UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU
DEPARTAMENTO DE FÍSICA E BIOFÍSICA

"Estudos estruturais por difração de raios X de fosfolipases A_2 em presença de íons com importância funcional"

Rafael Junqueira Borges
Orientadora: Prof. Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes
Co-orientadora: Juliana Izabel dos Santos

Botucatu – SP
2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

DEPARTAMENTO DE FÍSICA E BIOFÍSICA

"Estudos estruturais por difração de raios X de fosfolipases A_2 em presença de íons com importância funcional"

Rafael Junqueira Borges

Orientadora: Prof. Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes

Co-orientadora: Juliana Izabel dos Santos

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP, como exigência parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas – Modalidade Médica.

Botucatu – SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Borges, Rafael Junqueira.

Estudos estruturais por difração de raios X de fosfolipases A_2 em presença de íons com importância funcional / Rafael Junqueira Borges.- Botucatu [s.n], 2009.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas – Modalidade Médica) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2009

Orientador: Marcos Roberto de Mattos Fontes

Co-orientadora: Juliana Izabel dos Santos

1. Fosfolipase A_2 2. Serpente - Veneno 3. Cristalografia de proteínas

Palavras-chave: Biologia molecular estrutural; Cristalografia de proteínas; Fosfolipases $A_{2;}$ Veneno botrópico; Miotoxinas.

À minha família, meus pais, Edgard e Raquel, e ao meu irmão, Felipe.

Agradecimentos

A Deus por me dar forças e tudo que eu necessito.

Aos meus pais, por todo amor e afeto, por terem se esforçado tanto para que eu tivesse as melhores condições em Botucatu e em toda minha vida, só posso ser eternamente grato.

Ao meu irmão, pelas nossas longas conversas sobre os mais variados assuntos, favorecendo que cada um encontre seu caminho na vida.

À Cibele, pelo apoio, afeto e incentivo durante a faculdade e minha Iniciação Científica.

À Lorena, por nossas intermináveis conversas, pelas sugestões, pelo incentivo.

Aos grandes amigos que tive o enorme prazer de conhecer enquanto estive na graduação, principalmente Bugs, Loka, Minu, Panda, Pelanka, Serosa, Xéé. Agradeço por todos bons momentos que passamos juntos e por essa forte amizade que formamos.

Aos que estiveram ao meu lado na organização do ERBM, pelos ensinamentos dos mais velhos e por formar essa tão bela família que trabalhou pelo mesmo objetivo.

A todos que acreditaram e que ajudaram a concretização do ENBM.

Ao Ney, pelas aulas, dicas, exercícios, troca de idéias e por se esforçar, em sua profissão, para realmente servir ao próximo e para contribuir que a sociedade seja formada por pessoas mais humanas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de Iniciação Científica concedida.

Ao Andreimar Martins Soares (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP/Ribeirão Preto), por conceder as amostras de veneno serpente.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), pelo apoio técnico e pelo esforço de melhorar os equipamentos e tornar as coletas cada vez mais práticas e eficientes.

À todos do meu laboratório, Ângelo, Agnes, Pituta, Guilherme, Patrícia, Andréa, Mabel e Cilene, pelas discussões científicas, pelas aulas, pelos ensinamentos e pelas brincadeiras transformando o ambiente de trabalho em um local descontraído, mas não menos produtivo.

À minha co-orientadora, por todas nossas conversas sobre os mais variados assuntos; pelas sempre sinceras opiniões sobre os devaneios, dúvidas e poucas certezas da vida; por todas as broncas e puxões de orelha, por todas brincadeiras, por todas as aulas, por todas as dicas, por todos ensinamentos. Enfim por formarmos uma dupla que, apesar de às vezes devagar, trabalha com dedicação, paciência, prazer, tranquilidade, perseverança, eficiência, descontração e com a nobre intenção de trabalhar a serviço da sociedade e da ciência.

Ao meu orientador, por sempre estar disposto a esclarecer eventuais dúvidas, por sempre estar aberto para novas discussões e opiniões, por sempre oferecer espaço para seus alunos participarem das decisões do laboratório, por acreditar em meu potencial e por incentivar meu ingresso na vida acadêmica.

“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro.”

Albert Einstein

RESUMO

Serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis por mais de 90% dos acidentes ofídicos que ocorrem no Brasil. Uma das principais complicações deste tipo de acidente é a necrose muscular, que está relacionada à ação de fosfolipases A_2 e metaloproteases, dois grupos de enzimas presentes no veneno destes animais. Esta complicação não é contornada pela administração do soro antiofídico e, por isso, diversos trabalhos vêm sendo realizados na tentativa de se conhecer os sítios farmacológicos destas toxinas com o intuito de, no futuro, se desenvolver tratamentos complementares à soroterapia.

