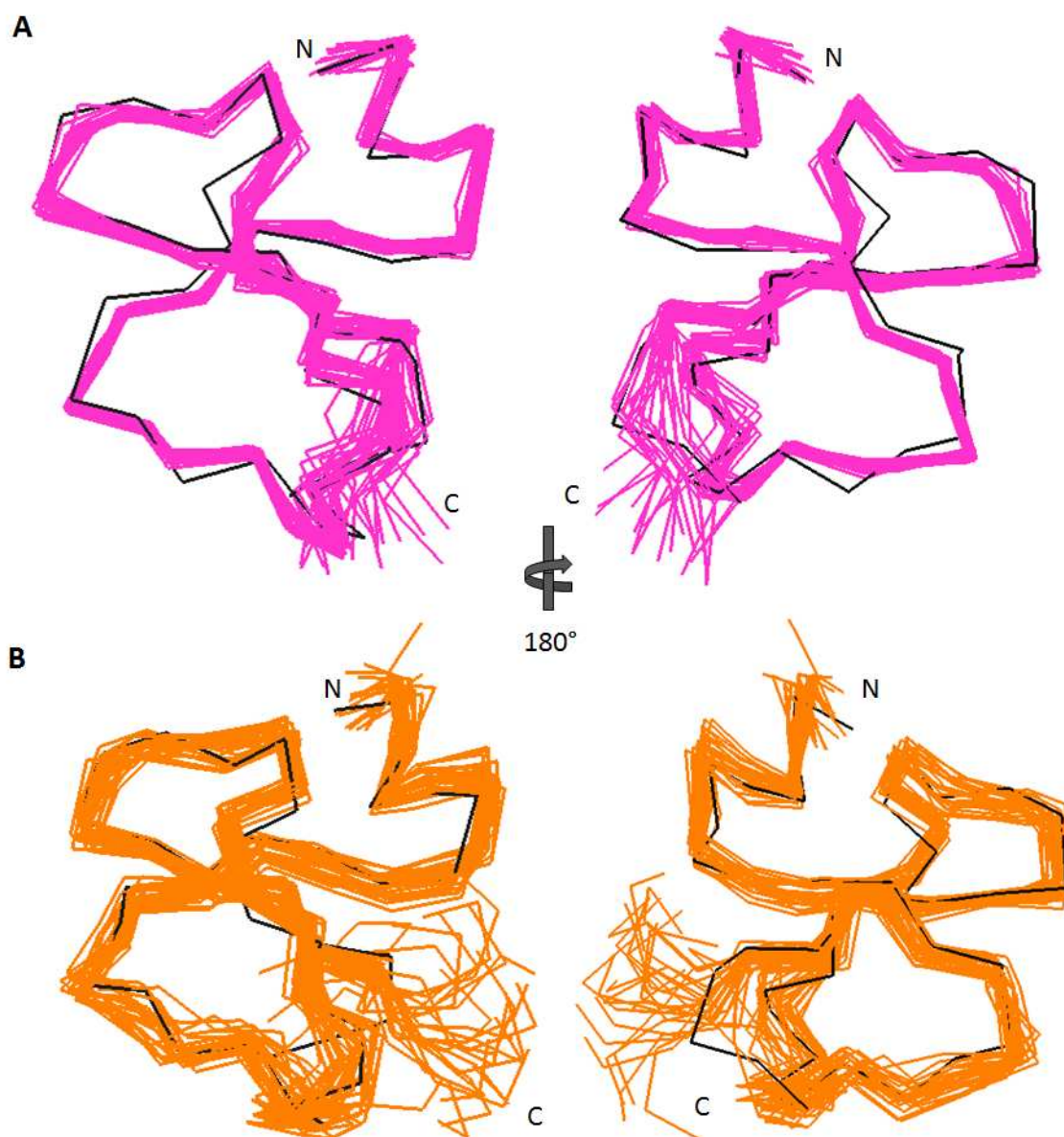


Figura 26 Sobreposição dos modelos de NMR da crotamina (Preto) com o modelo cristalográfico (C_{α}). A) Modelo de Nicastro e cols. (1H50 - Pink). B) Modelo de Fadel e cols. (1Z99 - Alaranjado). Rotação em 180° .

4.4.2.2 Arranjo quaternário da crotamina

Medidas de SAXS e DLS indicaram que a proteína se apresentava em forma monomérica em solução (CORONADO et al., 2012). Entretanto, no estado cristalino a proteína se comporta como um trimero, sendo mantido pela interação com íons de sulfato, glicerol e tiocianato. Uma inspeção cuidadosa dos dados cristalográficos das interações de estabilização do trimero exibiu a presença de dois íons de sulfato na interface das cadeias A e C, próximas aos

resíduos Cys11 e His10 da cadeia C e Lys16, Phe12 e Pro13 da cadeia A. Além disso, quatro moléculas de glicerol e três moléculas de tiocianato foram identificadas em posições quase equivalentes nas regiões de interface das cadeias A-B, B-C e C-A, formando pontes de hidrogênio, *Van der Waals* e interações hidrofóbicas, estabilizando o trimero. Alguns destes íons podem ser visualizados na figura 27. A figura 28 AB, mostra o arranjo quaternário do polipeptídeo, seguida pela apresentação esquemática dos contatos intermoleculares que envolvem átomos da cadeia principal e átomos da cadeia lateral dos aminoácidos (Figura 28, Tabela8).

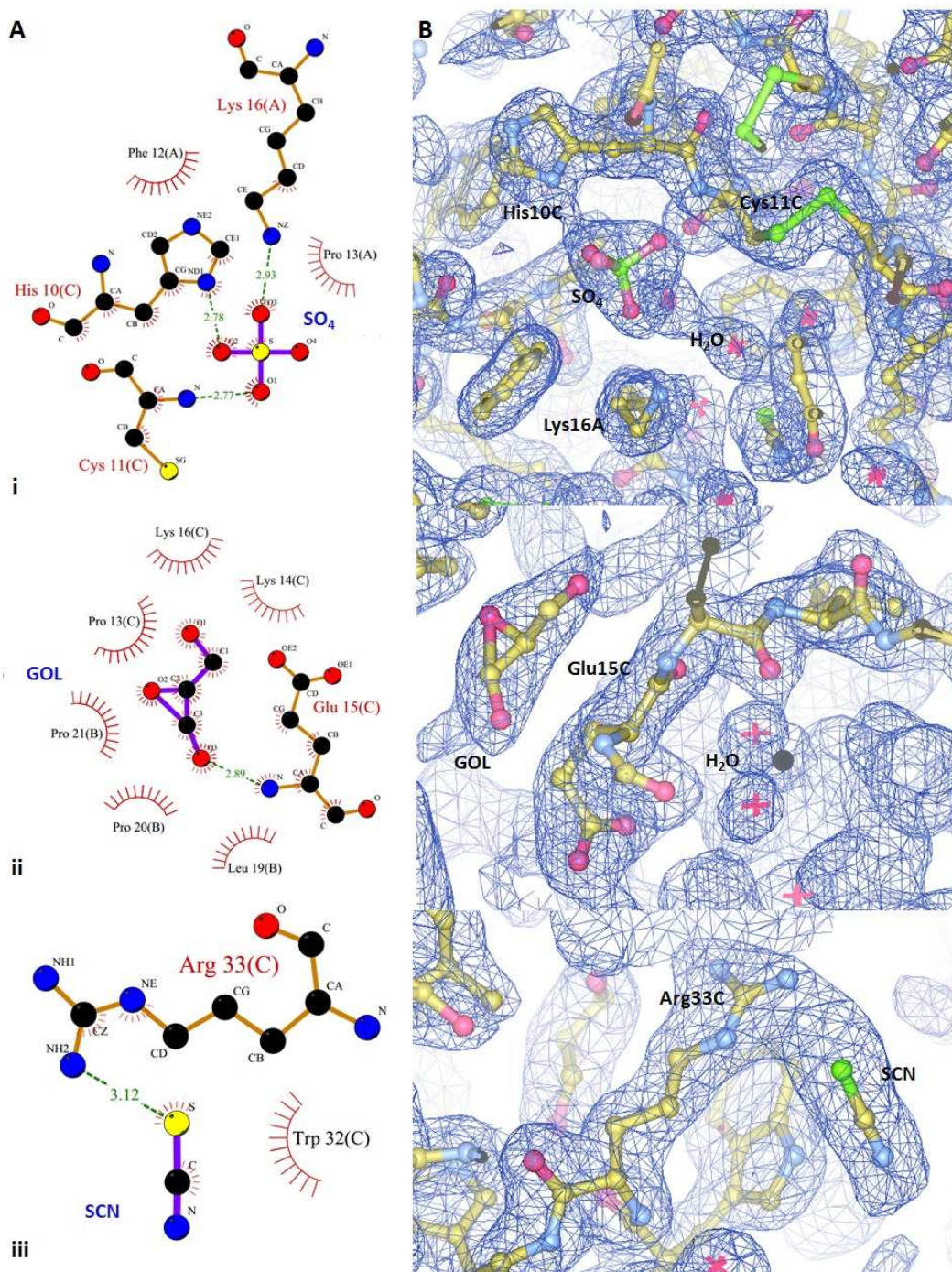


Figura 27 Representação dos íons que estabilizam o trimero. A) Representação esquemática, onde o “C” está representado pela cor preta, o “N”, azul e o “O” vermelho. As linhas pontilhadas em verde representam as pontes de hidrogênio. Semi-círculos representam os aminoácidos envolvidos nas interações hidrofóbicas. i, ii, iii) íons de SO₄²⁻, glicerol e SCN, respectivamente (esquema gerado pelo programa LIGPLOT). B) Representação dos mesmo íons no mapa de densidade eletrônica.

Tabela 8 Pontes de hidrogênio entres as moléculas da crotamina na unidade assimétrica.

A	B	C	Distância (Å)
Glu15 OE1	Lys35 NZ		3.27
Glu15 OE1	Cys18 N		2.91
Asp24 O	Lys14 NZ		3.11
Lys35 NZ	Glu15 OE1		2.95
Cys18 N	Glu15 OE1		2.89
Lys14 NZ	Pro21 O		3.00
Lys14 NZ	Asp24 O		2.79
	Cys11 O	Arg31 NH1	2.82
	Cys11 O	Arg31 NH2	2.97
	Arg31 NH2	Tyr1 OH	2.64

4.4.2.3 Semelhança estrutural entre crotamina e peptídeos antimicrobianos

A superfície carregada positivamente permite supor que a crotamina pode interagir eletrostaticamente com superfícies de membranas negativamente carregadas, com o potencial para induzir a formação de *gaps*, através do qual ions e/ou outras moléculas possam difundir (NICASTRO et al., 2003). A figura 29A e a Tabela 9 mostram a comparação de sequências e a característica estrutural do homólogo antimicrobiano (AMP) e peptídeos antimicrobiano-símile (defensina-símile) de diferentes origens. Os polipeptídeos defensinas-símile compartilham relativamente baixa identidade sequencial, na faixa de 15 – 35%, contudo, apresentam uma estrutura secundária homóloga de alfa-hélices, folhas-beta e *loops*, bem como seis resíduos de cisteína que formam três ligações dissulfeto (SCHIBLI et al., 2002). Uma comparação estrutural de três estruturas conhecidas de defensinas humanas, hβD-1, hβD-2 e hβD-3 com a crotamina é mostrado na figura 29B. Os correspondentes valores de r.m.s.d. do Cα são de 1,8, 1,8 e 2,6 Å, respectivamente.

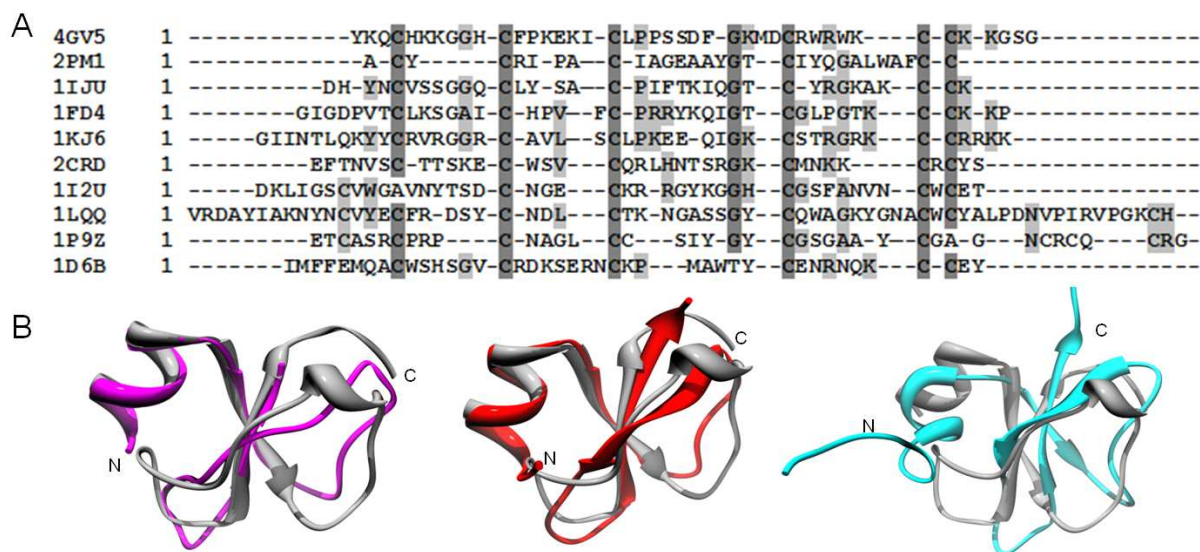


Figura 29 (A) Alinhamento sequencial dos peptídeos antimicrobianos (AMP). Resíduos conservados de cisteína estão destacados em cinza escuro. Crotamina (PDB 4GV5), peptídeo defensina-símile 2 (PDB 1D6B), heliomicina (PDB 1I2U), toxina-III (PDB 1LQQ), peptídeo antifúngico eucommia 2 (PDB 1P9Z), caribdotoxina (PDB 2CRD), hβ-defensina 1 (PDB 1IJU), hβ-defensina 2 (PDB 1FD4), hβ-defensina 3 (PDB 1KJ6) e hα-defensina 1 (PDB 2PM1). (B) Sobreposição da crotamina (cartoon plot) em cinza, com hβD-1 (PDB ID: 1IJU, rosa), hβD-2 (PDB ID: 1FD4, vermelho) e hβD-3 (PDB ID: 1KJ6, ciano). Correspondentes valores de *r.m.s.d.* do Cα: 1,8, 1,8 e 2,6 Å, respectivamente.

A predominância funcional de relevantes resíduos carregados positivamente (Tabela 10) é uma característica comum da Cro e das defensinas. Provavelmente, isso facilita as interações eletrostáticas com a superfície aniônica da membrana.

Tabela 9 Comparação da sequência de aminoácidos da crotamina com peptídeos α -, β -defensinas e defensina-símile.

AMP	Tamanho	Sequência dos aminoácidos	Estrutura secundária	Ponte dissulfeto	Organismo	PDB
CRO	42	YKQCHKKGGHCFPKEKICLPPSSDFGKMDC RWRWKCKKGGSG	α -helix aligned to antiparallel 2-stranded	3	<i>Crotalus d. terrificus</i>	4GV5
EAFP-2	30-43	ETCASRCPRPCNAGLCCSIYGYCGSGAAYC GAGNCRQCQCRG	2 α -helices aligned to 3- stranded β -sheet random coils	5	<i>Eucommia ulmoide</i>	1P9Z
CHTX	30-40	EFTNVSCTTSKECWVQCRLHNTSRGKCM NKKCRCYS	Small 3-strand β -sheet, α - helix, random coil	3	<i>Leiurus q. hebraeus</i>	2CRD
HEL	44	DKLIGSCVWGA VNYTSDCNGECKRRGYKG GHCGSFANVNCWCET	α -helix, 3-stranded anti- parallel β -sheet, random coil	3	<i>Heliothis virescen</i>	1I2U
Toxin-III	64	VRDAYIAKNYNCVYECFRDSYCNDLCTKNG ASSGYCQWAGKYGNACWCYALPDNVPIR VPGKCH	α -helix, 3-stranded anti- parallel β -sheet, random coil	4	<i>Leiurus q.</i> <i>quinquestriatus</i>	1LQQ
DLP-2	42	IMFFEMQACWSHSGVCRDKSERNCKPMA WTYCENRNQKCCEY	small α -helix, 2-stranded β - sheet, random coils	3	<i>Ornithorhynchus</i> <i>anatinus</i>	1D6B
HBD-1	36	DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQGT CYRGK AKCKK	α -helix, 3-stranded β -sheet, random coils	3	<i>Homo sapiens</i>	1IJU
HBD-2	41	GIGDPVTCLKSGAICHVPVFCPRRYKQIGTCG	α -helix, 3-stranded β -sheet,	3	<i>Homo sapiens</i>	1FD4

		LPGTKCCKKP	random coils			
HBD-3	45	GIINTLQKYYCRVRGGRCVLSCLPKKEEQIG KCSTRGRKCCRKK	α -helix, 3-stranded β -sheet, random coils	3	<i>Homo sapiens</i>	1KJ6
HNP-1	30	ACYCRIPACIAGEAAYGTCIYQGALWAFCC	3-stranded β -sheet, random coils	3	<i>Homo sapiens</i>	2PM1

Códigos dos aminoácidos estão representados por uma única letra.

Apesar da alta conservação estrutural, algumas diferenças físico-químicas entre as β -defensinas humanas e a Cro foram discutidos como prováveis determinantes das diferenças funcionais observadas (YOUNT et al., 2009). A arginina e lisina variam entre as três h β -defensinas e a Cro, como mostrado na Tabela 10. Estas distribuições de resíduos carregados também são típicas para β -defensinas de outros animais. Em contraste, resíduos de lisina são relativamente raros em α -defensinas. A predominância de resíduos positivamente carregados na Cro, facilita interações eletrostáticas com a superfície da membrana aniônica. A área de superfície de acessibilidade (ASA - *Accessible Surface Area*) da Cro e h β -defensinas diferem entre si, as mudanças na ASA ocorrem, quando resíduos na superfície da molécula são substituídos por outros resíduos com cadeia lateral longa ou curta (Tabela 10). As α -hélices, as folhas- β antiparalelas e os *loops* presente nas h β -defensinas 1-3 (HOOVER et al., 2001; HOOVER et al., 2000; SCHIBLI et al., 2002) também são conservadas na Cro.

Tabela 10 Comparação dos resíduos hidrofóbicos e da carga da Cro em comparação com outros peptídeos antimicrobianos; SA: *total surface accessibility* em Å².

	CRO	hβD-1	hβD-2	hβD-3	CHTX	DLP-2	HEL	Toxin-III	HNP-1	EAFP-2
Arg+	2	1	2	7	3	3	2	3	1	4
Asp-	2	1	1	--	--	1	2	4	--	--
Glu-	1	--	--	2	2	4	2	1	1	1
Lys+	9	4	5	6	4	3	3	4	--	--
Total	14	6	8	15	9	11	9	12	2	5
+ve	11	5	7	13	7	6	5	7	1	4
-ve	3	1	1	2	2	5	4	5	1	1
Trp	2	--	--	--	1	2	2	2	1	--
Tyr	1	3	1	--	1	2	2	7	3	3
Phe	2	1	1	--	1	2	1	1	1	--
SA (Å) ²	3223	2808	2858	4025	3019	3888	3060	4069	2246	2997

Figura 30 mostra uma visão geral das defensinas-símile, destacando as semelhanças e diferenças estruturais de polipeptídeos defensina-símile. Em todas as estruturas, os elementos da estrutura secundária e as pontes dissulfeto estão conservados, uma característica inicialmente atribuída para polipeptídeos classificados como defensinas. Entretanto, a toxina III e o peptídeo antifúngico eucommia 2 (EAFP-2) apresentam 4 e 5 ligações dissulfídicas, respectivamente. Entre os polipeptídeos antimicrobianos com seis cisteínas o grupo das α -defensinas e β -defensinas são os melhores caracterizados. Eles são largamente distribuídos em diferentes filos, incluindo plantas, insetos, artrópodes e vertebrados (GANZ, 2004; LEHRER; LICHTENSTEIN; GANZ, 1993). O peptídeo defensina-símile 2 (DLP-2), isolado do veneno do ornitorrinco (*Ornithorhynchus anatinus*) (TORRES et al., 2000) compartilha 34% de identidade de sequência com a crotamina, mas não apresenta atividade antimicrobiana. Heliomicina (HEL), que é conhecida por ser uma defensina antifúngica do lepidóptero *Heliothis virescens* (LAMBERTY et al., 2001; SVERDLOVA; NEFELOVA, 1999), contém dois resíduos de arginina e três resíduos de lisina e compartilha 22% de identidade sequencial com a Cro. Defensinas de insetos são caracterizadas por uma sequência ($CS\alpha\beta$ – *Cystein Stabilized $\alpha\beta$ motif*), que consiste de uma α -hélice e três folhas- β antiparalelas, interligadas por duas pontes dissulfeto (CORNET et al., 1995; LAMBERTY et al., 2001). A sequência $CS\alpha\beta$ também foi encontrada nas toxinas de escorpião, caribdotoxina (CHTX) (BONTEMS et al., 1992) e toxina III (LANDON et al., 1996) e em defensinas de plantas, tais como as defensinas EAFP-2 (CARVALHO; GOMES, 2011; HUANG, L. C.; JEAN; MCDERMOTT, 2005). Até hoje, esta sequência não foi observada em toxinas do veneno de serpentes. A estrutura da caribdotoxina, um peptídeo do veneno do escorpião amarelo *Leiurus q. hebraeus* que afeta canais de K^+ , compartilham aproximadamente 15% de similaridade da sequência com a crotamina. Em conclusão, a estrutura cristalográfica de alta resolução da Cro, mostra uma superfície assimétrica de distribuição de cargas, o que corresponde à atividade descrita na literatura. Crotamina é acentuadamente diferente de outros peptídeos célula penetrante devido à presença de seis cisteínas na sua sequência, o que confere uma característica das defensinas. A conformação obtida pela crotamina, devido às três pontes dissulfeto, produz restrições conformacionais e uma distribuição de cargas com propriedades únicas (KERKIS, A. et al., 2004). Sua carga e conformação estrutural indicam a sua atividade antimicrobiana, e também a sua atividade célula penetrante (GANZ, 2003;2004; KERKIS, A. et al., 2004). Kerkis e cols. (2004) propuseram que a habilidade de penetração, não é devido ao completo domínio polipeptídico. Entretanto, pequenos domínios demonstram ser responsáveis pela transdução. A sequência da crotamina entre os aminoácidos 2-18

(KQCHKKGGHCFPKEKIC) e 27 - 39 (KMDCRWRWKCKK) foram as duas regiões mais promissoras para NLS (*Nuclear Localization Signal or Sequence*) (KERKIS, A. et al., 2004). As tecnologias que utilizam CPPs estão sendo testadas como transportadores de vacinas terapêuticas antivirais e antitumorais (RICHARD et al., 2003; SILHOL et al., 2002). Por outro lado, os relatos anteriores observam homologia estrutural entre peptídeos antimicrobiano e outras classes de toxinas (NICASTRO et al., 2003; OGUIURA et al., 2011). No entanto, a afinidade estrutural e evolutiva entre essas moléculas, não estão ainda muito bem esclarecidas. Se existem tais relações mútuas entre elas, estas poderiam fornecer informações importantes relacionadas às origens moleculares. A reciprocidade entre a crotamina e β -defensinas humanas, foi presumida com base na homologia conformacional equivalente, propensão para a ruptura de membranas, carga catiônica e afinidades para alvos microbianos de superfície eletronegativas (OGUIURA et al., 2011; YOUNT et al., 2009).

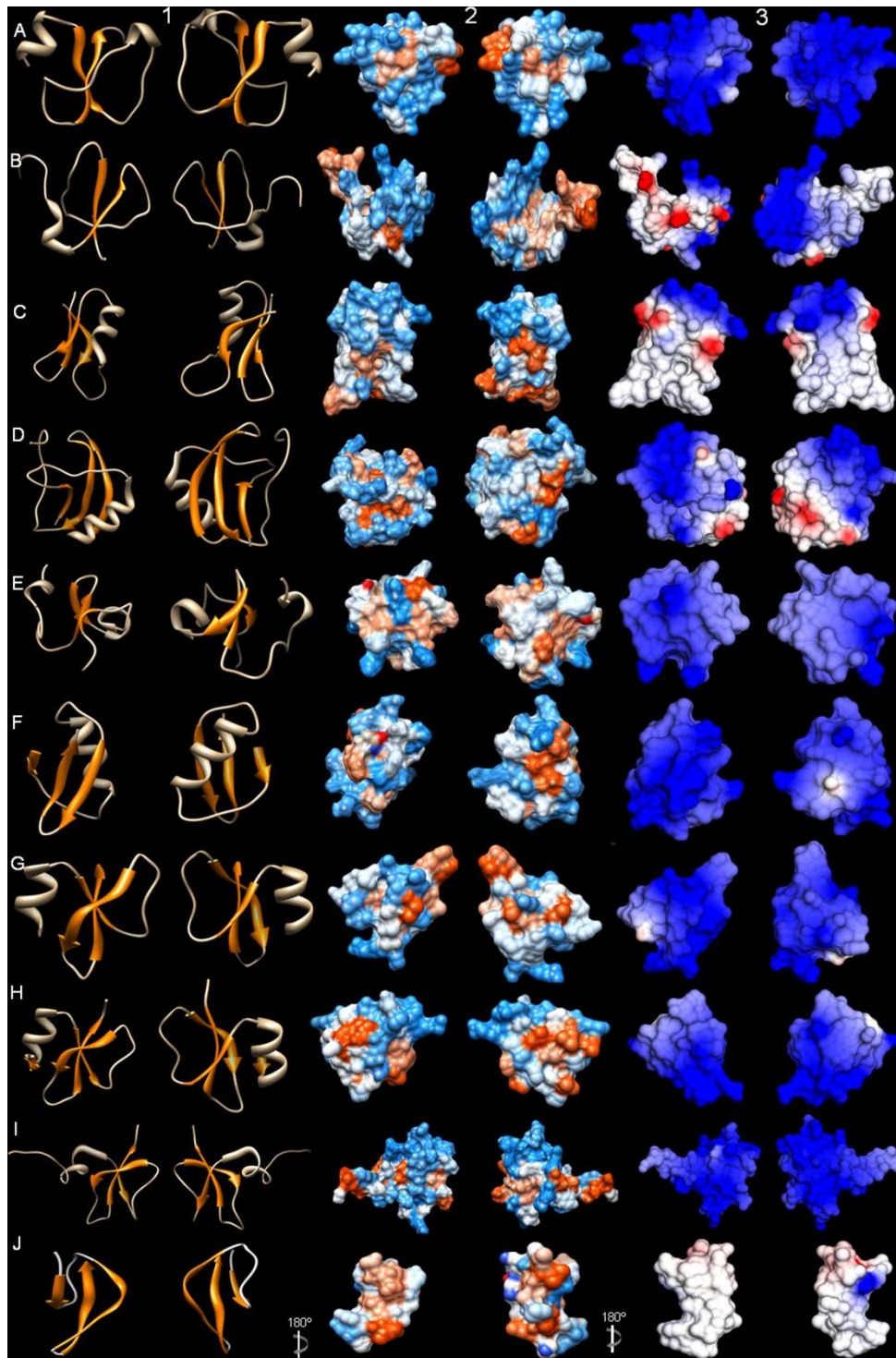


Figura 30 Comparação estrutural (em duas orientações, rotação de 180°) da Cro com homólogos antimicrobianos e peptídeos antimicrobiano-símile de diferentes organismos. 1) O domínio γ -core é mostrado em alaranjado. 2) Plotagem de hidropatia: alaranjado escuro/hidrofóbicos; alaranjado claro/intermediário; azul/hidrofílicos. 3) Carga da superfície: azul/básico, (Arg, Lys); vermelho/ácido, (Asp, Glu). Os dados são: (A) crotamina do veneno de *C.d.t.* (PDB 4GV5), (B) peptídeo defensina-símile 2 (PDB 1D6B), (C) heliomicina (PDB 1I2U), (D) toxina-III (PDB 1LQQ), (E) peptídeo antifúngico eucommia 2 (PDB 1P9Z), (F) caribdotoxina (PDB 2CRD), (G) h β -defensina 1 (PDB 1IJU), (H) h β -defensina 2 (PDB 1FD4), (I) h β -defensina 3 (PDB 1KJ6) e (J) h α -defensina 1 (PDB 2PM1).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os venenos de serpentes constituem uma fonte rica de moléculas bioativas, como peptídeos e proteínas com importantes atividades farmacológicas. A crotamina faz parte de um grupo de peptídeos com grande interesse farmacológico, podendo ser utilizada para o desenvolvimento de drogas usadas em terapias anti-câncer.

As defensinas-símile, isoladas do veneno de animais exibem significantes similaridades em sua estrutura tridimensional, embora demonstrem diferentes propriedades farmacológicas, o que as tornam intrigante, devido os diversos mecanismos de ação e a sua relação estrutura-função. Os estudos destes polipeptídeos tornam-se cada vez mais importantes para a descoberta de novos compostos e/ou para o desenho de modelos moleculares de interesse biotecnológico.

Além das atividades já descritas para a crotamina (antimicrobiana, antiproliferativa, defensina-símile), atualmente, diversos estudos vêm apresentando o uso da crotamina como um peptídeo célula-penetrante, sendo esta, capaz de atravessar a membrana celular carregando outras moléculas, por exemplo, plasmídeos de DNA ou drogas antitumorais.

A estrutura cristalográfica da crotamina vem para elucidar e facilitará a compreensão no modo de ação de outros peptídeos homólogos, como as miotoxinas e apoiará o desenho de novas moléculas capazes de transportar drogas para dentro das células.

6. PERSPECTIVAS

As perspectivas deste projeto vêm se projetando tanto na área de experimentação *in silico* quanto na área cristalográfica.

Seguindo uma área de experimentação *in silico*, uma abordagem complementar seria o emprego do método de *docking* das proteínas giroxina e crotamina com ligantes específicos e/ou na descoberta de novos ligantes com função biotecnológica.

Estudos preliminares da crotamina utilizando o método de GUV, nós observamos que em concentrações micromolares do polipeptídeo, este induziu a explosão das vesículas (GUVs) feitas de POPC e POPG, resultando no rápido vazamento interno do conteúdo da vesícula e no seu colapso.

Na presença de um específico ligante essa ação é completamente bloqueada. Estudos de cristalização, da crotamina com ligantes específicos, complementaria o entendimento do mecanismo de ação de muitos peptídeos homólogos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, P. D. et al. PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 58, n. Pt 11, p. 1948-54, Nov 2002.

AIRD, S. D.; KAISER, II; BIEBER, A. L. Nomenclature of biological toxins. **Toxicon**, v. 23, n. 2, p. 179-87, 1985.

AIRD, S. D. et al. Rattlesnake presynaptic neurotoxins: primary structure and evolutionary origin of the acidic subunit. **Biochemistry**, v. 24, n. 25, p. 7054-8, Dec 3 1985.

_____. A complete amino acid sequence for the basic subunit of crotoxin. **Arch Biochem Biophys**, v. 249, n. 2, p. 296-300, Sep 1986.

AIRD, S. D. et al. The amino acid sequence of the acidic subunit B-chain of crotoxin. **Biochim Biophys Acta**, v. 1040, n. 2, p. 217-24, Sep 3 1990.

ALEXANDER, G. et al. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. **Toxicon**, v. 26, n. 10, p. 953-60, 1988.

ALI, F. E. et al. Pharmacokinetics of novel antimicrobial cationic peptides NAB 7061 and NAB 739 in rats following intravenous administration. **J Antimicrob Chemother**, v. 64, n. 5, p. 1067-70, Nov 2009.

ARNOLD, R. R.; COLE, M. F.; MCGHEE, J. R. A bactericidal effect for human lactoferrin. **Science**, v. 197, n. 4300, p. 263-5, Jul 15 1977.

AVRAHAMI, D.; OREN, Z.; SHAI, Y. Effect of multiple aliphatic amino acids substitutions on the structure, function, and mode of action of diastereomeric membrane active peptides. **Biochemistry**, v. 40, n. 42, p. 12591-603, Oct 23 2001.

BARRAVIERA, B. Acute-phase response in snakebite. **Toxicon**, v. 32, n. 8, p. 861-2, Aug 1994a.

_____. Acute-phase response in snakebite. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 36, n. 5, p. 479, Sep-Oct 1994b.

BARRAVIERA, B. et al. A retrospective study of 40 victims of crotalus snake bites. Analysis of the hepatic necrosis observed in one patient. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 22, n. 1, p. 5-12, Jan-Mar 1989.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. Families and clans of serine peptidases. **Arch Biochem Biophys**, v. 318, n. 2, p. 247-50, Apr 20 1995.

BATTYE, T. G. G. et al. iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. **Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography**, v. 67, p. 271-281, Apr 2011.

BERG, J. M.; JOHN, L. T.; LUBERT, S. **Biochemistry**. 5 edition. W H Freeman, 2002.

BERGFORS, T. M. **Protein Crystallization: Techniques, Strategies and Tips**. Second Edition. International University Line, Biotechnology Series, 1999.

BJARNASON, J. B.; HAMILTON, D.; FOX, J. W. Studies on the mechanism of hemorrhage production by five proteolytic hemorrhagic toxins from *Crotalus atrox* venom. **Biol Chem Hoppe Seyler**, v. 369 Suppl, p. 121-9, May 1988.

BON, C. et al. Postsynaptic effects of crotoxin and of its isolated subunits. **Eur J Biochem**, v. 99, n. 3, p. 471-81, Sep 1979.

BON, C.; JENG, T. W. Crotoxin: a possible mechanism of action. **Adv Cytopharmacol**, v. 3, p. 231-5, 1979.

BONI-MITAKE, M. et al. Effects of (60)Co gamma radiation on crotoxin. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, n. 12, p. 1531-8, Dec 2001.

BONTEMS, F. et al. Analysis of side-chain organization on a refined model of charybdotoxin: structural and functional implications. **Biochemistry**, v. 31, n. 34, p. 7756-64, Sep 1 1992.

BORTOLETO, R. K. et al. Purification, characterization and crystallization of Jararacussin-I, a fibrinogen-clotting enzyme isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**, v. 40, n. 9, p. 1307-12, Sep 2002.

BRAZIL, O. V. Pharmacology of crystalline crotoxin. II. Neuromuscular blocking action. **Mem Inst Butantan**, v. 33, n. 3, p. 981-92, 1966.

BRAZIL, O. V.; EXCELL, B. J. Action of crotoxin and crotactin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) on the frog neuromuscular junction. **J Physiol**, v. 212, n. 2, p. 34P-35P, Jan 1971.

BREITHAUPT, H.; RUBSAMEN, K.; HABERMANN, E. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. Biochemical analysis of crotapotin and the basic *Crotalus* phospholipase A. **Eur J Biochem**, v. 49, n. 2, p. 333-45, Nov 15 1974.

BUCARETCHI, F. et al. Snakebites by *Bothrops* spp in children in Campinas, Sao Paulo, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 43, n. 6, p. 329-33, Nov-Dec 2001.

CARDOSO, F. C. et al. Molecular cloning and characterization of Phoneutria nigriventer toxins active on calcium channels. **Toxicon**, v. 41, n. 7, p. 755-63, Jun 2003.

CARVALHO, A. D.; GOMES, V. M. Plant Defensins and Defensin-Like Peptides - Biological Activities and Biotechnological Applications. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 38, p. 4270-4293, Dec 2011.

CHANG, C. C.; LEE, J. D. Crotoxin, the neurotoxin of South American rattlesnake venom, is a presynaptic toxin acting like beta-bungarotoxin. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 296, n. 2, p. 159-68, Jan 1977.

CHEYMOL, J. et al. [A comparison of the neuromuscular action of crotamine and the venom of *Crotalus durissus terrificus* var. *crotaminicus*. 2. Isolated preparations]. **Toxicon**, v. 9, n. 3, p. 287-9, Jul 1971.

COCIANCICH, S. et al. Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*. **J Biol Chem**, v. 268, n. 26, p. 19239-45, Sep 15 1993.

COCIANCICH, S. et al. Purification and characterization of a scorpion defensin, a 4kDa antibacterial peptide presenting structural similarities with insect defensins and scorpion toxins. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 194, n. 1, p. 17-22, Jul 15 1993.

COHN, M. L.; COHN, M. 'Barrel rotation' induced by somatostatin in the non-lesioned rat. **Brain Res**, v. 96, n. 1, p. 138-41, Oct 10 1975.

COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, N. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 50, n. Pt 5, p. 760-3, Sep 1 1994.

CORNET, B. et al. Refined three-dimensional solution structure of insect defensin A. **Structure**, v. 3, n. 5, p. 435-48, May 15 1995.

CORONADO, M. A. et al. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of crotamine, a myotoxic polypeptide from the Brazilian snake *Crotalus durissus terrificus*. **Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun**, v. 68, n. Pt 9, p. 1052-4, Sep 1 2012.

DE OLIVEIRA, D. G. et al. Structural and biological characterization of a crotapotin isoform isolated from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**, v. 42, n. 1, p. 53-62, Jul 2003.

DELOT, E.; BON, C. Model for the interaction of crotoxin, a phospholipase A2 neurotoxin, with presynaptic membranes. **Biochemistry**, v. 32, n. 40, p. 10708-13, Oct 12 1993.

DEUTSCH, H. F.; DINIZ, C. R. Some proteolytic activities of snake venoms. **J Biol Chem**, v. 216, n. 1, p. 17-26, Sep 1955.

EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 60, n. Pt 12 Pt 1, p. 2126-32, Dec 2004.

ENDO, T. et al. A proton nuclear magnetic resonance study on the solution structure of crotamine. **J Protein Chem**, v. 8, n. 6, p. 807-15, Dec 1989.

FADEL, V. et al. Automated NMR structure determination and disulfide bond identification of the myotoxin crotamine from *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v. 46, n. 7, p. 759-67, Dec 1 2005.

FAURE, G.; BON, C. Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v. 25, n. 2, p. 229-34, 1987.

_____. Crotoxin, a phospholipase A2 neurotoxin from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*: purification of several isoforms and comparison of their molecular structure and of their biological activities. **Biochemistry**, v. 27, n. 2, p. 730-8, Jan 26 1988.

FAURE, G. et al. The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Eur J Biochem**, v. 223, n. 1, p. 161-4, Jul 1 1994.

FAURE, G. et al. Crotoxin acceptor protein isolated from *Torpedo electric organ*: binding properties to crotoxin by surface plasmon resonance. **Toxicon**, v. 41, n. 4, p. 509-17, Mar 2003.

FAURE, G. et al. Comparison of crotoxin isoforms reveals that stability of the complex plays a major role in its pharmacological action. **Eur J Biochem**, v. 214, n. 2, p. 491-6, Jun 1 1993.

FAURE, G.; XU, H.; SAUL, F. A. Crystal structure of crotoxin reveals key residues involved in the stability and toxicity of this potent heterodimeric beta-neurotoxin. **J Mol Biol**, v. 412, n. 2, p. 176-91, Sep 16 2011.

GALDIERO, S. et al. Peptide-lipid interactions: experiments and applications. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 9, p. 18758-89, 2013.

GANZ, T. The role of antimicrobial peptides in innate immunity. **Integr Comp Biol**, v. 43, n. 2, p. 300-4, Apr 2003.

_____. Antimicrobial polypeptides. **J Leukoc Biol**, v. 75, n. 1, p. 34-8, Jan 2004.

GANZ, T. et al. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. **J Clin Invest**, v. 76, n. 4, p. 1427-35, Oct 1985.

GEORGIEVA, D. et al. Snake venom of *Crotalus durissus terrificus*--correlation with pharmacological activities. **J Proteome Res**, v. 9, n. 5, p. 2302-16, May 7 2010.

GONCALVES, J. M.; DEUTSCH, H. F. Ultracentrifugal and zone electrophoresis studies of some crotalidae venoms. **Arch Biochem Biophys**, v. 60, n. 2, p. 402-11, Feb 1956.

GONCALVES, J. M.; POLSON, A. The electrophoretic analysis of snake venoms. **Arch Biochem**, v. 13, n. 2, p. 253-9, May 1947.

GUTIERREZ, J. M. [**Biomedical research in Revista de Biologia Tropical**]. 2002. 941-9
ISBN 0034-7744 (Print)
0034-7744 (Linking).

GUTIERREZ, J. M.; CERDAS, L. [Mechanism of action of myotoxins isolated from snake venoms]. **Rev Biol Trop**, v. 32, n. 2, p. 213-22, Nov 1984.

HENDON, R. A.; FRAENKEL-CONRAT, H. Biological roles of the two components of crotoxin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 68, n. 7, p. 1560-3, Jul 1971.

HENDON, R. A.; TU, A. T. The role of crotoxin subunits in tropical rattlesnake neurotoxic action. **Biochim Biophys Acta**, v. 578, n. 1, p. 243-52, May 23 1979.

HOOVER, D. M.; CHERTOV, O.; LUBKOWSKI, J. The structure of human beta-defensin-1: new insights into structural properties of beta-defensins. **J Biol Chem**, v. 276, n. 42, p. 39021-6, Oct 19 2001.

HOOVER, D. M. et al. The structure of human beta-defensin-2 shows evidence of higher order oligomerization. **J Biol Chem**, v. 275, n. 42, p. 32911-8, Oct 20 2000.

HUANG, L. C.; JEAN, D.; MCDERMOTT, A. M. Effect of preservative-free artificial tears on the antimicrobial activity of human beta-defensin-2 and cathelicidin LL-37 in vitro. **Eye Contact Lens**, v. 31, n. 1, p. 34-8, Jan 2005.

HUANG, M. Z.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; KINI, R. M. Role of enzymatic activity in the antiplatelet effects of a phospholipase A2 from *Ophiophagus hannah* snake venom. **Life Sci**, v. 61, n. 22, p. 2211-7, 1997.

JOLIOT, A.; PROCHIANTZ, A. Transduction peptides: from technology to physiology. **Nat Cell Biol**, v. 6, n. 3, p. 189-96, Mar 2004.

KERKIS, A. et al. Properties of cell penetrating peptides (CPPs). **IUBMB Life**, v. 58, n. 1, p. 7-13, Jan 2006.

KERKIS, A. et al. Crotoxin is a novel cell-penetrating protein from the venom of rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **FASEB J**, v. 18, n. 12, p. 1407-9, Sep 2004.

KERKIS, I. et al. Biological versatility of crotoxin--a cationic peptide from the venom of a South American rattlesnake. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 19, n. 12, p. 1515-25, Dec 2010.

KOH, Y. S.; CHUNG, K. H.; KIM, D. S. Biochemical characterization of a thrombin-like enzyme and a fibrinolytic serine protease from snake (*Agkistrodon saxatilis*) venom. **Toxicon**, v. 39, n. 4, p. 555-60, Apr 2001.

KRIZAJ, I. et al. Re-examination of crotoxin-membrane interactions. **Toxicon**, v. 34, n. 9, p. 1003-9, Sep 1996.

LAMBERTY, M. et al. Solution structures of the antifungal heliomycin and a selected variant with both antibacterial and antifungal activities. **Biochemistry**, v. 40, n. 40, p. 11995-2003, Oct 9 2001.

LANDON, C. et al. 1H-NMR-derived secondary structure and the overall fold of the potent anti-mammal and anti-insect toxin III from the scorpion *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*. **Eur J Biochem**, v. 236, n. 2, p. 395-404, Mar 1 1996.

LAURE, C. J. [The primary structure of crotoxin (author's transl)]. **Hoppe Seylers Z Physiol Chem**, v. 356, n. 2, p. 213-5, Feb 1975.

LEDUC, M.; BON, C. Cloning of subunits of convulxin, a collagen-like platelet-aggregating protein from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Biochem J**, v. 333 (Pt 2), p. 389-93, Jul 15 1998.

LEE, C. Y. et al. A gene delivery system for human cells mediated by both a cell-penetrating peptide and a piggyBac transposase. **Biomaterials**, v. 32, n. 26, p. 6264-76, Sep 2011.

LEHRER, R. I.; LICHTENSTEIN, A. K.; GANZ, T. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. **Annu Rev Immunol**, v. 11, p. 105-28, 1993.

LENNON, B. W.; PLUMMER, D.; KAISER, II. Effects of subunit cross-linking on the properties of crotoxin. **Toxicon**, v. 28, n. 6, p. 718-22, 1990.

LESK, A. M.; LO CONTE, L.; HUBBARD, T. J. P. Assessment of novel fold targets in CASP4: Predictions of three-dimensional structures, secondary structures, and interresidue contacts. **Proteins-Structure Function and Bioinformatics**, p. 98-118, 2001.

LUNDBERG, P.; LANGEL, U. A brief introduction to cell-penetrating peptides. **J Mol Recognit**, v. 16, n. 5, p. 227-33, Sep-Oct 2003.

MADANI, F. et al. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. **J Biophys**, v. 2011, p. 414729, 2011.

MANCIN, A. C. et al. The analgesic activity of crotamine, a neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom: a biochemical and pharmacological study. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1927-37, Dec 1998.

MARCHI-SALVADOR, D. P. et al. Insights into the role of oligomeric state on the biological activities of crotoxin: crystal structure of a tetrameric phospholipase A2 formed by two isoforms of crotoxin B from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Proteins**, v. 72, n. 3, p. 883-91, Aug 15 2008.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1749-800, Dec 1998.

MELLO, L. E. et al. Convulxin does not induce convulsions when injected into the rat dorsal hippocampus. **Acta Physiol Pharmacol Latinoam**, v. 39, n. 4, p. 353-8, 1989.

MEROPS - The Peptidase Database. p. The Peptidase Database, Disponível em: < [HTTP://merops.sanger.ac.uk](http://merops.sanger.ac.uk) >. Acesso em: agosto-2013.

MIYATAKE, H.; HASEGAWA, T.; YAMANO, A. New methods to prepare iodinated derivatives by vaporizing iodine labelling (VIL) and hydrogen peroxide VIL (HYPER-VIL). **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 62, n. Pt 3, p. 280-9, Mar 2006.