Este projeto de pesquisa tem como objetivo o estudo estrutural de fosfolipases A_2 (PLA_2s) botrópicas em presença de íons relevantes para a atividade das mesmas, através da técnica de cristalografia de raios X. Recentemente, foi demonstrado que íons, tal como manganês, cálcio e outros interferem na atividade biológica de PLA_2s. Particularmente, Lys49-PLA_2s na presença de íons manganês têm a atividade miotóxica bastante reduzida. Já as Asp49-PLA_2s apresentam atividade catalítica dependente de cálcio, contudo estudos estruturais recentes com uma proteína Asp49-PLA_2 miotóxica (BthTX-II) sugerem um possível mecanismo miotóxico independente deste íon. Dessa forma, foi realizado a co-cristalização da BthTX-II em presença de íons cálcio e a co-cristalização da PrTX-I em presença de íons manganês. Estudos comparativos entre os resultados obtidos e os já existentes na literatura foram realizados na tentativa de melhor compreender as relações estrutura-função destas toxinas.

A estrutura da BthTX-II em presença de íons cálcio não possui esse íon no sítio de coordenação de cálcio, ligação necessária para realizar a catálise. Após comparação desse modelo com o nativo, foi encontrado apenas um desvio significativo, porém sem relação aparente com os resíduos importantes para a atividade da mesma. Na proteína PrTX-I, foram encontrados regiões candidatas para a presença do íon de manganês.

Devido a grande importância das toxinas em estudo, os resultados deste projeto podem trazer importantes conclusões a respeito do sítio farmacológico responsável pela miotoxicidade de PLA_2s, bem como das alterações conformacionais que levam à inibição destas. Além disso, estes resultados podem oferecer subsídios para elaboração de novos medicamentos envolvidos com a miotoxicidade.

Palavras chave: Biologia molecular estrutural; Cristalografia de proteínas; Fosfolipases A_2; Veneno botrópico; Miotoxinas.

ABSTRACT

Snakes from *Bothrops* genus are responsible for more than 90% of the ophidian accidents in Brazil. One of the main complications from this kind of accident is muscular necrosis, which is related to the action of phospholipases A_2 and metalloproteases, two groups of enzymes found in the venom of these animals. Although this complication cannot be solved by serum therapy administration, a great number of studies have been performed with the attempt to know the pharmacological sites of these toxins aiming, in the future, the development of complementary treatments to serum therapy.

This work proposes structural studies of bothropic phospholipases A_2 (PLA_2s) in the presence of ions relevant to their activity, using the X-ray crystallography technique. Recently, it was demonstrated ions, as manganese, calcium and others, interfere in the biological activity of the PLA_2s. Particularly, Lys49-PLA_2s in the presence of manganese ions have miotoxicity reduced. Asp49-PLA_2s show catalytic activity dependent of calcium, although structural studies with a miotoxic Asp49-PLA_2, BthTX-II, suggest a possible catalytic mechanism independent of calcium. Therefore, co-crystallization of BthTX-II in the presence of calcium ions and of PrTX-I in the presence of manganese ions were performed. Comparative structural studies among obtained results and others already published in the literature were performed aiming a better understanding of the structure-function relationship of these toxins.

The BthTX-II with the presence of calcium do not show this ion in the loop of coordination of calcium, presence necessary to develop the catalyses. After comparison of this model with the native one, only one distortion was found, but no apparent relationship with the residues responsible for its activity. In the PrTX-I structure, regions candidates of manganese ions were also found.

The results of this work may add significant conclusions about the pharmacological sites responsible for the myotoxicity exerted by the action of this subgroup of PLA2s, and possible conformational changes leading to their inhibition. Besides that, it can aid others groups to develop new medicaments related to miotoxicity.

Key words: Structural molecular biology, Protein crystallography; Phospholipases $A_{2;}$ Botropic venom; Miotoxins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Local de hidrólise das fosfolipases e produtos desta reação..... 15

Figura 2. Etapas para resolução de uma estrutura protéica por difração de raios X a partir do veneno bruto. Fonte: adaptação de Drenth (1994)..... 24

Figura 3. Esquema do *hanging drop* (gota suspensa)..... 26

Figura 4. Cristais de PrTX-I em presença de manganês obtidos no mês de setembro de 2008..... 33

Figura 5. Modelo preliminar da PrTX-I (2,1Å) em *cartoon*, com 3 regiões candidatas ao manganês (em roxo) 35

Figura 6. Modelo preliminar da PrTX-I (1,9Å) em *cartoon*, com 10 regiões candidatas aos íons (em amarelo) 37

Figura 7. Cristais de PrTX-I em presença de sulfato de manganês obtidos no mês de março de 2009..... 39

Figura 8. Padrão de difração de raios X de BthTX-II (região com pontos de difração apresentando alta mosaicidade) 41

Fígura 9: Cristais obtidos com o kit de 50 soluções da empresa *Hampton Research*..... 43

Figura 10. Semelhança em *cartoon* da estrutura quaternária da BthTX-II (Asp49-PLA_2 miotóxica) e o "dímero convencional" de uma Lys49-PLA_2, BnSP-7 47