MORITA, T. Structure-function relationships of C-type lectin-related proteins. **Pathophysiol Haemost Thromb**, v. 34, n. 4-5, p. 156-9, 2005.

MURAKAMI, M. T. et al. Initial structural analysis of an alpha4beta4 C-type lectin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 59, n. Pt 10, p. 1813-5, Oct 2003.

MURAKAMI, M. T. et al. Crystal structure of the platelet activator convulxin, a disulfide-linked alpha4beta4 cyclic tetramer from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 310, n. 2, p. 478-82, Oct 17 2003.

NAGEM, R. A.; DAUTER, Z.; POLIKARPOV, I. Protein crystal structure solution by fast incorporation of negatively and positively charged anomalous scatterers. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 57, n. Pt 7, p. 996-1002, Jul 2001.

NASCIMENTO, F. D. et al. Crotoamine mediates gene delivery into cells through the binding to heparan sulfate proteoglycans. **J Biol Chem**, v. 282, n. 29, p. 21349-60, Jul 20 2007.

NELSON, D. N.; COX, M. M. **principles of Biochemistry**. Fourth Edition. 2004.

NICASTRO, G. et al. Solution structure of crotoamine, a Na⁺ channel affecting toxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Eur J Biochem**, v. 270, n. 9, p. 1969-79, May 2003.

OGUIURA, N. et al. In vitro antibacterial and hemolytic activities of crotoamine, a small basic myotoxin from rattlesnake *Crotalus durissus*. **J Antibiot (Tokyo)**, v. 64, n. 4, p. 327-31, Apr 2011.

OGUIURA, N.; BONI-MITAKE, M.; RADIS-BAPTISTA, G. New view on crotoamine, a small basic polypeptide myotoxin from South American rattlesnake venom. **Toxicon**, v. 46, n. 4, p. 363-70, Sep 15 2005.

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

OUYANG, C.; TENG, C. M.; HUANG, T. F. Characterization of snake venom principles affecting blood coagulation and platelet aggregation. **Adv Exp Med Biol**, v. 281, p. 151-63, 1990.

OWNBY, C. L.; AIRD, S. D.; KAISER, II. Physiological and immunological properties of small myotoxins from the venom of the midget faded rattlesnake (*Crotalus viridis concolor*). **Toxicon**, v. 26, n. 3, p. 319-23, 1988.

PAWELEK, P. D. et al. The structure of L-amino acid oxidase reveals the substrate trajectory into an enantiomerically conserved active site. **EMBO J**, v. 19, n. 16, p. 4204-15, Aug 15 2000.

PEIGNEUR, S. et al. Crotoamine pharmacology revisited: novel insights based on the inhibition of KV channels. **Mol Pharmacol**, v. 82, n. 1, p. 90-6, Jul 2012.

PETOUKHOV, M. V. et al. ATSAS 2.1 - towards automated and web-supported small-angle scattering data analysis. **Journal of Applied Crystallography**, v. 40, p. S223-S228, Apr 2007.

PONCE-SOTO, L. A. et al. Structural and biological characterization of two crotamine isoforms IV-2 and IV-3 isolated from the *Crotalus durissus cumanensis* venom. **Protein J**, v. 26, n. 8, p. 533-40, Dec 2007.

POOGA, M. et al. Cell penetration by transportan. **FASEB J**, v. 12, n. 1, p. 67-77, Jan 1998.

POOGA, M. et al. Galanin-based peptides, galparan and transportan, with receptor-dependent and independent activities. **Ann N Y Acad Sci**, v. 863, p. 450-3, Dec 21 1998.

PRADO-FRANCESCHI, J.; BRAZIL, O. V. Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v. 19, n. 6, p. 875-87, 1981.

RANDON, J. et al. 3 Deazaadenosine and L-homocysteine inhibit platelet aggregation induced by collagen and convulxin through a phospholipase A2 independent mechanism. **Thromb Res**, v. 28, n. 2, p. 269-74, Oct 15 1982.

RAW, I. et al. Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Braz J Med Biol Res**, v. 19, n. 3, p. 333-8, 1986.

RAWLINGS, N. D.; TOLLE, D. P.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of peptidase inhibitors. **Biochem J**, v. 378, n. Pt 3, p. 705-16, Mar 15 2004.

RICHARD, J. P. et al. Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. **J Biol Chem**, v. 278, n. 1, p. 585-90, Jan 3 2003.

RIZZI, C. T. et al. Crotamine inhibits preferentially fast-twitching muscles but is inactive on sodium channels. **Toxicon**, v. 50, n. 4, p. 553-62, Sep 15 2007.

RODRIGUES, M. et al. Molecular characterization of the interaction of crotamine-derived nucleolar targeting peptides with lipid membranes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1818, n. 11, p. 2707-17, Nov 2012.

RUBSAMEN, K.; BREITHAUPT, H.; HABERMANN, E. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. I. Subfractionation and recombination of the crotoxin complex. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 270, n. 3, p. 274-88, 1971.

RUPP, B. Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to Structural Biology. **Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to Structural Biology**, p. 1-809, 2010.

SANO-MARTINS, I. S. et al. Hematological changes induced by Bothrops jararaca venom in dogs. **Braz J Med Biol Res**, v. 28, n. 3, p. 303-12, Mar 1995.

SAÚDE, M. D. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animal Peçonhento.**: Fundação Nacional da Saúde 2001.

SCHIBLI, D. J. et al. The solution structures of the human beta-defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus*. **J Biol Chem**, v. 277, n. 10, p. 8279-89, Mar 8 2002.

SEKI, C.; VIDAL, J. C.; BARRIO, A. Purification of gyroxin from a South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom. **Toxicon**, v. 18, n. 3, p. 235-47, 1980.

SERRANO, S. M.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1115-32, Jun 15 2005.

SILHOL, M. et al. Different mechanisms for cellular internalization of the HIV-1 Tat-derived cell penetrating peptide and recombinant proteins fused to Tat. **Eur J Biochem**, v. 269, n. 2, p. 494-501, Jan 2002.

SLOTTA, K.; PRIMOSIGH, J. [Chemical studies of snake venom, VI. Composition of crotoxin]. **Mem Inst Butantan**, v. 23, p. 51-61, 1950.

SLOTTA, K. H.; FRAENKEL-CONRAT, H. Two active proteins from rattlesnake venom. **Nature**, v. 142, p. 213-213, Jul-Dec 1938.

SLOTTA, K. H.; PRIMOSIGH, J. Amino-acid composition of crotoxin. **Nature**, v. 168, n. 4277, p. 696-7, Oct 20 1951.

SMOLKA, M. B. et al. Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme, balterobin, from the venom of *Bothrops alternatus*. **Toxicon**, v. 36, n. 7, p. 1059-63, Jul 1998.

SNYDER, E. L.; DOWDY, S. F. Recent advances in the use of protein transduction domains for the delivery of peptides, proteins and nucleic acids in vivo. **Expert Opin Drug Deliv**, v. 2, n. 1, p. 43-51, Jan 2005.

STUBBS, M. T.; BODE, W. Structure and specificity in coagulation and its inhibition. **Trends Cardiovasc Med**, v. 5, n. 4, p. 157-66, Jul-Aug 1995.

SUHR, S. M.; KIM, D. S. Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 224, n. 1, p. 134-9, Jul 5 1996.

SVERDLOVA, A. N.; NEFELOVA, M. V. [Ionophore characteristics of heliomycin]. **Mol Gen Mikrobiol Virusol**, n. 3, p. 34-40, 1999.

TORRES, A. M. et al. Defensin-like peptide-2 from platypus venom: member of a class of peptides with a distinct structural fold. **Biochem J**, v. 348 Pt 3, p. 649-56, Jun 15 2000.

TOYAMA, M. H. et al. Biochemical characterization of two crotamine isoforms isolated by a single step RP-HPLC from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and their action on insulin secretion by pancreatic islets. **Biochim Biophys Acta**, v. 1474, n. 1, p. 56-60, Mar 6 2000.

TOYAMA, M. H. et al. Structural, enzymatic and biological properties of new PLA(2) isoform from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, v. 41, n. 8, p. 1033-8, Jun 2003.

TOYAMA, O. D. et al. Structure-function relationship of new crotamine isoform from the *Crotalus durissus cascavella*. **Protein J**, v. 24, n. 1, p. 9-19, Jan 2005.

VARGAFTIG, B. B. Platelet activation by non-coagulant snake venom components. **Toxicon**, v. 20, n. 1, p. 279-87, 1982.

VITAL BRAZIL, O. Streptomycin effect on the skeletal muscle stimulation produced by acetylcholine. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v. 130, p. 136-40, Feb 1 1961.

WANG, P. et al. Antimicrobial specificity and mechanism of action of disulfide-removed linear analogs of the plant-derived Cys-rich antimicrobial peptide Ib-AMP1. **Peptides**, v. 30, n. 12, p. 2144-9, Dec 2009.

WINN, M. D.; MURSHUDOV, G. N.; PAPIZ, M. Z. Macromolecular TLS refinement in REFMAC at moderate resolutions. **Macromolecular Crystallography, Pt D**, v. 374, p. 300-321, 2003.

WOLZ-RICHTER, S.; ESSER, K. H.; HESS, A. Antinociceptive activity of crotoxin in the central nervous system: A functional Magnetic Resonance Imaging study. **Toxicon**, v. 74C, p. 44-55, Nov 2013.

YOUNT, N. Y. et al. Selective reciprocity in antimicrobial activity versus cytotoxicity of hBD-2 and crotamine. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 35, p. 14972-7, Sep 1 2009.

ZIMMERMAN, K. D.; GATES, G. R.; HEATWOLE, H. Effects of venom of the olive sea snake, *Aipysurus laevis*, on the behaviour and ventilation of three species of prey fish. **Toxicon**, v. 28, n. 12, p. 1469-78, 1990.

Apêndice A

A1 *Malign.py* (ZIMMERMAN; GATES; HEATWOLE, 1990)

```

# Step 2: family alignment
# Prepare an initial multiple family alignment of all structures and sequences
# related to your target sequence. For simplicity, only those structures found
# by search.py are aligned here. In general, you should add all the related
# structures found in $MODINSTALL/modlib/seqfilt_3.0_30_XN.grp and all the
# related sequences that you can find by FASTA, BLAST, in papers, etc. For
# example, 2fdn, identified by search.py, is also related to
# 1clf 1fca 1fdn 1fdx 2fdn, as found in
# $MODINSTALL/modlib/CHAINS_3.0_40_XN.grp.
# Note: if you wanted to align more than one sequence (in addition to the
# target sequence) you'd have to modify the 'align_strs_seq' routine.

from modeller.scripts import align_strs_seq

log.verbose()
env = environ()

# Set defaults
# Directories with input atom files:
env.io.atom_files_directory = './../atom_files'
# Identity matrix filename:
env.matrix_file = 'fer2.id.mat'
# Write out the superposed structures:
env.write_fit = True
# Some alignment parameters:
env.overhang = 4

aln = align_strs_seq(env,
    # Name of the input file specifying templates and the
    # target sequence:
    segfile='2AIP.pdb2.seg',
    # Output alignment filename ('PIR' format)
    alnfile='DNCASE.ali',
    # Structures' PDB codes:
    knowns=('2AIP.pdb'),
    # Target sequence code:
    sequence='Gyroxin')

# Write out the alignment in the 'PAP' format, too:
aln.write(file='Gyroxin.pap', alignment_format='PAP')

```

A2 Model.py

```
# A sample script for fully automated comparative modeling
```

```
from modeller.automodel import * # Load the automodel class
```

```
log.verbose()
```

```
env = environ()
```

```
env.io.hydrogen = env.io.hetatm = env.io.water = True # to read any HETATM #
```

```
# directories for input atom files
```

```
env.io.atom_files_directory = './../atom_files'
```

```
a = automodel(env,
```

```
    # file with template codes and target sequence
```

```
    alnfile = 'DNCase.ali',
```

```
    # PDB codes of the templates
```

```
    knowns = '2AIP.pdb',
```

```
    # code of the target
```

```
    sequence = 'Gyroxin')
```

```
a.auto_align() # get an automatic alignment
```

```
a.make() # do homology modelling
```

A3 *Otimize.py*

```
# Step 2: family alignment
#
# Prepare an initial multiple family alignment of all structures and sequences
# related to your target sequence. For simplicity, only those structures found
# by search.py are aligned here. In general, you should add all the related
# structures found in $MODINSTALL/modlib/seqfilt_3.0_30_XN.grp and all the
# related sequences that you can find by FASTA, BLAST, in papers, etc. For
# example, 2fdn, identified by search.py, is also related to
# 1clf 1fca 1fdn 1fdx 2fdn, as found in
# $MODINSTALL/modlib/CHAINS_3.0_40_XN.grp.
#
# Note: if you wanted to align more than one sequence (in addition to the
# target sequence) you'd have to modify the 'align_strs_seq' routine.

from modeller.automodel import *

log.verbose()
env = environ()
env.io.hydrogen = env.io.hetatm = env.io.water = True

a = automodel(env, alnfile='Subtilisin.ali', knowns=('2AIP.pdb'), sequence='Gyroxin')
# Very thorough VTFM optimization:
a.library_schedule = 1
a.max_var_iterations = 300
# Very thorough MD optimization:
a.md_level = refine.very_slow
# Repeat the whole cycle 8-times and do not stop unless obj.func. > 1E6
a.repeat_optimization = 8
a.max_molpdf = 1e6

a.make()
```

PUBLICAÇÕES

Anwar Ullah,^a Monika Coronado,^a Mário T. Murakami,^b Christian Betzel^c and Raghuvir K. Arni^{a*}

^aCentro Multiusuário de Inovação Biomolecular, Departamento de Física, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 15054-000 São José do Rio Preto-SP, Brazil, ^bLaboratório Nacional de Biociências (LNBio), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, 13083-970 Campinas-SP, Brazil, and

^cLaboratory of Structural Biology of Infection, Institute of Biochemistry and Molecular Biology, University of Hamburg, c/o DESY, Notkestrasse 85, Building 22a, D-22603 Hamburg, Germany

Correspondence e-mail: arni@sjrp.unesp.br

Received 28 November 2011

Accepted 20 December 2011

Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of an L-amino-acid oxidase from *Bothrops jararacussu* venom

Snake-venom L-amino-acid oxidases (SV-LAAOs) trigger a wide range of local and systematic effects, including inhibition of platelet aggregation, cytotoxicity, haemolysis, apoptosis and haemorrhage. These effects mainly arise from the uncontrolled release of the hydrogen peroxide that is produced by the redox reaction involving L-amino acids catalyzed by these flavoenzymes. Taking their clinical relevance into account, few SV-LAAOs have been structurally characterized and the structural determinants responsible for their broad direct and indirect pharmacological activities remain unclear. In this work, an LAAO from *Bothrops jararacussu* venom (BJu-LAAO) was purified and crystallized. The BJu-LAAO crystals belonged to space group $P2_1$, with unit-cell parameters $a = 66.38$, $b = 72.19$, $c = 101.53$ Å, $\beta = 90.9^\circ$. The asymmetric unit contained two molecules and the structure was determined and partially refined at 3.0 Å resolution.

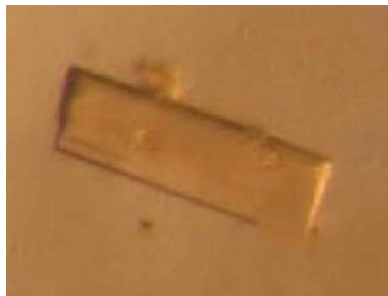
1. Introduction

The flavoenzyme L-amino-acid oxidase (LAAO; EC 1.4.3.2) catalyses the oxidative deamination of L-amino acids to the corresponding α -keto acids with the concomitant liberation of ammonia (NH_3) and hydrogen peroxide (H_2O_2) (Zhang *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2010). These enzymes have been isolated from organisms such as bacteria (Arima *et al.*, 2009), fungi (Yang *et al.*, 2009) and plants (Du & Clemetson, 2002; Kasai *et al.*, 2010), fish-skin mucus (Kitani *et al.*, 2007; Nagashima *et al.*, 2009) and snake venoms (Stábeli *et al.*, 2007). A number of snake venoms (SV-LAAOs) contain LAAO as the major component, which results in the characteristic yellow colour often exhibited by these venoms (Stábeli *et al.*, 2007; Tempone *et al.*, 2001).

LAAOs display many pathological activities such as cytotoxicity (Rodrigues *et al.*, 2009; Alves *et al.*, 2008), inhibition of platelet aggregation (Alves *et al.*, 2008; Li *et al.*, 1994), haemolysis, apoptosis and haemorrhage (Stábeli *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2003). The pathway or mechanism by which SV-LAAOs participate in venom toxicity remains unclear. However, the liberation of the H_2O_2 formed by the re-oxidation of the transiently reduced cofactor FAD by molecular oxygen (MacHeroux *et al.*, 2001) is likely to play an important role in the toxicity of the venoms since the bactericidal activity of LAAO is inhibited by catalase, thereby suggesting that hydrogen peroxide might play a central role in these processes (Stábeli *et al.*, 2007).

LAAOs are homodimeric and glycosylated, with a relative molecular weight of between 110 and 150 kDa; they consist of two identical subunits of 65 kDa and have an isoelectric point in the range 4.7–8.8 (Stábeli *et al.*, 2007; Du & Clemetson, 2002). Typically, snakes possess more than one gene encoding LAAO (Stiles *et al.*, 1991).

Currently, structural information is only available for four LAAOs: a bacterial LAAO from *Rhodococcus opacus* (Faust *et al.*, 2007) and three SV-LAAOs from *Agkistrodon halys pallas* (Zhang *et al.*, 2004), *Calloselasma rhodostoma* (Moustafa *et al.*, 2006) and *Vipera ammodytes ammodytes* (Georgieva *et al.*, 2011). Previous studies have shown that SV-LAAOs exist as homodimers and are formed of three domains: an FAD-binding domain, a substrate-binding domain and a helical domain (Georgieva *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2004; Faust *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2011).



This structural study is aimed at elucidating the first structure of an SV-LAAO from a snake belonging to the *Bothrops* genus and will help in understanding the differences in the specificities of these enzymes.

2. Materials and methods

2.1. Venom collection and purification

Desiccated crude *B. jararacussu* venom was purchased from a local serpentarium (Sanmaru Ltda, Taquaral, São Paulo, Brazil). A 125 mg sample of desiccated crude venom was suspended in 1.5 ml Tris–HCl buffer consisting of 0.02 M Tris, 0.15 M NaCl pH 8.0 and centrifuged at 10 000g for 10 min. The clear supernatant (1 ml) was applied onto a 16 × 60 cm Sephacryl S-100 column previously equilibrated with 0.02 M Tris–HCl pH 8.0 buffer containing 0.15 M NaCl. The protein was eluted at a flow rate of 0.2 ml min⁻¹ and 1 ml fractions were collected. The absorption at 280 nm was monitored and all fractions were analyzed by SDS–PAGE. The above procedure was repeated twice (data not presented).

The fractions corresponding to the second peak in the size-exclusion chromatography step were pooled and concentrated to 0.5 ml using a microconcentrator (Amicon) with a membrane cutoff of 30 kDa. This fraction was then applied onto a Mono Q 5/50 GL column. The column was washed with 0.02 M Tris–HCl buffer pH 8.0 (eluent A) and the bound fractions were eluted with an NaCl step gradient using 0.02 M Tris–HCl pH 8.0 plus 1 M NaCl as eluent B. All purification steps were performed at room temperature.

Electrophoresis in polyacrylamide gels in the presence of 0.01% SDS and β-mercaptoethanol was performed using the methodology described by Laemmli (1970) and the gels were stained with silver.

Protein concentrations were determined according to the micro-biuret method (Itzhaki & Gill, 1964) using bovine serum albumin as the standard.

2.2. Crystallization

The LAAO sample was concentrated to 9 mg ml⁻¹ using micro-concentrators and stored in 0.02 M Tris–HCl pH 8.0 buffer at 253 K. Crystallization was performed by the hanging-drop vapour-diffusion method in 24-well tissue-culture plates (Jancarik & Kim, 1991) using commercially available crystallization screens such as Crystal Screen,

Table 1

Data-collection and rigid-body refinement statistics.

Data collection	
Temperature (K)	100
Radiation source	Brazilian Synchrotron Light Laboratory
Data-processing software	DENZO/SCALEPACK
Beamline	W01B-MX2
Wavelength (Å)	1.458
Detector	MAR Mosaic 225 mm
Space group	<i>P</i> 2 ₁
Unit-cell parameters (Å, °)	<i>a</i> = 66.38, <i>b</i> = 72.19, <i>c</i> = 101.53, β = 90.9
Resolution range (Å)	30.0–3.0 (3.11–3.00)
No. of unique reflections	16155 (1403)
Multiplicity	2.4 (2.3)
<i>R</i> _{merge} (%)	13.2 (35.1)
<i>I</i> /σ(<i>I</i>)	5.1 (1.8)
Data analysis	
Matthews coefficient (Å ³ Da ⁻¹)	1.8
Solvent content (%)	33.3
Molecules per asymmetric unit	2

Crystal Screen 2, Grid Screen PEG 6000 and Grid Screen Ammonium Sulfate kits (Hampton Research) and The PEGs Suite (Qiagen). Typically, 1 μl drops of protein solution were mixed with an equal volume of the screening solution and equilibrated over a reservoir containing 0.5 ml of the latter solution. Thin crystals that were suitable for X-ray diffraction experiments were obtained when the reservoir consisted of 0.1 M sodium acetate trihydrate pH 4.6 and 25% (w/v) PEG 1000.

2.3. Data collection and processing

An LAAO crystal was directly flash-cooled in a 100 K nitrogen-gas stream. X-ray diffraction data were collected on the W01B-MX2 beamline at the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS, Campinas, Brazil). The wavelength of the radiation source was set to the maximum flux at 1.458 Å (Guimarães *et al.*, 2009) and a MAR Mosaic 225 mm CCD detector was used to record the X-ray diffraction intensities. The LAAO crystal was exposed for 90 s per 2° rotation in φ; the crystal-to-detector distance was set to 100 mm and a total of 180 images were collected. The data were indexed, integrated and scaled using the DENZO and SCALEPACK programs from the HKL-2000 package (Otwinowski & Minor, 1997). Data-collection and processing statistics are summarized in Table 1. Molecular replacement was carried out using the program MOLREP (Vagin &

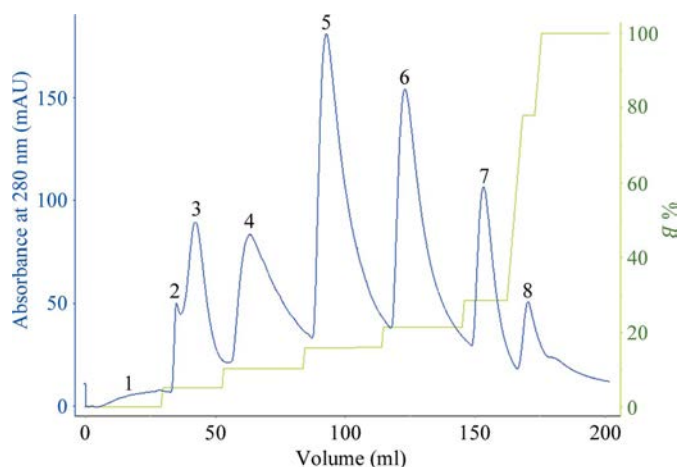


Figure 1 Ion-exchange chromatographic profile (Mono Q 5/50 GL) of the second peak from size-exclusion chromatography. Blue and green lines indicate the absorbance at 280 nm and the elution buffer concentration, respectively.

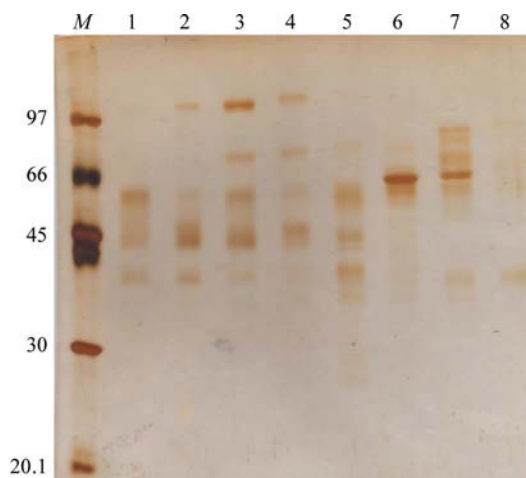


Figure 2 SDS–PAGE of protein fractions obtained from ion-exchange chromatography. Lane M, molecular-weight markers (labelled in kDa); lanes 1–8, corresponding protein peaks (5 μg). Peak 6 represents the purified *B. jararacussu* LAAO.

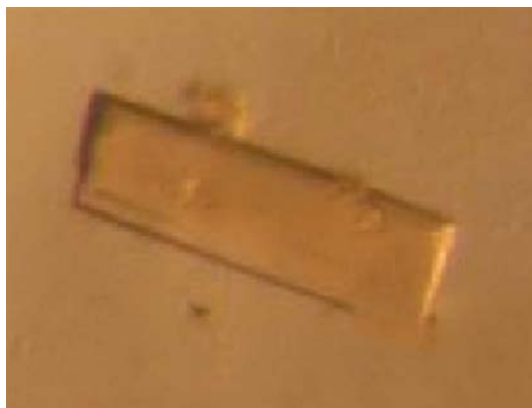


Figure 3
Photomicrograph of an LAAO crystal.

Teplyakov, 2010) and a model based on the atomic coordinates of native LAAO from *V. a. ammodytes* (PDB entry 3kve; Georgieva *et al.*, 2011).

3. Results and discussion

An LAAO was isolated from the crude venom of *B. jararacussu* by a two-step procedure consisting of size-exclusion and ion-exchange chromatography. Size-exclusion chromatography resulted in six peaks. The second peak displayed the typical yellow colour of LAAOs and SDS-PAGE indicated a molecular weight of around 65 kDa, which probably corresponds to the protein of interest. Thus, fractions from peak 2 were pooled, concentrated to 0.5 ml and applied onto an ion-exchange column, which resulted in the further separation of eight peaks (Fig. 1); the presence of LAAO with a purity of >95% was confirmed in peak 6 (Fig. 2). This procedure yielded 6.2 mg LAAO from 125 mg crude *B. jararacussu* venom. The purified protein was concentrated to 9 mg ml⁻¹ in 20 mM Tris-HCl buffer pH 8.0 and submitted to crystallization trials. Large single crystals were obtained when the enzyme solution was mixed with and equilibrated against a reservoir solution consisting of 0.1 M sodium acetate trihydrate pH 4.6 and 25% (w/v) PEG 1000 (Fig. 3).

Thin plate-shaped LAAO crystals with a maximum dimension of 300 µm diffracted to a maximum resolution of 3.0 Å and the reflections were indexed in space group *P*₂₁. Taking into consideration the molecular weight (65 kDa) and the presence of two molecules in the asymmetric unit, this results in a Matthews coefficient (Matthews, 1968) of 1.84 Å³ Da⁻¹, which corresponds to a solvent content of 33.3%. Data-collection and processing statistics are presented in Table 1.

The atomic coordinates of the LAAO from *V. a. ammodytes* (PDB code 3kve; Georgieva *et al.*, 2011), which shares a sequence identity of 86.5% with the LAAO from *B. jararacussu*, were used to generate a search model for molecular-replacement calculations carried out using the program *MOLREP* (Vagin & Teplyakov, 2010). A clear solution was obtained for two molecules in the asymmetric unit in space group *P*₂₁. *REFMAC5* (Murshudov *et al.*, 2011) was used for

rigid-body refinement and resulted in an *R* factor of 25.4% and an *R*_{free} of 31.5%. Structure determination of the native LAAO and the preparation of complexes with substrate analogues are currently in progress.

This research was supported by grants from FAPESP, CNPq, CAPES, DAAD and TWAS.

References

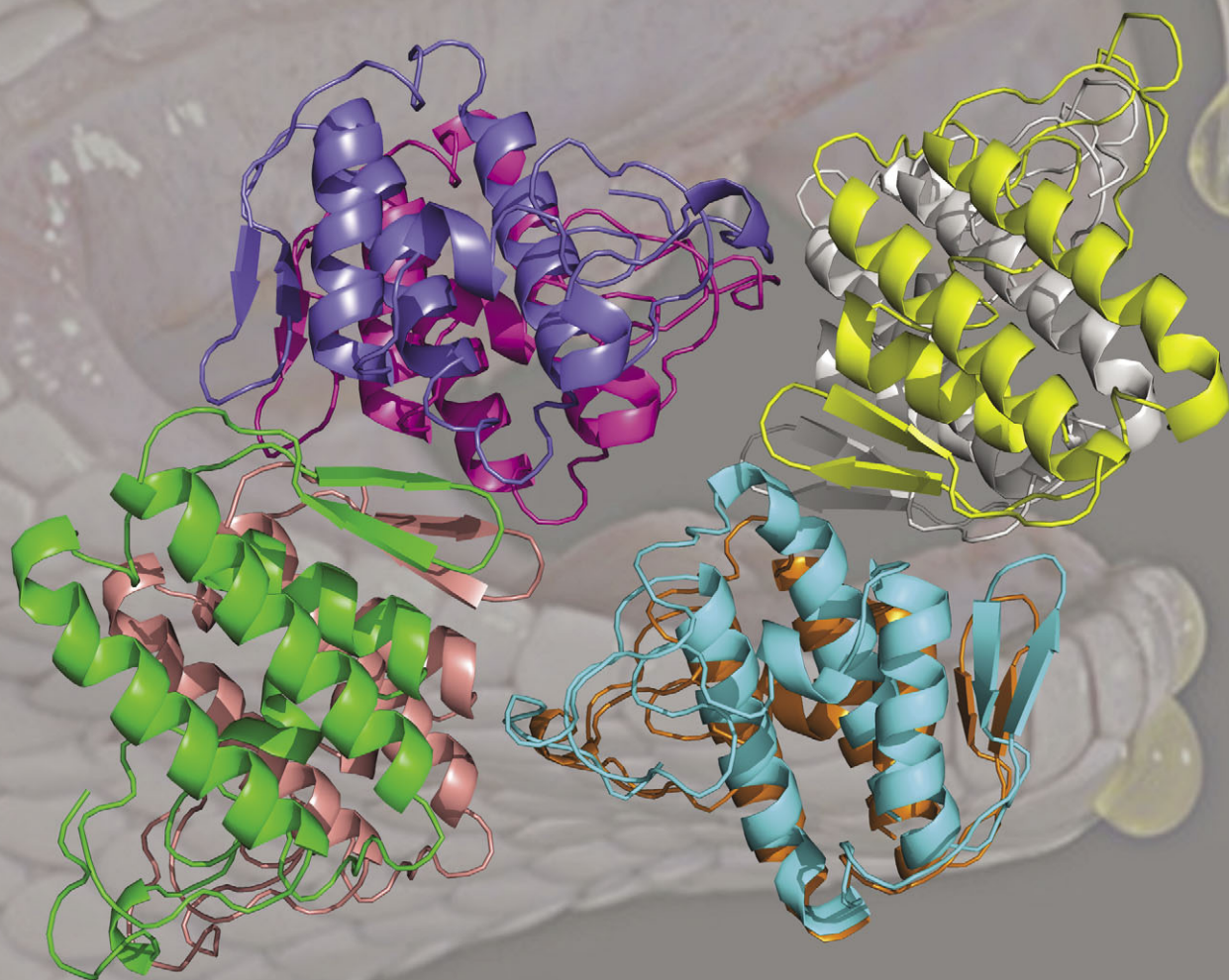
- Alves, R. M., Antonucci, G. A., Paiva, H. H., Cintra, A. C. O., Franco, J. J., Mendonça-Franqueiro, E. P., Dorta, D. J., Giglio, J. R., Rosa, J. C., Fuly, A. L., Dias-Baruffi, M., Soares, A. M. & Sampaio, S. V. (2008). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **151**, 542–550.
- Arima, J., Sasaki, C., Sakaguchi, C., Mizuno, H., Tamura, T., Kashima, A., Kusakabe, H., Sugio, S. & Inagaki, K. (2009). *FEBS J.* **276**, 3894–3903.
- Du, X.-Y. & Clemetson, K. J. (2002). *Toxicol.* **40**, 659–665.
- Faust, A., Niefind, K., Hummel, W. & Schomburg, D. (2007). *J. Mol. Biol.* **367**, 234–248.
- Georgieva, D., Murakami, M., Perband, M., Arni, R. & Betzel, C. (2011). *Mol. Biosyst.* **7**, 379–384.
- Guimarães, B. G., Sanfelici, L., Neuenschwander, R. T., Rodrigues, F., Grizzolli, W. C., Raulik, M. A., Piton, J. R., Meyer, B. C., Nascimento, A. S. & Polikarpov, I. (2009). *J. Synchrotron Rad.* **16**, 69–75.
- Itzhaki, R. F. & Gill, D. M. (1964). *Anal. Biochem.* **9**, 401–410.
- Jancarik, J. & Kim, S.-H. (1991). *J. Appl. Cryst.* **24**, 409–411.
- Kang, T. S. *et al.* (2011). *FEBS J.* **278**, 4544–4576.
- Kasai, K., Ishikawa, T., Komata, T., Fukuchi, K., Chiba, M., Nozaka, H., Nakamura, T., Sato, T. & Miura, T. (2010). *FEBS J.* **277**, 453–465.
- Kitani, Y., Tsukamoto, C., Zhang, G., Nagai, H., Ishida, M., Ishizaki, S., Shimakura, K., Shiomi, K. & Nagashima, Y. (2007). *FEBS J.* **274**, 125–136.
- Laemmli, U. K. (1970). *Nature (London)*, **227**, 680–685.
- Li, Z.-Y., Yu, T.-F. & Lian, E. C.-Y. (1994). *Toxicol.* **32**, 1349–1358.
- MacHeroux, P., Seth, O., Bollschweiler, C., Schwarz, M., Kurfürst, M., Au, L.-C. & Ghisla, S. (2001). *Eur. J. Biochem.* **268**, 1679–1686.
- Matthews, B. W. (1968). *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497.
- Moustafa, I. M., Foster, S., Lyubimov, A. Y. & Vrielink, A. (2006). *J. Mol. Biol.* **364**, 991–1002.
- Murshudov, G. N., Skubák, P., Lebedev, A. A., Pannu, N. S., Steiner, R. A., Nicholls, R. A., Winn, M. D., Long, F. & Vagin, A. A. (2011). *Acta Cryst. D67*, 355–367.
- Nagashima, Y., Tsukamoto, C., Kitani, Y., Ishizaki, S., Nagai, H. & Yanagimoto, T. (2009). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **154**, 55–61.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). *Methods Enzymol.* **276**, 307–326.
- Rodrigues, R. S., da Silva, J. F., França, J. B., Fonseca, F. P., Otaviano, A. R., Silva, F. H., Hamaguchi, A., Magro, A. J., Braz, A. S., dos Santos, J. I., Homs-Brandeburgo, M. I., Fontes, M. R., Fuly, A. L., Soares, A. M. & Rodrigues, V. M. (2009). *Biochimie*, **91**, 490–501.
- Stábeli, R. G., Sant'Ana, C. D., Ribeiro, P. H., Costa, T. R., Tielci, F. K., Pires, M. G., Nomizo, A., Albuquerque, S., Malta-Neto, N. R., Marins, M., Sampaio, S. V. & Soares, A. M. (2007). *Int. J. Biol. Macromol.* **41**, 132–140.
- Stiles, B. G., Sexton, F. W. & Weinstein, S. A. (1991). *Toxicol.* **29**, 1129–1141.
- Sun, M.-Z., Guo, C., Tian, Y., Chen, D., Greenaway, F. T. & Liu, S. (2010). *Biochimie*, **92**, 343–349.
- Temponne, A. G., Andrade, H. F., Spencer, P. J., Lourenço, C. O., Rogero, J. R. & Nascimento, N. (2001). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **208**, 620–624.
- Vagin, A. & Teplyakov, A. (2010). *Acta Cryst. D66*, 22–25.
- Yang, H.-H., Yang, S. L., Peng, K.-C., Lo, C.-T. & Liu, S.-Y. (2009). *Mycol. Res.* **113**, 924–932.
- Zhang, H., Teng, M., Niu, L., Wang, Y., Wang, Y., Liu, Q., Huang, Q., Hao, Q., Dong, Y. & Liu, P. (2004). *Acta Cryst. D60*, 974–977.
- Zhang, Y.-J., Wang, J.-H., Lee, W.-H., Wang, Q., Liu, H., Zheng, Y.-T. & Zhang, Y. (2003). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **309**, 598–604.

Molecular BioSystems

Indexed in
MEDLINE!

www.molecularbiosystems.org

Volume 8 | Number 5 | May 2012 | Pages 1377–1596



ISSN 1742-206X

RSC Publishing

PAPER

Dessislava Georgieva *et al.*

Crystal structure of a dimeric Ser49 PLA₂-like myotoxic component of the *Vipera ammodytes meridionalis* venom reveals determinants of myotoxicity and membrane damaging activity.



1742-206X(2012)8:5;1-8

Crystal structure of a dimeric Ser49 PLA₂-like myotoxic component of the *Vipera ammodytes meridionalis* venom reveals determinants of myotoxicity and membrane damaging activity

Dessislava Georgieva,^{ab} Monika Coronado,^a Dominik Oberthür,^a Friedrich Buck,^c Deyan Duhlov,^d Raghuvir K. Arni^e and Christian Betzel^{*ae}

Received 6th December 2011, Accepted 1st February 2012

DOI: 10.1039/c2mb05490f

Myotoxicity and membrane damage play a central role in the life-threatening effects of the viper envenomation. Myotoxins are an important part of the viper venomics. A Ser49 PLA₂-like myotoxin from the venom of *Vipera ammodytes meridionalis*, the most venomous snake in Europe, was crystallized and its three-dimensional structure determined. The toxin is devoid of phospholipolytic activity. The structure demonstrates a formation of dimers. In the dimers functionally important peptide segments, located on the protein surface, point in the same direction which can strengthen the pharmacological effect. This supports the hypothesis about the physiological importance of the toxin oligomerization for the myotoxicity and membrane damage. The crystallographic model revealed that the structural determinants of myotoxicity (a positively charged C-terminal region and a hydrophobic knuckle) are fully exposed on the protein surface and accessible for interactions with target membranes. Distortion of the catalytic site region explains the absence of enzymatic activity. The structure reveals anion-binding sites which can be considered as possible sites of interactions of the toxin with a negatively charged membrane surface. The high structural similarity of the Ser49 myotoxin and Asp49 PLA₂ from the same venom suggests an evolutionary relationship: probably, the Ser49 myotoxin is a product of evolution of the catalytically active phospholipase A₂. The first toxin lost the enzymatic activity which is not necessary for the myotoxicity but preserved the cytotoxicity and membrane damaging activity as important components of the venom toxicity.

Introduction

Myonecrosis is a life-threatening effect of the envenomation by snakes from the family Viperidae. Myotoxicity and membrane damage are physiological activities exerted by structurally related but catalytically different snake venom toxins. Three types of 14 kDa single chain myotoxins were found in the venoms of Viperidae snakes: Asp49, Lys49 and Ser49 (see ref. 1, 2 and references therein). They are PLA₂s or catalytically inactive PLA₂ homologues and differ in the type of the residue occupying the position 49 in the polypeptide chain which leads to a loss of

catalytic activity in the lysyl and seryl isoforms. The carboxyl group of residue 49 binds calcium which is important for the lipolytic activity of Asp49 myotoxins stabilizing the tetrahedral intermediate during catalysis.³ Lys49 isoforms exhibit low or no enzymatic activity.^{4,5} However, myotoxicity is independent of enzymatic activity.^{6,7} Structural and phylogenetic investigations were undertaken on a number of Lys49 PLA₂-like snake venom myotoxins in order to understand the structural basis of myotoxicity. A heparin-binding, cytolytic and myotoxic region was identified in the myotoxin II from the *Bothrops asper* venom.^{8,9} Structure–function relationships were analysed in the myotoxin II from the *Atropoides (Bothrops) nummifer* venom.¹⁰ These investigations showed the important role of the C-terminal region of the polypeptide chain for the pharmacological activity. The crystal structure of a Lys49 myotoxin from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*^{11,12} was determined. Crystallographic investigations on several snake venom Lys49 PLA₂ homologues and their complexes with inhibitors of myotoxicity (suramin, polyethylene glycol) were performed in order to elucidate the structural determinants of myotoxicity.^{13–16} Crystal structures of a Lys49 myotoxin from

^a Institute of Biochemistry and Molecular Biology, University of Hamburg, Laboratory of Structural Biology of Infection and Inflammation, c/o DESY, Build. 22a, 22603 Hamburg, Germany. E-mail: Christian.Betzel@uni-hamburg.de; Fax: +49 40 8998 4747

^b Institute of Organic Chemistry, Bulgarian Academy of Sciences, “Akad. G. Bonchev”-str. Bl.9, 1113 Sofia, Bulgaria

^c Institute of Clinical Chemistry, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistrasse 52, 20246 Hamburg, Germany

^d BUL BIO–NCIPD Ltd, “Y. Sakasov”-Str. 26, Sofia, Bulgaria

^e Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular,

Departamento de Física, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto, 15054-000, SP, Brazil

the *Agkistrodon contortrix laticinctus* venom revealed that the presence of a ligand in a hydrophobic channel induces the exposure of a hydrophobic surface important for the pharmacological activity.¹⁷

While data about the structure–pharmacological activity relationships of a number of myotoxic Asp49 PLA₂s and their Lys49 homologues from snake venoms are available, considerably less is known about the Ser49 isoforms. A myotoxin with Ser in position 49 was isolated from the venom of *Vipera ammodytes ammodytes* and named ammodytin L (AtnL).² The amino acid sequence² and the nucleotide sequence of cDNA encoding this toxin¹⁸ were determined. It was shown that the toxin induces membrane leakage.¹⁹ Ammodytin L binds fatty acids by an autocatalytic process²⁰ and its effect on L-6 cells from rat skeletal muscle depends on the degree of cell differentiation.²¹ The lipolytic activity was restored by substituting Ser49 and three other residues in the calcium binding loop.²² Enzymatically active Ser49 PLA₂ was isolated from the venom of *Echis carinatus sochureki*²³ and characterized.²⁴

In the present paper we describe the crystallization and three-dimensional structure determination of a Ser49 PLA₂-like myotoxin isolated from the venom of *Vipera ammodytes meridionalis*, one of the most venomous snakes in Europe. The toxin is devoid of catalytic activity. Structural determinants of the toxicity are characterized and the physiological role of dimerization for the myotoxicity of Ser49 toxins is discussed.

Results

Overall structure

The crystal of the myotoxin belonged to the space group *P*2₁ with unit cell dimensions of *a* = 76.97 Å, *b* = 47.67 Å and *c* = 126.62 Å. There are eight molecules in the asymmetric unit forming four dimers (Fig. 1). The data-collection and refinement statistics are summarized in Table 1. The eight molecules have the same organization of the secondary and tertiary structures. Each monomer consists of three α-helices

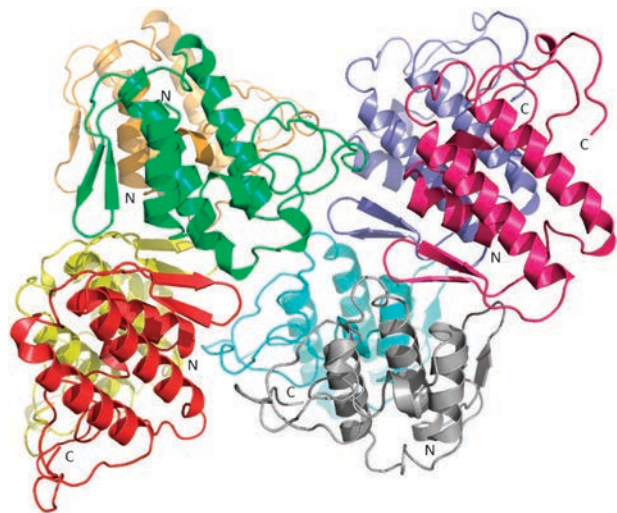


Fig. 1 The eight monomers in the asymmetric unit of the *Vipera a. meridionalis* Ser49 PLA₂-like myotoxin crystal are organized into four dimers.

Table 1 Data collection and refinement statistics^a

Data collection statistics	
Beamline	Consortiums beamline X13; HASYLAB, DESY
Temperature/K	100
Wavelength/Å	0.81
Space group	<i>P</i> 2 ₁
Unit-cell parameters: <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> /Å	76.97, 47.67, 126.62
Resolution range	50–2.95 (3.00–2.95)
Measured reflections	216 248
Unique reflections	21 213
Completeness (%)	95.5 (93.9)
Multiplicity	2.7
Average <i>I</i> /σ(<i>I</i>)	7.9 (3.8)
<i>R</i> _{merge} ^b (%)	9.4 (19.7)
Refinement statistics	
Resolution range	40–2.97 (3.05–2.97)
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free} (%)	22.4/26.1 (26.7/33.3)
Asymmetric unit content:	
Protein atoms	7467
Water molecules	91
Rms bond-length deviation/Å	0.01
Rms bond angle deviation/°	1.30
Mean <i>B</i> factor/Å ²	27.74
Ramachandran plot analysis	
Most favored regions (%)	84.1
Allowed regions (%)	15.8
Generously allowed regions (%)	0.1

^a Values in parentheses are for the highest resolution shell. ^b *R*_{merge} is defined as $\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$, where *I*_{*i*}(*hkl*) is the *i*th intensity measurement of reflection *hkl* and $\langle I(hkl) \rangle$ is the average intensity from multiple observations.

(residues 2–13, 40–54 and 89–109, respectively), an anti-parallel β-sheet including residues 74–85 which extends outwards from the protein globule (the so called “β-wing”) and loops (Fig. 2). The mutual orientation of the two long and antiparallel helices (Ala40–Ser54 and Thr89–Asn109) is fixed by two disulfide bonds, Cys44–Cys105 and Cys51–Cys98. The structure is stabilized by other five S–S bridges, Cys27–Cys126, Cys61–Cys91, Cys29–Cys45, Cys84–Cys96 and Cys50–Cys133. The structure of Ser49 myotoxin is similar to those of Asp49 and Lys49 isoforms

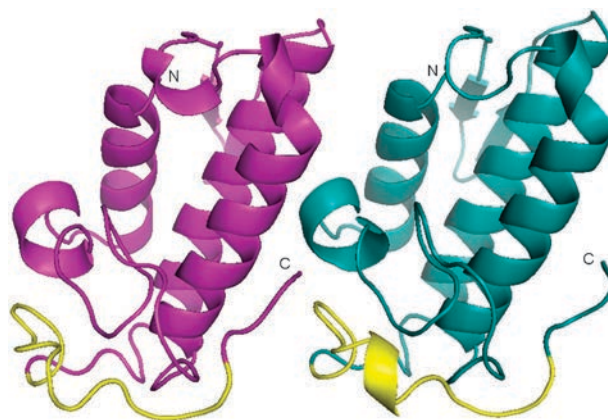


Fig. 2 Structure of the dimeric Ser49 PLA₂-like myotoxin from the venom of *Vipera ammodytes meridionalis*. The N- and C-terminus are labelled. The putative pharmacological site, responsible for the myotoxicity (residues 115–129), is also labelled. In the dimer the C-terminal segments of the monomers are parallel and point in the same direction.

(see ref. 25, 26 and references therein). Here, the numbering system of Renetseder *et al.*²⁷ is used.

The four homodimeric complexes are stabilized mainly by hydrophobic interactions. The complex formed between two identical subunits is globularly shaped (Fig. 2).

The degree of the Ser49 PLA₂-like myotoxin oligomerization in solution and the molecular size of the particles were determined by dynamic light scattering measurements. A hydrodynamic radius (R_H) of 2.47 nm was determined for the protein particles which means dimerization in solution of the toxin with a molecular mass of the monomer of 14 kDa. We calculated a theoretical hydrodynamic radius (R_H^{theo}) of 1.81 nm for the monomer and of 2.27 nm for the dimer. The theoretical value is the radius of the hypothetical hard sphere which diffuses with the same speed.

The active site region

Ser49 PLA₂-like myotoxin from the *Vipera ammodytes meridionalis* venom is devoid of lipolytic activity. Asp49 and Lys49 myotoxins contain the conserved catalytic residues His48, Tyr52, Tyr73 and Asp99.¹⁴ The same residues were found in the Ser49 myotoxin. However, the “catalytic” H-bond network, observed in the enzymatically active Asp49 myotoxins (see ref. 28, 29 and references therein), is distorted. The important His48–Asp99 H-bond is absent in the Ser49 myotoxin. In the Asp49 isoform a catalytically important water molecule is H-bonded to the active site His48 and upon activation to the couple His48–Asp99 serves as a nucleophile during catalysis.^{28,29} No water molecule was observed in a distance for H-bond formation with His48 in the structure of the *Vipera a. meridionalis* venom myotoxin. The other H-bonds of the “catalytic” network Asp99–Tyr52 and Tyr73–Asp99 are preserved.

Ca²⁺ is important for the Asp49 myotoxin catalyzed lipolytic reactions stabilizing the tetrahedral intermediate.^{3,30}

The calcium-binding loop includes residues 25–33. No Ca²⁺ was observed in the respective putative metal ion-binding site in the Ser49 myotoxin. In the Asp49 toxins calcium is coordinated by the carboxylic group of Asp49 and carbonyl oxygen atoms from the polypeptide chain. In the present structure the same region lacks a metal ion due to the absence of the major ligand, a carboxylic group, and not suitable configuration for the coordination of calcium. The absence of calcium does not disturb the “catalytic” H-bond network in the Asp49 PLA₂s and the conformation of the metal ion-binding loop is only marginally altered.²⁹ In the respective Ca²⁺-free structure a water molecule occupies the position of the metal ion.²⁹ No water was found in the respective position in the Ser49 toxin. In the Lys49 myotoxins the ε-amino group of the lysyl residue in position 49 occupies the equivalent position of the calcium ion,¹⁷ which explains the lack of catalytic activity. In the present structure Ser49 is out of the putative calcium binding loop and does not participate in H-bonds. It is located close to the protein surface.

Comparison of the segments including residues 25–33 in the three toxins showed that the most “changeable” positions are those of residues 28 and 31. Different residues occupy these positions (Fig. 3). Gly33 was considered to be critical for the lipolytic activity and is highly conserved in the Asp49 toxins.²⁴ Substitution of Gly33 was observed in catalytically inactive toxins.²⁴ In the Ser49 enzymatically inactive isoform Gly33 is substituted by Asn33.

Putative pharmacological site

Muscle necrosis, exerted by snake venom toxins, is independent of enzymatic activity.⁶ There are two important structural determinants of myotoxicity and membrane damaging activity of Lys49 myotoxins: positively charged residues and a hydrophobic knuckle in the C-terminal loop of the polypeptide

	1	10	20	30
Ser49Vamm	S	V I E F G K M I Q	E E T D - K N P L T	S Y S F Y G C H C G
Asp49PLA ₂	N	L F Q F A K M I N	G K L G - A F S V W	N Y I S Y G C Y C G
Lys49PLA ₂	S	L F E L G K M I L	Q E T G - K N P A K	S Y G V Y G C N C G
	31	40	50	60
Ser49Vamm	L	G N G G K P K D A T D R	C C F V H S C C Y A S L S - - D -	
Asp49PLA ₂	W	G G Q G T P K D A T D R	C C F V H D C C Y G R V R - - D -	
Lys49PLA ₂	V	G G R G K P K D A T D R	C C Y V H K C C Y K K L T - - G -	
	61	70	80	90
Ser49Vamm	C	- - - - S P A T N R	Y S Y H K E G G A I V C G S - S T P	
Asp49PLA ₂	C	- - - - N P K L A I	Y S Y S F K K G N I V C G K - N N G	
Lys49PLA ₂	C	- - - - D P K K D R	Y S Y S W K D K T I V C G E - N N S	
	91	100	110	120
Ser49Vamm	C	K G Q I C E C D K A A A I	C F K E N L K T Y N K K Y K V Y	
Asp49PLA ₂	C	L R D I C E C D R V A A N	C F H Q N K N T Y N K N Y K F L	
Lys49PLA ₂	C	L K E L C E C D K A V A I	C L R E N L D T Y N K K Y R Y N	
	121	130		
Ser49Vamm	L	R - F K C K G V S E K C		
Asp49PLA ₂	S	S - S R C R Q T S E Q C		
Lys49PLA ₂	Y	L - K P A C K K A D P C		

Fig. 3 Comparison of the amino acid sequences of Ser49 PLA₂-like myotoxin (Ser49Vamm) from the venom of *Vipera ammodytes meridionalis*, Asp49 PLA₂ from the same venom (PDB ID: 1RGB) and Lys49 PLA₂-like myotoxin from the venom of *Bothrops moojeni* (PDB ID: 1XXS). Identical residues in the first two proteins are labelled in dark gray and the conservative substitutions are shown in light gray.

Table 2 H-bond contacts of residues from the putative C-terminal pharmacological site with neighbouring residues. The numbering of the amino acid residues is according to Renetseder *et al.*²⁷

Residue/atom	Residue/atom	Distance/Å
Lys115, O	Tyr117, N	3.18
Lys116, N	Asn114, O	3.20
Tyr117, N	Asn114, O	2.91
Tyr117, O	Gly26, N	2.87
Tyr117, O	Val119, N	3.09
Tyr117, O	Tyr120, N	2.82
Lys118, O	Tyr120, N	3.06
Val119, N	Phe24, O	3.28
Tyr120, N	Val119, N	3.20
Tyr120, N	Phe24, O	3.32
Leu121, O	Phe124, N	3.15
Leu121, O	Lys125, N	3.36
Arg122, NE	Gly26, O	3.20
Arg122, NH1	Gly26, O	2.75
Arg122, NH2	Gly32, N	3.01
Arg122, NH2	Cys29, O	3.01
Lys125, N	Leu121, O	3.36
Lys125, O	Lys127, N	3.07
Cys126, N	Arg122, O	3.31
Val129, O	Glu131, N	3.24

chain which can interact with the membrane phospholipids (see ref. 17 and references therein). Surface charge and free accessibility to the active site are essential for the myotoxic activity.¹⁶ The C-terminus of the present structure, including residues 115–129, is positively charged and contains five lysyl and one arginyl residues. Inspection of the model showed that Lys115, Lys118, Lys125 and Lys127 are completely exposed on the protein surface and point outside the molecule. The side chain of Arg122 is located on the protein surface but points inside of the globule. The C-terminal residues participate in a number of immediate contacts with neighbouring residues (Table 2) which stabilize this sub-structure. The C-terminal segments of the monomers are exposed on the dimer surface and can interact with substrate membranes. These segments are parallel and point in the same direction (Fig. 2). The C-terminal region interacts with the putative calcium-binding loop *via* immediate contacts between atoms from Arg122 on one side, and Gly26, Cys29 and Gly32, on the other (Table 2).

A hydrophobic knuckle formed by Phe121 and Phe124, important for the myotoxicity, was found in the *A. contortrix laticinctus* venom Lys49 PLA₂-like myotoxin.¹⁷ The formation of the knuckle is a result of conformational changes due to the binding of a ligand (fatty acid) to the substrate-binding site.¹⁷ Inspection of the Ser49 myotoxin model showed that a similar hydrophobic surface is formed in the C-terminal region by Phe124 and Leu121. The side chains of both residues are parallel and protrude outside the protein molecule. The non-polar side chain of Lys125 is located between the two residues contributing to the hydrophobicity of the region. In contrast to the Lys49 toxin, the C-terminal hydrophobic region in the Ser49 isoform is formed in the absence of a bound ligand/fatty acid.

A possible contribution of Lys36 and Lys38 of a Lys49 toxin to the cytolytic activity was demonstrated by molecular modelling studies.⁸ The respective residues, Lys36 and Lys38 in the Ser49 toxin are exposed on the protein surface and their side chains point outside of the globule. Lys122 plays an

important role in the pharmacological action of Lys49 snake venom toxins interacting with the carbonyl group of Cys29 and thus increasing the affinity for the fatty acid head group.³¹ The binding of a fatty acid led to a conformational change and formation of a hydrophobic surface in the C-terminus implicated in the myotoxicity. However, in the Ser49 venom toxin there is an arginyl residue in position 122, which is located on the protein surface.

Structural comparison of the Ser49 myotoxin with an Asp49 myotoxin from the same venom

Vipoxin PLA₂ is the major toxic component of the *Vipera a. meridionalis* venom.³² Vipoxin is a neurotoxic complex which consists of a basic and highly toxic PLA₂ and an acidic and non-toxic protein inhibitor.³³ The enzyme is an example of Asp49 PLA₂ with a high phospholipase A₂ activity, myo- and neurotoxicity (see ref. 32, 33 and references therein). We have determined the crystal structure of the toxin at 1.4 Å resolution.³² Here, we compare the structures of both Ser49 and Asp49 myotoxins from the same venom, in order to obtain information about the changes in their structures and functions during the evolution. Both toxins have the same length of the polypeptide chains, 49% sequence identity, and 54% homology when the conservative substitutions were taken into account (Fig. 3). Thus, they can be classified as closely related proteins. Comparison of the crystal structures showed that the catalytic machinery, His48, Asp99, Tyr52, and Tyr73, is preserved (Fig. 4), excluding the active site carboxylic group of an aspartic acid residue which is the major ligand for calcium ion binding, a prerequisite for the realization of phospholipase A₂ activity. The hydrophobic channel, which plays the role of a substrate-binding site in PLA₂ enzymes, is also preserved in the Ser49 myotoxin with one conservative substitution: Leu2–Val2. More substantial changes were observed in the region of the putative calcium-binding loop: Tyr28–His28, Trp31–Leu31 and Gly33–Asn33 (Fig. 3). Tyr28 is important for the calcium binding because the carbonyl O-atom of this residue participates in the calcium coordination.³²



Fig. 4 Superposition of the structures of Ser49 PLA₂-like myotoxin (present work, magenta), Asp49 PLA₂ (PDB ID: 1RGB, light blue) and Lys49 PLA₂-like myotoxin from the venom of *Bothrops moojenii* (PDB ID: 1XXS, violet).

Structural superposition of the three 14 kDa proteins, Ser49 and Lys49 PLA₂-like myotoxins, and Asp49 PLA₂, showed a preservation of the major secondary structure elements: the three α -helices, two β -sheets and the loops (Fig. 4). Superposition of the polypeptide C^α positions of the Ser49 myotoxin with those of the Asp49 and Lys49 isoforms showed an average main chain rmsd of 1.00 Å and 0.75 Å, respectively. The largest deviations were observed in the regions of the loops, including the putative calcium-binding loop and in the C-terminal regions.

Discussion

The mechanism of myotoxicity is not yet completely understood. However, it seems that there are structural determinants, responsible for the irreversible damage of skeletal muscles after the snake bites, which are common for the known Asp49 and Lys49 PLA₂-like venom myotoxins: the presence of an exposed “cluster” of positively charged residues on the protein surface and a hydrophobic contact region, accessible for interactions with receptors. Evidently, the combination of electrostatic and hydrophobic interactions is important for the pharmacological activity of these toxins. While the presence of a ligand (fatty acid), bound to the substrate-binding site, is necessary for the exposure of a hydrophobic surface (knuckle) as a result of a conformational change in the segment formed by residues 118–125 in Lys49 myotoxins,¹⁷ a similar knuckle, located on the protein surface, exists in the Ser49 myotoxin from the *Vipera a. meridionalis* venom already in the absence of a bound ligand. In the first case the surface is made by two phenyl rings and in the second it is formed by a phenyl group and the large hydrophobic side chain of a leucine residue.

The Ser49 PLA₂-like myotoxin described here is devoid of catalytic/lipolytic activity due to the distortion of the “catalytic” H-bond system. The absence of catalytic activity suggests that the toxin exhibits myotoxicity and membrane damaging activity *via* a non-enzymatic mechanism. The accumulation of positive charges on the exposed protein surface C-terminal segment allows electrostatic interactions of the toxin with the negatively charged head groups of membrane phospholipids, which supports the conclusion that this region is responsible for the membrane damaging activity. Moreover, the presence of an exposed hydrophobic surface in the C-terminus, capable of interacting with the non-charged, hydrophobic part of the phospholipids, strengthens the conviction about the functional importance of the region mentioned above. One can hypothesize that, probably, dimerization is important for the expression of the physiological activity. In the dimers the pharmacologically important C-terminal segments point in the same direction which can strengthen the toxic effect. The location of Lys36 and Lys38 on the protein surface is suitable for interaction with targets/receptors on the biological membranes.

DLS measurements showed dimerization of the Ser49 PLA₂ in solution. The calculated hydrodynamic radius of the dimers is larger than that of the hypothetical hard sphere which diffuses with the same speed. This means that the myotoxin particles in solution have ellipsoidal shape which was confirmed by the X-ray model of the dimer (Fig. 2). For equal volumes the surface area of the ellipsoid is greater than that of the sphere.

The non-spherical shape of the myotoxin particles ensures more possibilities for interactions with target membranes.

Binding of the myotoxin to a biological membrane is a prerequisite for the expression of toxicity. The membrane damage requires binding of the toxin to the negatively charged membrane surface. The structure of the myotoxin from the *Vipera a. meridionalis* venom revealed an anion-binding region which was identified by clear non-protein electron densities, observed during the refinement and interpreted as sulfate ions. These sulfate ions are bound mainly through direct contacts with the basic residues Arg43, Arg122, Lys118, Lys36 and Lys38, or through coordination by side chain or main chain atoms, and water molecules in regions which can be considered as area for interactions between the toxin and the anionic membrane surface. Further, sulfate binding sites are located in regions involved in the myotoxicity at the C-terminal part of the polypeptide chain; other sites include residues important for the pharmacological activity as Lys36 and Lys38. Identification of anion-binding sites confirms the pharmacological significance of the sub-structures mentioned above.

The binding of the structurally related ammodytin L to biological membranes had been investigated using fish presynaptic membranes from *Torpedo marmorata* electric organ.³⁴ It was demonstrated that AtnL binds to the same sites on presynaptic membranes from *Torpedo* as the neurotoxic PLA₂ ammodytoxin C. The authors also concluded that the sites in AtnL, implicated in its myotoxicity, are not located solely in the C-terminal half of the molecule.³⁴

It can be supposed that the Ser49 PLA₂-like myotoxin of the *Vipera a. meridionalis* venom is a product of the evolution of its Asp49 PLA₂ counterpart. This conclusion is supported by the high degree of sequence homology and the similarity of the 3-D structures (Fig. 4). Some differences in the conformation of the loops are understandable, having in mind that loops are the most flexible parts of the protein molecules. During the evolution, the toxin described here acquired a more specialized myotoxic function and lost the catalytic activity, which is not required for the muscle tissue damage.

Experimental

Collection of venom and isolation of myotoxin

Venom was collected from snakes originating from the province Thrace, near the border between Bulgaria and Greece. Snakes of both genders were milked using a latex-covered specimen jar. The venom was stored at 4 °C until used. 100 mg crude venom was dissolved in 5 ml starting buffer (50 mM acetic acid, pH 5.0) and fractionated by FPLC as described previously.³⁵ Briefly, a small amount of precipitate was removed by centrifugation and the clear supernatant was loaded onto a column Mono S 10/10 (Amersham-Pharmacia, Freiburg) equilibrated with the starting buffer. The column was eluted with a linear gradient from 0 to 1 M NaCl in the same buffer. Fractions containing the myotoxin were pooled, dialyzed against 0.05 M CHES, pH 10.0 and loaded onto a column Mono Q (Amersham-Pharmacia, Freiburg) equilibrated with the same buffer. The column was eluted with a linear gradient from 0 to 1 M NaCl in the same buffer. The isolated myotoxin was homogeneous by SDS-PAGE

and N-terminally sequenced using an automatic amino acid sequencer PROCISE from Applied Biosystems. The first 20 amino acids were identical to those of ammodytin L². The chemicals used for the fractionation of the venom were delivered from Merck (Darmstadt, Germany).

Crystallization

Single crystals suitable for X-ray analysis were obtained after 5 days by the hanging-drop vapour-diffusion technique, using a protein solution with a concentration of 10 mg ml⁻¹ in water. The reservoir solution contained 25.5% PEG-4000, 0.17 M ammonium sulfate and 15% glycerol.

Dynamic light scattering (DLS) measurements of the myotoxin solution were performed using a RiNA GmbH DLS system (Spectroscatterer 201; Berlin, Germany). The theoretical hydrodynamic radius (R_H^{Theo}) of the particles is the radius of the hypothetical hard sphere which diffuses with the same speed. It was calculated from the molecular mass:

$$R_H^{\text{Theo}} = [(3M(V_s + h))/(4\pi N_A)]^{1/3},$$

where M is the molecular mass, V_s is the particle specific volume, h is the hydration, and N_A is the Avogadro constant. V_s has values between 0.69 and 0.75 cm³ g⁻¹ for proteins containing only amino acid residues.³⁶ We used a value of 0.73 cm³ g⁻¹ for the investigated protein. According to the authors mentioned above, hydration between 0.3 and 0.4 g H₂O (g-protein)⁻¹ is needed to account for the hydrodynamic behavior of globular proteins. We have used a value of 0.35 g H₂O (g-protein)⁻¹.

Diffraction data collection and processing

Diffraction data were collected at 2.9 Å resolution from a flash-cooled crystal at 100 K using synchrotron radiation ($\lambda = 0.8123$ Å) at the consortium beamline X13 at HASYLAB/DESY, Hamburg. Prior to data collection crystals were soaked in a cryoprotectant solution consisting of 25.5% (w/v) PEG 4000, 0.17 M ammonium sulfate and 20% (v/v) glycerol. Diffraction images were collected with a 1° rotation between subsequent images. The images were processed using the programs DENZO and SCALEPACK.³⁷

Model building and refinement

The N-terminal sequence of the *V. a. meridionalis* venom toxin, including residues 1–20, was identical to that of ammodytin L². Substitutions were observed in internal parts of the molecule. The structure was solved by molecular replacement using the program PHASER³⁸ and ammodytin L (PDB code: 3DIH) as a model. The refinement was performed by using the program Phenix.refine of Phenix³⁹ and REFMAC5 as implemented in the CCP4 program suite.⁴⁰ The electron density maps were examined and model building was carried out using the program COOT.⁴¹ The final model was analyzed using the program PROCHECK.⁴² The atomic coordinates and structure factors for the native crystal structure of the myotoxin from the *Vipera ammodytes meridionalis* venom have been deposited in the Protein Data Bank and have been assigned the PDB ID code 3UX7.

Conclusions

The structure of the Ser49 PLA₂-like myotoxin from the *Vipera a. meridionalis* venom suggests a common mechanism of myotoxicity and membrane damaging activity with the Lys49 myotoxins. All three isoforms of snake venom 14 kDa myotoxins, Asp49 PLA₂s and Lys49, and Ser49 PLA₂-like proteins, have conserved three-dimensional structures and secondary structure elements with some variations in functionally important regions as the calcium binding sites and the C-terminal parts of the polypeptide chains. The formation of dimeric structures suggests an importance of oligomerization for the biological activity.

Acknowledgements

This study was financed by a grant of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Project BE 1443-18-1) CAPES (80563/2911) and DAAD (PROBAL 50754442). The work was also supported in part by the Bulgarian National Foundation for Scientific Research, Grant TK-B-1610/06.

References

- 1 M. Ohno, T. Chijiwa, N. Oda-Ueda, T. Ogawa and S. Hattori, Molecular evolution of myotoxic phospholipases A₂ from snake venom, *Toxicon*, 2003, **42**, 841–854.
- 2 I. Križaj, A. L. Bieber, A. Ritonja and F. Gubenšek, The primary structure of ammodytin L, a myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Vipera ammodytes* venom, *Eur. J. Biochem.*, 1991, **202**, 1165–1168.
- 3 M. M. Thunnissen, K. H. Kalk, J. Drenth and B. W. Dijkstra, Structure of an engineered porcine phospholipase A₂ with enhanced activity at 2.1 Å resolution: comparison with the wild-type porcine and *Crotalus atrox* phospholipase A₂, *J. Mol. Biol.*, 1990, **216**, 425–439.
- 4 J. M. Gutiérrez and B. Lomonte, Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms, *Toxicon*, 1995, **33**, 1405–1424.
- 5 C. L. Ownby, H. S. Selistre-de-Araújo, S. P. White and J. E. Fletcher, Lysine 49 phospholipase A₂ proteins, *Toxicon*, 1999, **37**, 411–445.
- 6 R. M. Kini and H. J. Evans, Role of cationic residues in cytolytic activity: modification of lysine residues in the cardiotoxin from *Naja nigricollis* venom and correlation between cytolytic and antiplatelet activity, *Biochemistry*, 1989, **28**, 9209–9216.
- 7 A. M. Soares and J. R. Giglio, Chemical modifications of phospholipases A₂ from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties, *Toxicon*, 2003, **42**, 855–868.
- 8 B. Lomonte, E. Moreno, A. Tarkowski, L. A. Hanson and M. MacCarana, Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a lysine 49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modelling, *J. Biol. Chem.*, 1994, **269**, 29867–29873.
- 9 C. E. Núñez, Y. Angulo and 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*, 2001, **39**, 1587–1594.
- 10 Y. Angulo, T. Olamendi-Portugal, A. Alape-Girón, L. D. Possani and B. Lomonte, Structural characterization and phylogenetic relationships of myotoxin II from *Atropoides (Bothrops) nummifer* snake venom, a Lys49 phospholipase A₂ homologue, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2002, **34**, 1268–1278.
- 11 D. R. Holland, L. L. Clancy, S. W. Muchmore, T. J. Ryde, H. M. Einspahr, B. C. Finzel, R. L. Henrikson and K. D. Watenpugh, The crystal structure of a lysine 49 phospholipase A₂ from the venom of the cottonmouth snake at 2.0 Å resolution, *J. Biol. Chem.*, 1990, **265**, 17649–17656.

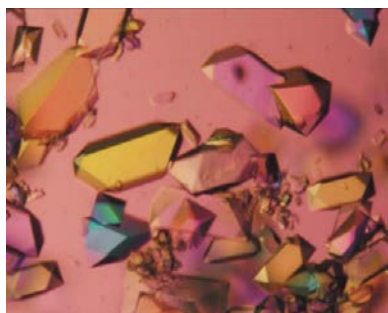
- 12 D. L. Scott, A. Achari, J. C. Vidal and P. B. Sigler, Crystallographic and biochemical studies of the (inactive) Lys-49 phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*, *J. Biol. Chem.*, 1992, **267**, 22645–22657.
- 13 M. T. Murakami, E. Z. Arruda, P. A. Melo, A. B. Martinez, S. Calil-Eliás, M. A. Tomaz, B. Lomonte, J. M. Gutiérrez and R. K. Arni, Inhibition of myotoxic activity of *Bothrops asper* myotoxin II by the anti-trypanosomal drug suramin, *J. Mol. Biol.*, 2005, **350**, 416–426.
- 14 L. Watanabe, A. M. Soares, R. J. Ward, M. R. M. Fontes and 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*, 2005, **87**, 161–167.
- 15 M. T. Murakami, C. C. Melo, Y. Angulo, B. Lomonte and R. K. Arni, Structure of myotoxin II, a catalytically inactive Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Atropoides nummifer* venom, *Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 2006, **62**, 423–426.
- 16 M. T. Murakami, M. M. Viçonti, J. R. B. Abrego, M. R. Lourenzoni, A. C. O. Cintra, E. Z. Arruda, M. A. Tomaz, P. A. Melo and 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*, 2007, **49**, 378–387.
- 17 A. L. B. Ambrosio, M. C. Nonato, H. S. Selistre de Araújo, R. Arni, R. J. Ward, C. L. Ownby, D. H. F. de Souza and R. C. Garratt, A molecular mechanism for Lys49-phospholipase A₂ activity based on ligand-induced conformational change, *J. Biol. Chem.*, 2005, **280**, 7326–7335.
- 18 J. Pungercar, N. Liang, B. štrukelj and F. Gubenšek, Nucleotide sequence of a cDNA encoding ammodytin L, *Nucleic Acids Res.*, 1990, **18**, 4601.
- 19 S. Rufini, P. Cesaroni, A. Desideri, R. Farias, F. Gubenšek, J. M. Gutiérrez, P. Luly, R. Massoud, R. Morero and J. Z. Pedersen, Calcium ion independent membrane leakage induced by phospholipase-like myotoxins, *Biochemistry*, 1992, **31**, 12424–12430.
- 20 J. Z. Pedersen, B. Lomonte, R. Massoud, F. Gubenšek, J. M. Gutiérrez and S. Rufini, Autocatalytic acylation of phospholipase-like myotoxins, *Biochemistry*, 1995, **34**, 4670–4675.
- 21 S. Incerpi, P. de Vito, P. Luly and S. Rufini, Effect of ammodytin L from *Vipera ammodytes* on L-6 cells from rat skeletal muscle, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, **1268**, 137–142.
- 22 T. Petan, I. Krizaj and J. Pungercar, Restoration of enzymatic activity in a Ser-49 phospholipase A₂ homologue decreases its Ca(2+)-independent membrane-damaging activity and increases its toxicity, *Biochemistry*, 2007, **46**, 12795–12809.
- 23 J. Polgar, E. M. Magnenat, M. C. Peitsch, T. N. C. Wells and K. J. Clemetson, Asp-49 is not an absolute prerequisite for the enzymatic activity of low-M_r phospholipases A₂: purification, characterization and computer modelling of an enzymically active Ser-49 phospholipase A₂, ecarpholin S, from the venom of *Echis carinatus sochureki* (saw-scaled viper), *Biochem. J.*, 1996, **319**, 961–968.
- 24 X. Zhou, T.-C. Tan, S. Valiyaveetil, M. L. Go, R. M. Kini, A. Velazquez-Campoy and J. Sivaraman, Structural Characterization of Myotoxic Ecarpholin S from *Echis carinatus* Venom, *Biophys. J.*, 2008, **95**, 3366–3380.
- 25 R. K. Arni and R. J. Ward, Phospholipase A₂—a structural review, *Toxicon*, 1996, **34**, 827–841.
- 26 M. T. Murakami and R. K. Arni, A structure based model for liposome disruption and the role of catalytic activity in myotoxic phospholipase A₂s, *Toxicon*, 2003, **42**, 903–913.
- 27 R. Renetseder, S. Brunie, B. W. Dijkstra, J. Drenth and P. Sigler, A comparison of the crystal structures of phospholipase A₂ from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom, *J. Biol. Chem.*, 1985, **260**, 11627–11634.
- 28 D. L. Scott, S. P. White, Z. Otwinowski, W. Yuan, M. H. Gelb and P. B. Sigler, Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A₂, *Science*, 1990, **250**, 1541–1546.
- 29 M. T. Murakami, A. Gabdoulkhakov, N. Genov, A. C. O. Cintra, C. Betzel and R. K. Arni, Insights into metal ion binding in phospholipases A₂: ultra high-resolution crystal structures of an acidic phospholipase A₂ in the Ca²⁺ free and bound states, *Biochimie*, 2006, **88**, 543–549.
- 30 M. M. G. M. Thunnissen, A. B. Eiso, K. H. Kalk, J. Drenth, B. W. Dijkstra, O. P. Kuipers, R. Dijkman, G. H. de Haas and H. M. Verheij, X-ray structure of phospholipase A₂ complexed with a substrate-derived inhibitor, *Nature*, 1990, **347**, 689–691.
- 31 W.-H. Lee, M. T. da Silva Giotto, S. Marangoni, M. H. Toyama and I. P. 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*, 2001, **40**, 28–36.
- 32 S. Banumathi, K. R. Rajashankar, C. Nötzel, B. Aleksiev, T. P. Singh, N. Genov and Ch. Betzel, Structure of the neurotoxic complex vipoxin at 1.4 Å resolution, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.*, 2001, **57**, 1552–1559.
- 33 B. Aleksiev and B. Chorbanov, Action on phosphatidylcholine of the toxic phospholipase A₂ from the venom of Bulgarian viper (*Vipera ammodytes meridionalis*), *Toxicon*, 1976, **14**, 477–485.
- 34 J. Pungercar, N. Vučemilo, G. Faure, C. Bon, H. M. Gubenšek and I. Krizaj, Ammodytin L, an inactive phospholipase A₂ homologue with myotoxicity in mice, binds to the presynaptic acceptor of the β-neurotoxic ammodytoxin C in *Torpedo*: an indication for a phospholipase A₂ activity-independent mechanism of action of β-neurotoxins in fish? *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998, **244**, 514–518.
- 35 D. Georgieva, M. Risch, A. Kardas, F. Buck, M. von Bergen and Ch. Betzel, Comparative analysis of the venom proteomes of *Vipera ammodytes ammodytes* and *Vipera ammodytes meridionalis*, *J. Proteome Res.*, 2008, **7**, 866–886.
- 36 C. R. Cantor and P. R. Schimmel, *Size and shape of macromolecules*, *Biophysical Chemistry, Part II*, W. H. Freeman and Company, New York, 1980, pp. 539–590.
- 37 Z. Otwinowski and W. Minor, Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode, *Methods Enzymol.*, 1996, **276**, 307–326.
- 38 A. J. McCoy, R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni and R. J. Read, Phaser crystallographic software, *J. Appl. Crystallogr.*, 2007, **40**, 658–674.
- 39 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 and P. H. Zwart, A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.*, 2010, **66**, 213–221.
- 40 Collaborative Computational Project, Number 4, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.*, 1994, **50**, 760–763.
- 41 P. Emsley and K. Cowtan, Coot: model-building tools for molecular graphics, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.*, 2004, **60**, 2126–2132.
- 42 R. A. Laskowski, M. W. MacArthur, D. S. Moss and J. M. Thornton, Procheck: a program to check stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Crystallogr.*, 1993, **26**, 183–291.

Mônica A. Coronado,^a
Dessislava Georgieva,^b Friedrich
Buck,^c Azat H. Gabdoulkhakov,^d
Anwar Ullah,^a Patrick J.
Spencer,^e Raghuvir K. Arni^a and
Christian Betzel^{b*}

^aCentro Multiusuário de Inovação Biomolecular, Departamento de Física, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto-SP 15054-000, Brazil, ^bLaboratory for Structural Biology of Infection and Inflammation, University of Hamburg, c/o DESY, Notkestrasse 85, 22603 Hamburg, Germany, ^cInstitute of Clinical Chemistry, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistrasse 52, 20246 Hamburg, Germany, ^dInstitute of Crystallography, Russian Academy of Sciences, 59 Leninsky Prospect, Moscow 119333, Russian Federation, and ^eCentro de Biotecnologia, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares—CNEN/SP, Avenida Professor Lineu Prestes 2242, São Paulo-SP 05508-000, Brazil

Correspondence e-mail:
christian.betzel@uni-hamburg.de

Received 6 June 2012
Accepted 18 July 2012



© 2012 International Union of Crystallography
All rights reserved

Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of crotamine, a myotoxic polypeptide from the Brazilian snake *Crotalus durissus terrificus*

Crotamine, a highly basic myotoxic polypeptide (molecular mass 4881 Da) isolated from the venom of the Brazilian rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*, causes skeletal muscle contraction and spasms, affects the functioning of voltage-sensitive sodium channels by inducing sodium influx and possesses antitumour activity, suggesting potential pharmaceutical applications. Crotamine was purified from *C. durissus terrificus* venom; the crystals diffracted to 1.9 Å resolution and belonged to the orthorhombic space group $I2_12_1$ or $I222$, with unit-cell parameters $a = 67.75$, $b = 74.4$, $c = 81.01$ Å. The self-rotation function indicated that the asymmetric unit contained three molecules. However, structure determination by molecular replacement using NMR-determined coordinates was unsuccessful and a search for potential derivatives has been initiated.

1. Introduction

Crotamine induces spastic paralysis and myonecrosis (Katagiri *et al.*, 1998), binding strongly to excitable membranes, and causes the contraction of skeletal muscle, resulting in rapid lysis of the sarcolemma, myofibril clumping and hypercontraction of sarcomeres (Matavel *et al.*, 1998). This toxin induces skeletal muscle spasms (Oguiura *et al.*, 2005) and interferes with the functioning of voltage-sensitive sodium channels of the skeletal muscle sarcolemma, leading to rapid sodium influx. Crotamine also causes depolarization and contraction of skeletal muscle attributed to the inhibition of voltage-gated potassium channels (Peigneur *et al.*, 2012). More recently, it has been demonstrated that crotamine targets tumour tissue *in vivo* and triggers a lethal calcium-dependent pathway in cultured cells (Nascimento *et al.*, 2011).

Crotamine (GenBank accession code P01475), a multifunctional small (molecular mass 4881 Da) and highly basic (pI = 10.3; Giglio, 1975) protein isolated from the venom of *Crotalus durissus terrificus* (Gonçalves & Polson, 1947; Laure, 1975), belongs to a class of closely related polypeptide myotoxins which are stabilized by three disulfide bridges. Crotamine is unglycosylated, rich in arginine and lysine residues (Boni-Mitake *et al.*, 2001) and shares a relatively low sequence identity of 23% with human β -defensins. Multiple sequence alignments indicated partial conservation of the β -defensin fold (Schibli *et al.*, 2002). The relatively highly positive potential surface charge allows us to hypothesize that it can interact electrostatically with the negative surface of membranes, causing local disruption and thereby inducing leakage of ions.

Relatively large and well diffracting crystals of crotamine have been obtained. However, exhaustive attempts to solve the crystal structure using models based on two independently determined NMR structures of crotamine (Nicastro *et al.*, 2003; Fadel *et al.*, 2005) have not been successful, probably owing to inherent flexibility or disorder. Thus, since neither the crystal structures nor the multimer interactions of these peptides have been determined, a search for suitable derivatives has been initiated.

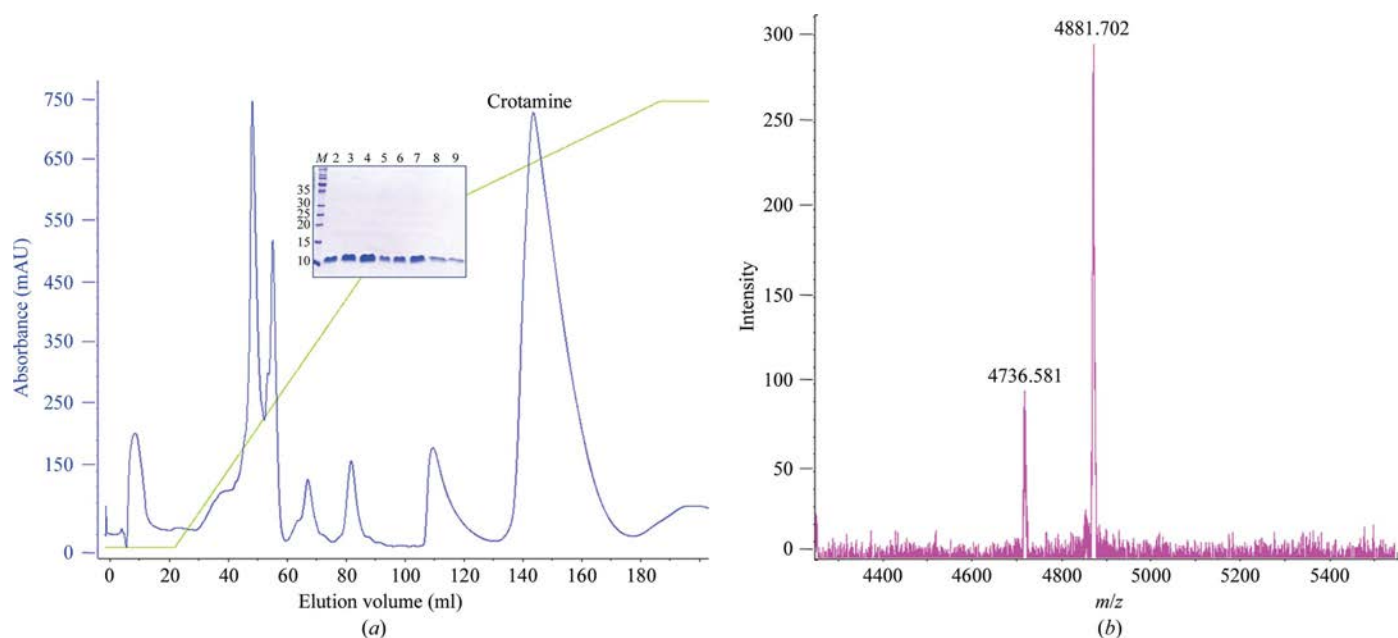


Figure 1
 (a) Purification of crotonamine by cation-exchange chromatography (Mono S HR 10/10). Inset, Coomassie-stained 12% SDS-PAGE gel of crotonamine. Lane M, molecular-mass markers (labelled in kDa); lanes 2–9, pooled purified crotonamine at different concentrations. (b) Representative MALDI-TOF spectrum obtained from crotonamine.

2. Materials and methods

2.1. Venom collection and purification

Since the content of crotonamine present in the venom of *C. durissus terrificus* varies according to geographical location, crude venom was obtained from a number of different sources. The venom obtained from CEVAP, Botucatu, Brazil contained a significantly greater amount of crotonamine (approximately 15% by weight). 150 mg desiccated crude venom was dissolved in 2 ml 0.05 M acetic acid pH 5 and centrifuged at 10 000g for 10 min. The clear supernatant was applied onto a Mono S HR 10/10 column (Amersham Biosciences; Fig. 1a) previously equilibrated with the same buffer, the column was washed at a flow rate of 60 ml h⁻¹ until the baseline stabilized and the bound fractions were eluted with the previously described solution additionally containing 1.0 M NaCl.

The purity of the protein was confirmed using SDS-PAGE gels (12%) as described by Laemmli (1970). Protein bands were visualized by staining with Coomassie Brilliant Blue R-250 (Fig. 1a, inset).



Figure 2
 Native crystals of crotonamine with approximate dimensions of 0.5 × 0.25 × 0.1 mm.

Protein concentrations were determined by calculating the theoretical extinction coefficient and absorption was measured at 280 nm using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific).

The molecular mass was confirmed by mass spectroscopy (MALDI-TOF) on an UltrafleXtreme instrument (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) and the sequence of the first ten N-terminal amino acids was confirmed by Edman degradation (476A protein sequencer, Applied Biosystems; Fig. 1b).

2.2. Crystallization

For crystallization experiments, crotonamine was concentrated to 22 mg ml⁻¹ in ultrapure water using microconcentrators (Amicon Ultra-4, Ultracel membrane). *In situ* dynamic light-scattering (DLS) measurements were carried out at 293 K at the same concentration using a SpectroLIGHT 500 system (Nabitek, Germany; Garcia-Caballero *et al.*, 2011). DLS confirmed the presence of a single monodisperse population.

Crystallization conditions for crotonamine were screened using the vapour-diffusion method (McPherson, 1999). A total of 384 crystallization conditions based on the commercially available JCSG+, ComPAS, Classics and Cryos Suites (NeXtal, Qiagen) were screened using a Honeybee 961 dispensing robot (Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt, Germany) at 293 K in 96-well crystallization plates (NeXtal QIA1 μ plates, Qiagen) using the sitting-drop vapour-diffusion method. A 300 nl droplet of protein at approximately 10 mg ml⁻¹ in buffer was mixed with the same volume of reservoir solution and equilibrated against 35 μ l reservoir solution. The initial crystals obtained were relatively small; in order to increase their quality and size, they were reproduced manually using the hanging-drop vapour-diffusion method in Linbro 24-well plates. Diffraction-quality crystals with approximate dimensions of 0.5 × 0.25 × 0.1 mm were obtained after 2 d when a 1 μ l protein droplet was mixed with an equal volume of reservoir solution consisting of 0.2 M sodium thiocyanate, 1.9 M ammonium sulfate pH 6.1 (Fig. 2).

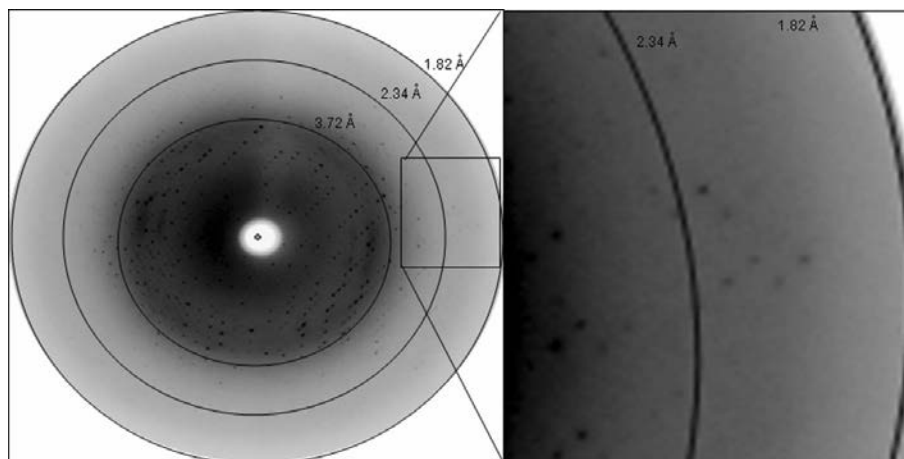


Figure 3
X-ray diffraction pattern of croptamine: concentric rings indicate resolution ranges and the high-resolution diffraction pattern is magnified.

Table 1

Summary of data-collection and crystal parameters.

Values in parentheses are for the highest resolution shell.

Radiation source	X13 Consortium Beamline, DESY/HASYLAB
Detector	MAR CCD
Wavelength (Å)	0.8123
Space group	$I222$ or $I2_12_12_1$
Unit-cell parameters (Å)	$a = 67.75$, $b = 74.40$, $c = 81.01$
V_M (Å ³ Da ⁻¹)	3.54
Solvent content (%)	65.2
Resolution range (Å)	18.7–1.9 (1.90–1.85)
Data completeness (%)	94.8 (76.1)
R_{merge}^\dagger (%)	3.6 (48.9)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	34.7 (3.6)

$^\dagger R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$, where $\langle I(hkl) \rangle$ is the mean intensity of the observations $I_i(hkl)$ of reflection hkl .

2.3. X-ray data collection

For diffraction data collection, a single crystal was flash-cooled after soaking it in reservoir solution that additionally contained 20% glycerol prior to data collection. X-ray diffraction data were collected on the X13 Consortium Beamline at DESY/HASYLAB. The wavelength of the radiation source was set to 0.8123 Å and a MAR CCD detector was used to record the X-ray diffraction intensities as 256 images with an oscillation range of 1° per image (Fig. 3). The raw intensities were indexed, integrated and scaled using the program *MOSFLM* (Leslie & Powell, 2007) from the *CCP4* suite (Winn *et al.*, 2011). Details of the data-collection and processing statistics are summarized in Table 1.

3. Results and discussion

The molecular mass of the purified croptamine was determined to be 4881.70 Da and the presence of an isoform (with a molecular mass of 4736.58 Da) was observed (Fig. 1*b*). The croptamine crystals (Fig. 2) diffracted X-rays to 1.8 Å resolution (Fig. 3). Processing of the diffraction data resulted in an R_{merge} of 4.3% and a completeness of 97.05%. Examination of the systematic absences indicated that the crystals belonged to the enantiomorphic space groups $I2_12_12_1$ or $I222$, with unit-cell parameters $a = 67.75$, $b = 74.40$, $c = 81.01$ Å. Based on the results of the self-rotation function, the Matthews coefficient (Matthews, 1968) was calculated to be 3.54 Å³ Da⁻¹ assuming the presence of three molecules of croptamine in the asymmetric unit, which corresponds to a solvent content of 65.2%. Since both structure

determination by molecular replacement using various models based on the independently determined NMR atomic coordinates (Nicastro *et al.*, 2003; Fadel *et al.*, 2005) with the program *MOLREP* (Vagin & Teplyakov, 2010) and attempts to use the anomalous sulfur signals were not successful, a search for suitable derivatives has been initiated.

This study was financed by grants from the DFG (Project BE 1443-18-1), FAPESP, CNPq, CAPES (80563/2911) and DAAD (PROBAL 50754442). DG thanks the Alexander von Humboldt Foundation, Bonn, Germany for providing a research fellowship (3.3-BUL/1073481 STP).

References

- Boni-Mitake, M., Costa, H., Spencer, P. J., Vassiliev, V. S. & Rogero, J. R. (2001). *Braz. J. Med. Biol. Res.* **34**, 1531–1538.
- Fadel, V., Bettendorff, P., Herrmann, T., de Azevedo, W. F., Oliveira, E. B., Yamane, T. & Wüthrich, K. (2005). *Toxicol.* **46**, 759–767.
- Garcia-Caballero, A. *et al.* (2011). *Cryst. Growth Des.* **11**, 2112–2121.
- Giglio, J. R. (1975). *Anal. Biochem.* **69**, 207–221.
- Gonçalves, J. M. & Polson, A. (1947). *Arch. Biochem.* **13**, 253–259.
- Katagiri, C., Ishikawa, H. H., Ohkura, M., Nakagawasai, O., Tadano, T., Kisara, K. & Ohizumi, Y. (1998). *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **76**, 395–400.
- Laemmli, U. K. (1970). *Nature (London)*, **227**, 680–685.
- Laure, C. J. (1975). *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* **356**, 213–215.
- Leslie, A. G. W. & Powell, H. R. (2007). *Evolving Methods for Macromolecular Crystallography*, edited by R. J. Read & J. L. Sussman, pp. 41–51. Dordrecht: Springer.
- Matavel, A. C., Ferreira-Alves, D. L., Beirão, P. S. & Cruz, J. S. (1998). *Eur. J. Pharmacol.* **348**, 167–173.
- Matthews, B. W. (1968). *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497.
- McPherson, A. (1999). *Crystallization of Biological Macromolecules*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Nascimento, F. D., Sancey, L., Pereira, A., Rome, C., Oliveira, V., Oliveira, E. B., Nader, H. B., Yamane, T., Kerkis, I., Tersariol, I. L. S., Coll, J.-L. & Hayashi, M. A. F. (2011). *Mol. Pharm.* **9**, 211–221.
- Nicastro, G., Franzoni, L., de Chiara, C., Mancin, A. C., Giglio, J. R. & Spisni, A. (2003). *Eur. J. Biochem.* **270**, 1969–1979.
- Oguiura, N., Boni-Mitake, M. & Rádis-Baptista, G. (2005). *Toxicol.* **46**, 363–370.
- Peigneur, S., Orts, D. J. B., Prieto da Silva, A. R., Oguiura, N., Boni-Mitake, M., de-Oliveira, E. B., Zaharenko, A. J., de-Freitas, J. C. & Tytgat, J. (2012). *Mol. Pharmacol.* **82**, 90–96.
- Schibli, D. J., Hunter, H. N., Aseyev, V., Starner, T. D., Wienczek, J. M., McCray, P. B., Tack, B. F. & Vogel, H. J. (2002). *J. Biol. Chem.* **277**, 8279–8289.
- Vagin, A. & Teplyakov, A. (2010). *Acta Cryst. D66*, 22–25.
- Winn, M. D. *et al.* (2011). *Acta Cryst. D67*, 235–242.

Structure of the polypeptide crotamine from the Brazilian rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*

Monika A. Coronado,^{a,b}
Azat Gabdulkhakov,^c Dessislava
Georgieva,^b Banumathi
Sankaran,^d Mario T. Murakami,^e
Raghuvir K. Arni^a and Christian
Betzel^{b*}

^aMulti User Center for Biomolecular Innovation, Department of Physics, São Paulo State University, UNESP/IBILCE, C. Postal 136, 15054-000 São José do Rio Preto-SP, Brazil,

^bInstitute of Biochemistry and Molecular Biology, Hamburg University, Martin-Luther-King Platz 6, 20146 Hamburg, Germany,

^cInstitute of Protein Research, RAS, Pushchino, Moscow Region 142290, Russian Federation,

^dPhysical Biosciences Division, Lawrence Berkeley National Laboratory, 1 Cyclotron Road, Berkeley, CA 94702, USA, and

^eBiosciences National Laboratory, National Center for Energy and Materials Research, Giuseppe Maximo Scolfaro 10000, 13083-970 Campinas-SP, Brazil

Correspondence e-mail:
christian.betzel@uni-hamburg.de

The crystal structure of the myotoxic, cell-penetrating, basic polypeptide crotamine isolated from the venom of *Crotalus durissus terrificus* has been determined by single-wavelength anomalous dispersion techniques and refined at 1.7 Å resolution. The structure reveals distinct cationic and hydrophobic surface regions that are located on opposite sides of the molecule. This surface-charge distribution indicates its possible mode of interaction with negatively charged phospholipids and other molecular targets to account for its diverse pharmacological activities. Although the sequence identity between crotamine and human β -defensins is low, the three-dimensional structures of these functionally related peptides are similar. Since crotamine is a leading member of a large family of myotoxic peptides, its structure will provide a basis for the design of novel cell-penetrating molecules.

1. Introduction

Crotamine, a highly basic (pI = 10.3) 42-amino-acid polypeptide (molecular mass 4.8 kDa), was first isolated in 1947 from the venom of the Brazilian rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Gonçalves & Polson, 1947). Crotamine is of high pharmacological importance as a potent analgesic and has been shown to be over 30-fold more effective than morphine (Giorgi *et al.*, 1993; Mancin *et al.*, 1998). It also selectively inhibits and interferes with the functioning of $K_v1.3$ channels, promotes the permeability of bacterial membranes (Oguiura *et al.*, 2011) and is considered to be a promising cell-penetrating agent capable of accumulating in the nucleus and in transporting DNA into replicating cells (Kerkis *et al.*, 2004, 2010). It has been suggested that crotamine possesses the potential to transport drugs into mammalian cells without requiring specific receptors. More recently, it has been demonstrated that crotamine possesses both antitumoral and antibacterial activities (Lee *et al.*, 2011).

Crotamine possesses three disulfide bridges (Boni-Mitake *et al.*, 2001) and a number of isoforms have been characterized (Toyama *et al.*, 2000; Ponce-Soto *et al.*, 2007). The overall fold of crotamine is homologous to antimicrobial peptides (AMPs) belonging to the α -defensin, β -defensin and insect defensin families (Dimarcq *et al.*, 1998) and possessing the same number of disulfide bridges (Hoover *et al.*, 2001). Despite the differences in amino-acid composition, crotamine possesses the same structural scaffold as mammalian α -defensins and β -defensins, consisting of a three-stranded β -sheet core and a framework of loops stabilized by six disulfide-linked cysteines (Ganz *et al.*, 1985). Both α -defensins and β -defensins consist of a triple-stranded β -sheet with a distinct 'defensin' fold (Ganz, 2003). Functionally, defensins display a wide spectrum of activities and trigger diverse effects. Some of these peptides

Received 27 April 2013

Accepted 29 June 2013

PDB Reference: crotamine,
4gv5

Table 1

Crystal parameters and data-collection and refinement statistics.

Values in parentheses are for the highest resolution shell.

	Pt-derivative	Native
Data collection		
Beamline	X12, DORIS III	P14, PETRA III
Space group	$I2_12_12_1$	$I2_12_12_1$
Unit-cell parameters (Å)	$a = 66.94, b = 74.55,$ $c = 80.45$	$a = 66.92, b = 74.33,$ $c = 80.19$
Resolution (Å)	54.6–2.5 (2.60–2.50)	54.5–1.7 (1.79–1.69)
Measured reflections	36251 (1931)	139383 (13889)
Completeness (%)	99.4 (75.2)	97.7 (85.3)
Averaged multiplicity	5.3 (2.5)	6.3 (5.0)
Average $I/\sigma(I)$	26.0 (5.7)	20.8 (1.1)
R_{merge}^\dagger (%)	3.6 (16.7)	3.7 (14.2)
Structure solution (<i>AutoSol</i>)		
No. of sites	3	
Skew ‡	0.16	
CORR _{r.m.s.} §	0.88	
Figure of merit (FOM)	0.36	
Estimated map CC	0.56	
Structure building (<i>AutoBuild</i>)		
Residues built	99	
R_{work} (%)	33.1	
R_{free} (%)	37.3	
Map CC	0.75	
Refinement		
Resolution (Å)		10.0–1.7
R factor (%)		16.6 (17.1)
Free R factor (%)		22.5 (22.9)
Overall B factor (Å 2)		33.3
R.m.s. deviations		
Bond lengths (Å)		0.03
Bond angles (°)		2.85
Ramachandran plot, residues in (%)		
Most favoured region		95.8
Additionally allowed region		4.2
No. of molecules		
Protein		3
Water		65
Sulfate ions		3
Thiocyanate ions		4
Glycerol		4

$^\dagger R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$, where $\langle I(hkl) \rangle$ is the mean intensity of the observations $I_i(hkl)$ of reflection hkl . ‡ Deviation from a Gaussian distribution. § Correlation of a local r.m.s. density.

possess anti-Gram-positive activities and participate in anti-bacterial defence reactions (Cociancich *et al.*, 1993).

Although croptamine was isolated more than 60 years ago (Gonçalves & Polson, 1947), it has been extremely recalcitrant to crystallization, probably owing to its high intrinsic flexibility as confirmed by NMR studies (Endo *et al.*, 1989; Nicastro *et al.*, 2003; Fadel *et al.*, 2005).

In this work, we report the first crystal structure of croptamine, a leading member of a large family of highly basic polypeptides.

2. Material and methods

2.1. Purification of croptamine

The purification and crystallization of croptamine have been described before (Coronado *et al.*, 2012). In summary, croptamine from crude *C. durissus terrificus* venom obtained from CEVAP (Center for the Study of Venoms and Venomous

Animals), Botucatu, Brazil was isolated by a single cation-exchange chromatography step applying a MonoS HR 10/10 column (Amersham Biosciences). The molecular mass and sequence of the amino acids were analysed by mass spectroscopy and single crystals suitable for X-ray diffraction data collection were obtained after 2 d by vapour diffusion when croptamine at a concentration of 22 mg ml $^{-1}$ in deionized water was equilibrated against a reservoir solution consisting of 0.2 M sodium thiocyanate, 1.9 M ammonium sulfate pH 6.1, as described in detail previously (Coronado *et al.*, 2012).

2.2. X-ray data collection

Since attempts to solve the structure of croptamine by molecular replacement using either the NMR-derived coordinates of croptamine (PDB entries 1h5o and 1z99; Nicastro *et al.*, 2003; Fadel *et al.*, 2005) or the defensin structures known to date were unsuccessful, SAD (single-wavelength anomalous dispersion) was applied to solve the phase problem. A native data set was collected to 1.7 Å resolution on the EMBL beamline P14 at PETRA III (DESY/Hamburg). The native X-ray diffraction data were integrated, processed and scaled using the *XDS* software (Kabsch, 2010). A suitable heavy-metal derivative was obtained by soaking crystals for approximately 12 h in a 0.1 M potassium hexachloroplatinate (K $_2$ PtCl $_6$) solution (Heavy Atom Screens; Hampton Research). Prior to data collection, crystals were flash-cooled in a nitrogen-gas stream at 100 K. MAD (multi-wavelength anomalous dispersion) data were collected on the EMBL beamline X12 at DORIS III (DESY/Hamburg) at the peak, inflection and high-energy points of the Pt fluorescence spectrum. However, the data from the peak wavelength displayed a very clear anomalous signal and the SAD technique was used. Anomalous data reduction and determination of the space group and unit-cell parameters were carried out with the *iMOSFLM* software (Battye *et al.*, 2011). The data-collection statistics are presented in Table 1.

2.3. Model building and refinement

Phases were determined by SAD using the program *Phaser* in the *PHENIX* software suite (Adams *et al.*, 2010) at 2.5 Å resolution by exploiting the anomalous signal of platinum ions. The initial electron-density map was of sufficient quality to build approximately 90% of three polypeptide chains of croptamine present in the asymmetric unit using automated building in *phenix.autobuild* (Adams *et al.*, 2010). *REFMAC* (Murshudov *et al.*, 2011) in combination with the inspection of the electron-density maps using the program *Coot* (Emsley *et al.*, 2010) was used to complete and refine the model to 1.7 Å resolution with an R value of 16.6% and an R_{free} of 22.5%. The final model also contains 65 solvent water molecules, four glycerol molecules, four thiocyanate ions and three sulfate ions. Refinement statistics are presented in Table 1.

2.4. Small-angle X-ray scattering (SAXS)

Croptamine samples were prepared in conditions with different pH values: (i) 0.05 M acetic acid pH 5.0, (ii) 0.05 M

Tris-HCl pH 9.0 and (iii) pure water. SAXS data were collected with concentrations of 1, 2, 5 and 9.7 mg ml⁻¹. The concentrations were determined at 280 nm using a NanoDrop 2000C spectrophotometer. The extinction coefficient of the protein was calculated using the online program *ProtParam* (Gasteiger *et al.*, 2005). SAXS data from crotonamine solutions were collected on EMBL beamline P12 at PETRA III (DESY/Hamburg) at 295 K using a two-dimensional photon-counting PILATUS 2M pixel X-ray detector (DECTRIS). All data sets were normalized to the incident-beam intensity and corrected for detector response, and scattering of the buffer was subtracted using *ATSAS* (Petoukhov *et al.*, 2007).

Table 2
Hydrogen-bond contacts of crotonamine molecules in the asymmetric unit.

A	B	C	Distance (Å)
Glu15 OE1	Lys35 NZ		3.27
Glu15 OE1	Cys18 N		2.91
Asp24 O	Lys14 NZ		3.11
Lys35 NZ	Glu15 OE1		2.95
Cys18 N	Glu15 OE1		2.89
Lys14 NZ	Pro21 O		3.00
Lys14 NZ	Asp24 O		2.79
	Cys11 O	Arg31 NH1	2.82
	Cys11 O	Arg31 NH2	2.97
	Arg31 NH2	Tyr1 OH	2.64

3. Results and discussion

3.1. Overall structure

Crystals of crotonamine belonged to space group *I*2₁2₁2₁, with unit-cell parameters *a* = 66.92, *b* = 74.33, *c* = 80.19 Å, and contained three molecules in the asymmetric unit. The overall fold of crotonamine is illustrated in Fig. 1(a). Residues Lys2–Lys7 form a single α-helical turn which flanks a two-stranded antiparallel β-sheet formed by residues Gly9–Pro13 (β₁) and Trp34–Lys38 (β₂) located in the core of the molecule. A short α-helical turn is formed by residues Pro20–Ser23. The polypeptide is stabilized by three disulfide bonds: Cys4–Cys36, Cys11–Cys30 and Cys18–Cys37. The disulfide bridge Cys4–Cys36 anchors the first α-helical segment to β₂. β₁ and α₂ are connected by a flexible loop Lys14–Leu19, and helical turn α₂ is connected to β₂ by a more extended and flexible loop formed by residues Asp24–Arg33. Overall, the topology can be classified as α₁β₁α₂β₂. The β-sheet is stabilized by hydrogen bonds between strands β₁ and β₂, involving residues His10–Cys37 and Phe12–Lys35, and hydrogen bonds between strand β₂ and α₂, formed by Ser23–Lys38. Two hydrogen bonds connect β₂ to the C-terminal β-turn.

As crotonamine is relatively small, all charged as well as hydrophobic residues are exposed to the solvent, a circumstance that makes crotonamine unusually ‘sticky’. It is likely that these electrostatic and hydrophobic forces on the surface, in

combination with a disulfide-stabilized molecular scaffold, enable crotonamine or crotonamine oligomers to complex with target proteins. Most hydrophobic residues are located on one side of the molecule and the positively charged residues Lys2, Lys6, Lys7, Lys14, Lys16, Lys27, Lys35, Lys38, Lys39, Arg31 and Arg33 are clustered on the opposite side, as shown in Fig. 1(b). These residues are exposed on the surface of crotonamine and form distinct hydrophobic and cationic regions which are positioned roughly on opposite sides of the amphiphilic molecule, as shown in Fig. 1(c).

Superposition with the crotonamine NMR structure (Nicastro *et al.*, 2003; Fadel *et al.*, 2005) resulted in a mean C^α r.m.s.d. value of 2.12 Å, indicating a relatively high spatial deviation between the NMR and crystal structures, and higher flexibility of the NMR solution structure.

3.2. The quaternary arrangement

Both SAXS and dynamic light-scattering measurements indicated that the protein was monomeric in solution (Coronado *et al.*, 2012). In the crystal structure three molecules of crotonamine

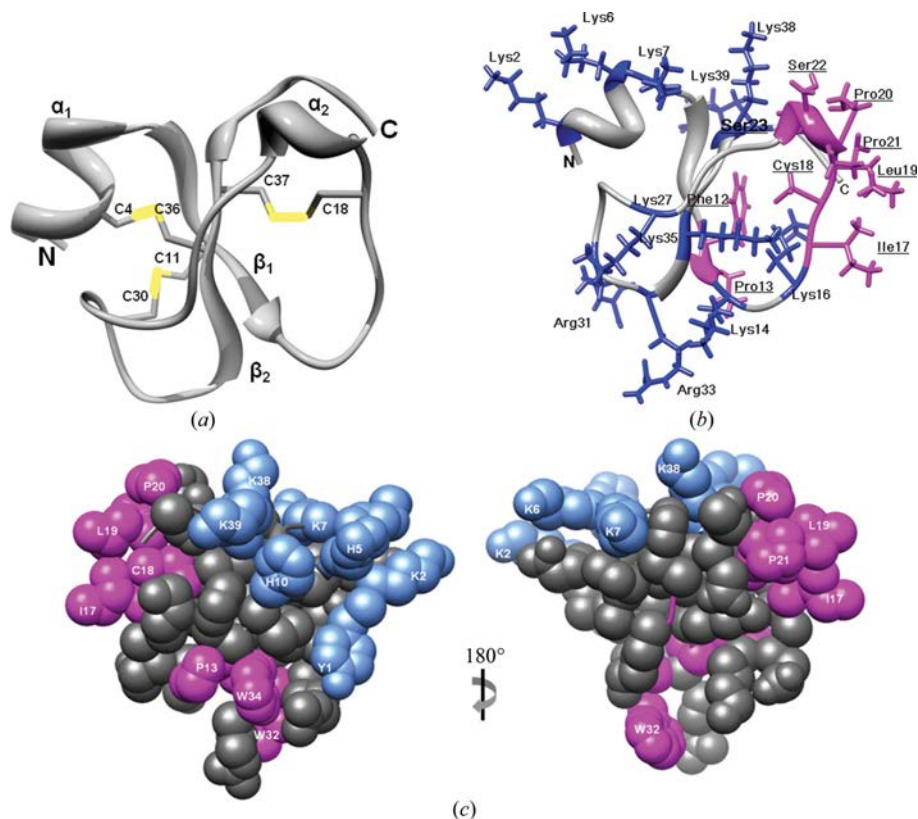


Figure 1
(a) Structure of crotonamine. The N- and C-termini and the cysteine residues are labelled. (b) The highly hydrophobic residues in pink are located on one side of the molecule and the positively charged residues in blue are on the opposite side. (c) Space-filling presentation of crotonamine, highlighting the well defined amphiphilic surface region in blue and pink.

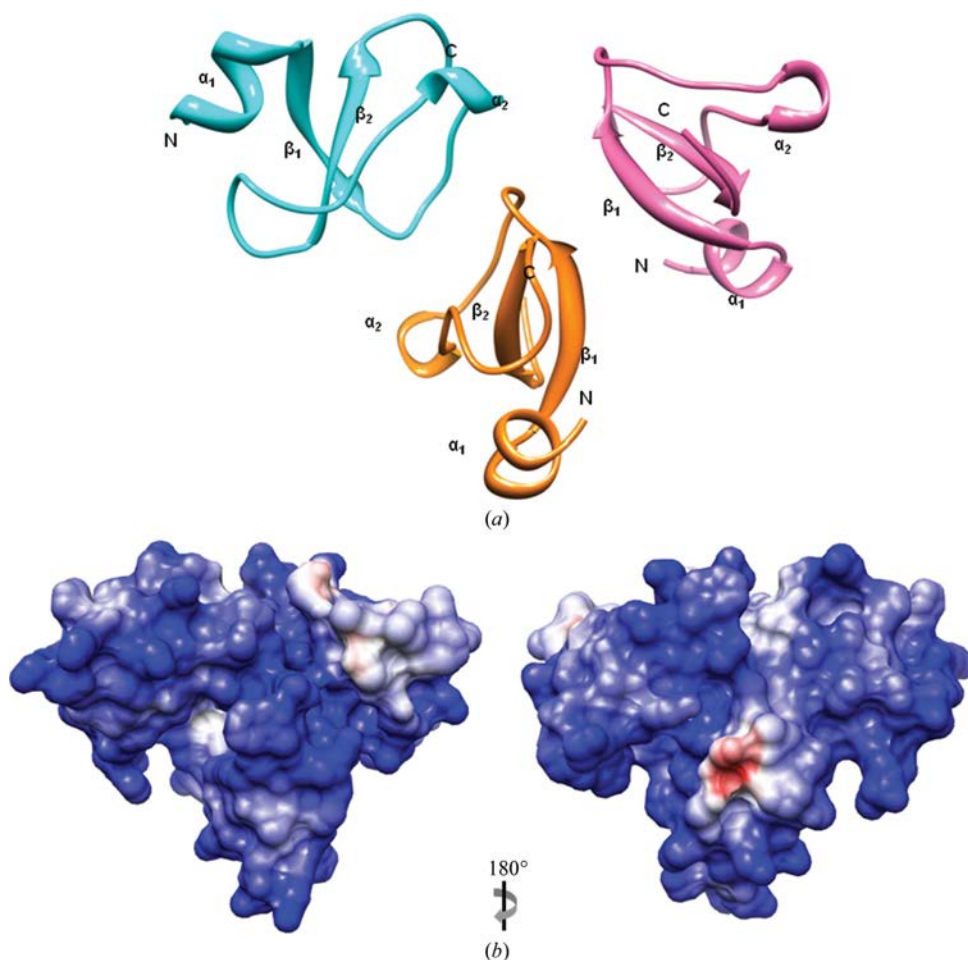


Figure 2
(a) Cartoon plot of the crotonamine trimer. (b) Surface-charge distribution in two orientations.

are present in the asymmetric unit (Fig. 2), which is stabilized by a number of intermolecular contacts involving main-chain and side-chain atoms. In the crystal structure chains *A–B*, *A–C* and *B–C* bury 353, 261 and 121 Å², respectively. This corresponds to approximately 6–10% of the overall surface area of each monomer. A careful inspection of interactions stabilizing the trimer in the crystal showed the presence of two sulfate ions in the interface of chains *A* and *C*, close to residues Cys11 and His10 of chain *C* and Lys16, Phe12 and Pro13 of chain *A*. In addition, four glycerol and three thiocyanate molecules were identified at almost equivalent positions in the interface regions of chains *A–B*, *B–C* and *C–A*, forming hydrogen-bonding, van der Waals and hydrophobic interactions stabilizing the trimer. All intermolecular interactions are summarized in Table 2.

3.3. Structural similarities between crotonamine and antimicrobial peptides

The high positively charged surface permits us to hypothesize that crotonamine can interact electrostatically with the negatively charged surface of membranes with the potential to induce the formation of gaps, through which ions and/or other molecules can diffuse.

In Fig. 3(a) and Table 3 a sequence comparison and structural characteristics of homologous antimicrobial (AMP) and antimicrobial-like (defensin-like) peptides of different origin are shown. The defensin-like polypeptides share relatively low sequence identities in the range 15–35%; however, they have a homologous secondary-structural arrangement of α -helices, β -sheets and random coils, as well as the conservation of six cysteine residues forming three disulfide

4GV5	1	-----YKQCHKKGGH-CFPKEKI-CLEPSSDP-GKMDERWRWK-----C-CK-KGSG-----
2PM1	1	-----A-CY-----ERI-PA-C-IAGEAAYGT-C-IYQGalWAF-C-----
1IJU	1	-----DH-YNCVSSGGQ-CLY-SA-C-EIFTKIQGT-C-YRGGAK-C-CK-----
1FD4	1	-----GIGDFVTLKSGAI-C-HPV-FC-PRRYKQIGT-CGLPGTK-C-CK-KP-----
1KJ6	1	-----GIINTLQKYYCRVRGGR-C-AVL-SCLPKEE-QIOK-CSTRGRK-C-CRRKK-----
2CRD	1	-----EFTNVSC-TTSKE-C-WSV-CQRLHNTSRGK-CMNKK-CRCYS-----
1I2U	1	-----DKLIGSCVWGVNYTSD-C-NGE-CKR-RGYKGGH-CGSPANVN-CWCET-----
1LQQ	1	VRDAYIAKYNVCVYECFR-DSY-C-NDL-CTK-NGASSGY-CQWAGKYGNACWYALPDNVPIRVPGKCH-
1P9Z	1	-----ETCASRCPRP-C-NAGL-CC---SIY-DY-CGSGAA-Y-CGA-G---NCRCC---CRG-
1D6B	1	-----IMPFEMQACWHSVSGV-CRDKSERNCKE-MAWTY-CENRNOK-C-CEY-----

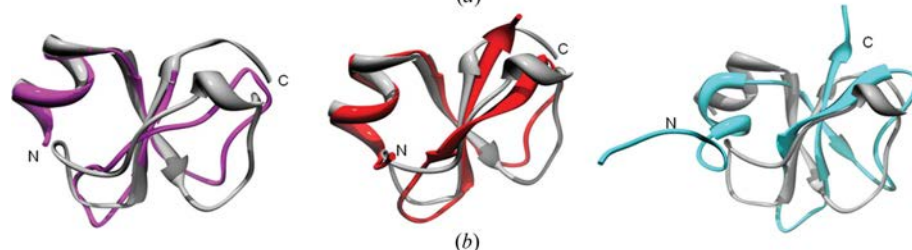


Figure 3
(a) Sequence alignment of antimicrobial peptides. Conserved Cys residues are indicated in dark grey. Crotonamine (PDB entry 4gv5), defensin-like peptide 2 (PDB entry 1d6b), heliomicin (PDB entry 1i2u), toxin III (PDB entry 1lqj), *Eucommia* antifungal peptide 2 (PDB entry 1p9z), charybdotoxin (PDB entry 2crd), human β -defensin 1 (PDB entry 1iju), human β -defensin 2 (PDB entry 1fd4), human β -defensin 3 (PDB entry 1kj6) and human α -defensin 1 (PDB entry 2pm1). (b) Superposition of crotonamine (cartoon plot in light grey) with h β D-1 (PDB entry 1iju, pink), h β D-2 (PDB entry 1fd4, red) and h β D-3 (PDB entry 1kj6, cyan). The corresponding C α r.m.s.d. values are 1.8, 1.8 and 2.6 Å, respectively.

Table 3

Comparison of the amino-acid sequence of crotamine with α -defensin, β -defensin and defensin-like peptides.

Amino-acid sequences are given in one-letter code.

AMP	Length	Amino-acid sequence	Secondary structure	Disulfide bridges	Organism	PDB code
CRO	42	YKQCHKKGGHCFPKEKICLPPSSDFGKMDCRWR-WKCCCKKGS	α -Helix aligned to antiparallel two-stranded β -sheet	3	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	4gv5
EAFP-2	30–43	ETCASRCPRPCNAGLCCSIYGYCGSAAAYCGAGN-CRCQCRG	Two α -helices aligned to three-stranded β -sheet random coils	5	<i>Eucommia ulmoide</i>	1p9z
CHTX	30–40	EFTNVSCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKC-RCYS	Small three-strand β -sheet, α -helix, random coil	3	<i>Leiurus quinquestriatus hebraeus</i>	2crd
HEL	44	DKLIGSCVWGA VNYTSDCNGECKRRGYKGGHC-GSFANVNCWCET	α -Helix, three-stranded antiparallel β -sheet, random coil	3	<i>Heliopsis virescen</i>	1i2u
Toxin III	64	VRDAYIAKNYNCVYECFRDYSYCNLDCTKNGASS-GYQWAGKYGNACWCYALPDNPIRVPGKCH	α -Helix, three-stranded antiparallel β -sheet, random coil	4	<i>Leiurus quinquestriatus hebraeus</i>	1lqq
DLP-2	42	IMFFEMQACWHSVGVCRDKSERNCKPMAWYCE-RRNQKCEY	Small α -helix, two-stranded β -sheet, random coils	3	<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	1d6b
H β D-1	36	DHYNVSSGGQCLYSACPIFTKIQGT CYRGKAK-CCK	α -Helix, three-stranded β -sheet, random coils	3	<i>Homo sapiens</i>	1iju
H β D-2	41	GIGDPVTCLKSGAICHVPFCPRRYKQIGTCGLPGT-KCCKKP	α -Helix, three-stranded β -sheet, random coils	3	<i>Homo sapiens</i>	1fd4
H β D-3	45	GIINTLQKYCRVRGGRCVLSCLPKKEEQIGKCS-TRGRKCCRKK	α -Helix, three-stranded β -sheet, random coils	3	<i>Homo sapiens</i>	1kj6
HNP-1	30	ACYCRIPACIAGEAAAYGTCTIYQ GALWAFCC	Three-stranded β -sheet, random coils	3	<i>Homo sapiens</i>	2pm1

Table 4

Summary of charged and hydrophobic residues of crotamine in comparison to other antimicrobial peptides.

SA: total surface accessibility.

	CRO	H β D-1	H β D-2	H β D-3	CHTX	DLP-2	HEL	Toxin III	HNP-1	EAFP-2
Arg ⁺	2	1	2	7	3	3	2	3	1	4
Asp ⁻	2	1	1	—	—	1	2	4	—	—
Glu ⁻	1	—	—	2	2	4	2	1	1	1
Lys ⁺	9	4	5	6	4	3	3	4	—	—
Total	14	6	8	15	9	11	9	12	2	5
Positive	11	5	7	13	7	6	5	7	1	4
Negative	3	1	1	2	2	5	4	5	1	1
Trp	2	—	—	—	1	2	2	2	1	—
Tyr	1	3	1	—	1	2	2	7	3	3
Phe	2	1	1	—	1	2	1	1	1	—
SA (Å ²)	3223	2808	2858	4025	3019	3888	3060	4069	2246	2997

bonds (Schibli *et al.*, 2002). An overall structural comparison of the three known human defensin structures h β D-1, h β D-2 and h β D-3 with crotamine is shown in Fig. 3(b). The corresponding C α r.m.s.d. values are 1.8, 1.8 and 2.6 Å, respectively. It is obvious that, despite the moderate sequence identity, evolutionary selective pressures have favoured a similar overall three-dimensional structure and fold of these functionally related peptides. The predominance of functionally relevant positively charged residues (Table 4) is a common feature of crotamine and defensins. Most probably this facilitates the electrostatic interactions with the anionic membrane surface.

Despite high overall structural conservation, some physicochemical differences between human β -defensins and crotamine have been addressed as likely determinants of the observed functional differences (Yount *et al.*, 2009). The arginine and lysine content varies between the three human

β -defensins and crotamine, as shown in Table 4. These distributions of charged residues are also typical for β -defensins from other animals. In contrast, lysine residues are relatively rare in α -defensins. The predominance of positively charged residues in crotamine is likely to facilitate electrostatic interactions with the anionic membrane surface. The total surface accessibility of crotamine and h β Ds differs, the accessible surface area changes occur when residues on the molecule surface are replaced by others having large or smaller side chains (Table 4). The α -helix, the antiparallel β -sheet and the β -turn present in the human β -defensins 1–3 (Hoover

et al., 2000, 2001; Schibli *et al.*, 2002) are also conserved in crotamine.

Fig. 4 is an overview highlighting the structural similarities and differences of defensin-like polypeptides. In all structures the basic secondary-structural elements and disulfide bridges, a feature initially attributed to polypeptides classified as defensins, are conserved. However, toxin III and *Eucommia* antifungal peptide 2 (EAFP-2) have four and five disulfide bonds, respectively. Among the antimicrobial polypeptides with six cysteines the α -defensin and β -defensin group is the best characterized to date. They are widely distributed in different phyla, including plants, insects, arthropods and vertebrates (Ganz, 2004; Lehrer *et al.*, 1993). The polypeptide defensin-like peptide 2 (DLP-2) isolated from platypus (*Ornithorhynchus anatinus*) venom (Torres *et al.*, 2000) shares 34% sequence identity with crotamine but displays no antimicrobial activity. Heliomicin (HEL), which is known to be an

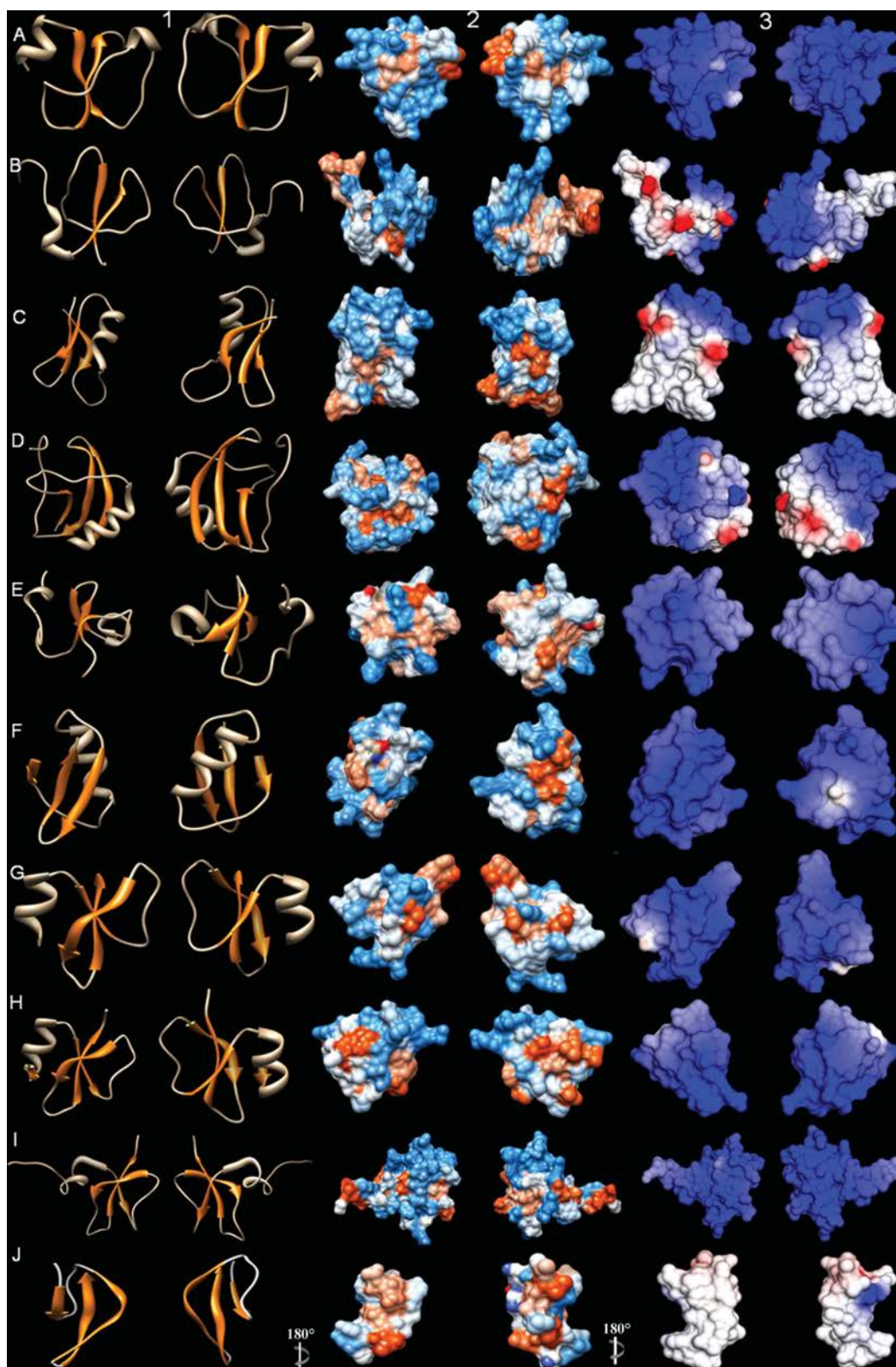


Figure 4

Structure comparison of crotonamine with homologous antimicrobial and antimicrobial-like peptides from different organisms in two orientations. Column 1, the γ -core domain is shown in orange. Column 2, hydropathy plot overlay: dark orange/hydrophobic; light orange/intermediate; blue/hydrophilic. Column 3, surface charge: blue, basic (Arg, Lys); red, acidic (Asp, Glu). Row A, crotonamine from *C. durissus terrificus* venom (PDB entry 4gv5); row B, defensin-like peptide 2 (1d6b); row C, heliomicin (1i2u); row D, toxin III (1lqq); row E, *Eucommia* antifungal peptide 2 (1p9z); Row F, charybdotoxin (2crd); row G, human β -defensin 1 (1iju); row H, human β -defensin 2 (1fd4); row I, human β -defensin 3 (1kj6); row J, human α -defensin 1 (2pm1).

antifungal defensin from the lepidopteran *Heliothis virescens* (Lamberty *et al.*, 2001; Sverdllova & Nefelova, 1999), contains two Arg and three Lys residues and shares 22% sequence identity with crotamine. Insect defensins are characterized by a cysteine-stabilized $\alpha\beta$ motif (CS $\alpha\beta$), which consists of an α -helix and an antiparallel triple-stranded β -sheet connected by two disulfide bridges (Lamberty *et al.*, 2001; Cornet *et al.*, 1995). The CS $\alpha\beta$ motif has also been encountered in the scorpion toxin charybdotoxin (CHTX; Bontems *et al.*, 1992), toxin III (Landon *et al.*, 1996) and in plant defensins such as EAFP-2 (Huang *et al.*, 2004; Carvalho & Gomes, 2009). This motif has not been observed in snake-venom toxin to date. The structure of charybdotoxin, a peptide from the venom of the yellow scorpion *Leiurus quinquestriatus hebraeus* that affects K⁺ channels, shares approximately 15% sequence similarity with crotamine.

In conclusion, the high-resolution crystal structure of crotamine shows an asymmetric surface-charge distribution which corresponds to the observed activity. The crystal structure of crotamine will also help to understand the mode of action of other homologous peptides such as myotoxin and will support the design of novel molecules capable of transporting drugs into cells.

This project was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Project BE 1443-18-1, 26-1), FAPESP, CNPq, CAPES and DAAD (PROBAL 50754442). MAC thanks CAPES (grant NR-8248/12-5) for the exchange fellowship. DG thanks the Alexander von Humboldt Foundation (AvH), Bonn, Germany for providing a Research Fellowship. The Berkeley Center for Structural Biology is supported in part by the National Institutes of Health, National Institute of General Medical Sciences and the Howard Hughes Medical Institute. The Advanced Light Source is supported by the US Department of Energy under Contract No. DE-AC02-05CH11231. We would like to thank Dr Alexey Kikhney and the staff of the Biological Small Angle Scattering group (EMBL/Hamburg, Germany) for providing the opportunity to perform SAXS measurements.

References

- Adams, P. D. *et al.* (2010). *Acta Cryst.* **D66**, 213–221.
- Battye, T. G. G., Kontogiannis, L., Johnson, O., Powell, H. R. & Leslie, A. G. W. (2011). *Acta Cryst.* **D67**, 271–281.
- Boni-Mitake, M., Costa, H., Spencer, P. J., Vassiliev, V. S. & Rogero, J. R. (2001). *Braz. J. Med. Biol. Res.* **34**, 1531–1538.
- Bontems, F., Gilquin, B., Roumestand, C., Ménez, A. & Toma, F. (1992). *Biochemistry*, **31**, 7756–7764.
- Carvalho, A. de O. & Gomes, V. M. (2009). *Peptides*, **30**, 1007–1020.
- Cociancich, S., Ghazi, A., Hetru, C., Hoffmann, J. A. & Letellier, L. (1993). *J. Biol. Chem.* **268**, 19239–19245.
- Cornet, B., Bonmatin, J.-M., Hetru, C., Hoffmann, J. A., Ptak, M. & Vovelle, F. (1995). *Structure*, **3**, 435–448.
- Coronado, M. A., Georgieva, D., Buck, F., Gabdoulkhakov, A. H., Ullah, A., Spencer, P. J., Arni, R. K. & Betzel, C. (2012). *Acta Cryst.* **F68**, 1052–1054.
- Dimarcq, J.-L., Bulet, P., Hetru, C. & Hoffmann, J. (1998). *Biopolymers*, **47**, 465–477.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. (2010). *Acta Cryst.* **D66**, 486–501.
- Endo, T., Oya, M., Ozawa, H., Kawano, Y., Giglio, J. R. & Miyazawa, T. (1989). *Protein Chem.* **8**, 807–815.
- Fadel, V., Bettendorff, P., Herrmann, T., de Azevedo, W. F., Oliveira, E. B., Yamane, T. & Wüthrich, K. (2005). *Toxicon*, **46**, 759–767.
- Ganz, T. (2003). *Nature Rev. Immunol.* **3**, 710–720.
- Ganz, T. (2004). *J. Leukoc. Biol.* **75**, 34–38.
- Ganz, T., Selsted, M. E., Szklarek, D., Harwig, S. S., Daher, K., Bainton, D. F. & Lehrer, R. I. (1985). *J. Clin. Invest.* **76**, 1427–1435.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. & Bairoch, A. (2005). *The Proteomics Protocols Handbook*, edited by J. M. Walker, pp. 571–607. Totowa: Humana Press.
- Giorgi, R., Bernardi, M. M. & Cury, Y. (1993). *Toxicon*, **10**, 1257–1265.
- Gonçalves, J. M. & Polson, A. (1947). *Arch. Biochem.* **13**, 253–259.
- Hoover, D. M., Chertov, O. & Lubkowsky, J. (2001). *J. Biol. Chem.* **276**, 39021–39026.
- Hoover, D. M., Rajashankar, K. R., Blumenthal, R., Puri, A., Oppenheim, J. J., Chertov, O. & Lubkowsky, J. (2000). *J. Biol. Chem.* **275**, 32911–32918.
- Huang, R.-H., Xiang, Y., Tu, G.-Z., Zhang, Y. & Wang, D.-C. (2004). *Biochemistry*, **43**, 6005–6012.
- Kabsch, W. (2010). *Acta Cryst.* **D66**, 125–132.
- Kerkis, A., Kerkis, I., Rádis-Baptista, G., Oliveira, E. B., Vianna-Morgante, A. M., Pereira, L. V. & Yamane, T. (2004). *FASEB J.* **18**, 1407–1409.
- Kerkis, I., Silva, F. de S., Pereira, A., Kerkis, A. & Rádis-Baptista, G. (2010). *Expert Opin. Investig. Drugs*, **19**, 1515–1525.
- Lamberty, M., Caille, A., Landon, C., Tassin-Moindrot, S., Hetru, C., Bulet, P. & Vovelle, F. (2001). *Biochemistry*, **40**, 11995–12003.
- Landon, C., Cornet, B., Bonmatin, J. M., Kopeyan, C., Rochat, H., Vovelle, F. & Ptak, M. (1996). *Eur. J. Biochem.* **236**, 395–404.
- Lee, J.-Y., Choi, Y.-S., Suh, J.-S., Kwon, Y.-M., Yang, V. C., Lee, S.-J., Chung, C.-P. & Park, Y.-J. (2011). *Int. J. Cancer*, **128**, 2470–2480.
- Lehrer, R. I., Lichtenstein, A. K. & Ganz, T. (1993). *Annu. Rev. Immunol.* **11**, 105–128.
- Mancin, A. C., Soares, A. M., Andrião-Escarso, S. H., Faça, V. M., Greene, L. J., Zuccolotto, S., Pelá, I. R. & Giglio, J. R. (1998). *Toxicon*, **36**, 1927–1937.
- Murshudov, G. N., Skubák, P., Lebedev, A. A., Pannu, N. S., Steiner, R. A., Nicholls, R. A., Winn, M. D., Long, F. & Vagin, A. A. (2011). *Acta Cryst.* **D67**, 355–367.
- Nicastro, G., Franzoni, L., de Chiara, C., Mancin, A. C., Giglio, J. R. & Spisni, A. (2003). *Eur. J. Biochem.* **270**, 1969–1979.
- Oguiura, N., Boni-Mitake, M., Affonso, R. & Zhang, G. (2011). *J. Antibiot.* **64**, 327–331.
- Petoukhov, M. V., Konarev, P. V., Kikhney, A. G. & Svergun, D. I. (2007). *J. Appl. Cryst.* **40**, s223–s228.
- Ponce-Soto, L. A., Martins-de-Souza, D., Martins, D., Novello, J. C. & Marangoni, S. (2007). *Protein J.* **26**, 533–540.
- Schibli, D. J., Hunter, H. N., Aseyev, V., Starner, T. D., Wiencek, J. M., McCray, P. B., Tack, B. F. & Vogel, H. J. (2002). *J. Biol. Chem.* **277**, 8279–8289.
- Sverdllova, A. N. & Nefelova, M. V. (1999). *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.*, pp. 34–40.
- Torres, A. M., de Plater, G. M., Doverskog, M., Birinyi-Strachan, L. C., Nicholson, G. M., Gallagher, C. H. & Kuchel, P. W. (2000). *Biochem. J.* **348**, 649–656.
- Toyama, M. H., Carneiro, E. M., Marangoni, S., Barbosa, R. L., Corso, G. & Boschero, A. C. (2000). *Biochim. Biophys. Acta*, **1474**, 56–60.
- Yount, N. Y., Kupferwasser, D., Spisni, A., Dutz, S. M., Ramjan, Z. H., Sharma, S., Waring, A. J. & Yeaman, M. R. (2009). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **106**, 14972–14977.