Figura11. BthTX-II/Ca^{2+} em *cartoon*. Em zoom, interação dos átomos próximos aos íons de cálcio com suas respectivas distâncias..... 48

Figura 12. Sobreposição de C^{α} da BthTX-II nativa e com cálcio. Em destaque, região com maior r.m.s.d. 50

Figura 13. Presença e/ou ausência de cadeia lateral dos resíduos Glu78/B e Lys115/A nas formas complexada (em roxo) e apo (2OQD) (em ciano) da proteína BthTX-II. As esferas (em ciano e em roxo) representam moléculas de água presentes em ambas as formas. Em linhas pontilhadas são apresentadas as distâncias entre o íon cálcio presente na BthTX-II/Ca^{2+} e o átomo O/Glu78/B de ambas as formas.....50

Figura 14. Resíduos responsáveis pela coordenação do cálcio na catálise em C^{α} de quatro Asp49-PLA_2s, sendo BthTX-II/Ca^{2+} e PrTX-III, miotóxicas e DacuTX de *Deinagkistrodon acutus* e a AhalTX de *Agkistrodon halys*, clássicas com o cálcio coordenado.....53

Figura 15. Em *cartoon*, dímero biológico da BthTX-II/Ca^{2+}, da PrTX-III e da DacuTX (Asp49-PLA_2 ácida de *Deinagkistrodon acutus*) e em *lines* o resíduo da posição 31. 54

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Diagrama de fases..... 27

Gráfico 2. Gráfico Ramachandran da PrTX-I/Mn^{2+}..... 38

Gráfico 3. Gráfico Ramachandran do modelo final da BthTX-II/Ca^{2+}..... 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estatísticas de coleta de dados de difração de raios-X da PrTX-I em resolução de 1,9Å..... 36

Tabela 2. Estatísticas de coleta de dados de difração de raios-X da PrTX-I em resolução de 1,54Å..... 39

Tabela 3. Estatísticas de coleta de dados de difração de raios-X da BthTX-II em resolução de 2,65Å..... 42

Tabela 4. Estatísticas de coleta de novos dados de difração de raios-X da BthTX-II em resolução de 2,05Å..... 44

Tabela 5. Valores de r.m.s.d. em Å para sobreposição de Cα de monômeros da BthTX-II/Ca2+ e da BthTX-II..... 49

Tabela 6. Análise de área de interface e energia livre de solvatação das Asp49 miotóxicas e uma Asp49-PLA2 complexada com cálcio..... 53

LISTA DE ABREVIATURAS

AhalTX	=	Asp49-PLA_2 ácida de *Agkistrodon halys*
Arg	=	Aminoácido arginina
Asp	=	Aminoácido asparagina
Asp49-PLA_2s	=	Fosfolipases A_2 com o resíduo asparagina na posição 49
BthTX-II	=	Segunda fração isolada de toxina proveniente do veneno de *Bothrops jararacussu* .
BthTX-II/Ca^{2+}	=	Modelo gerado da proteína BthTX-II cristalizada em presença de íons de cálcio.
BnSP-7	=	Sétima fração extraída de *Bothrops pauloensis*
Ca^{2+}	=	Íon divalente de cálcio
Cl_2SO_4	=	Cloreto de manganês
Cys	=	Aminoácido cisteína
DacuTX	=	Asp49-PLA_2 ácida de *Deinagkistrodon acutus*
Glu	=	Aminoácido ácido glutâmico ou glutamina
Gly	=	Aminoácido glicina
His	=	Aminoácido histidina
Ile	=	Aminoácido Isoleucina
LNLS	=	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
Lys	=	Aminoácido lisina
Lys49-PLA_2s homólogas	=	Fosfolipases A_2 com o resíduo lisina na posição 49, também conhecido como PLA_2s
MAD	=	*Multiwavelength anomalous diffraction*
MIR	=	*Multiple isomorphous replacement*
Mn^{2+}	=	Íon divalente de manganês
$MnSO_4$	=	Sulfato de manganês
Na^{2+}	=	Íon divalente sódio
NCBI	=	*National Center for Biotechnology Information*
PDB	=	Banco de dados de proteínas
PDB id	=	Identificação da proteína no banco de dados de proteínas
Phe	=	Aminoácido fenilalanina
PLA_2s	=	Fosfolipases A_2
PrTX-I	=	Primeira fração isolada de toxina proveniente do veneno de *Bothrops pirajai* .
PrTX-III	=	Terceira fração isolada de toxina proveniente do veneno de *Bothrops pirajai* .
Thr	=	Aminoácido treonina
Trp	=	Aminoácido triptofano
Tris	=	tris(hidroximetil)aminometano
Tyr	=	Aminoácido tirosina
Val	=	Aminoácido valina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO....14
1.1 Estudo de veneno de serpentes do gênero *Bothrops*....15
1.2 Fosfolipases A_2....16
1.3 Fosfolipases A_2 e fosfolipases A_2 homólogas....17
1.4 Fosfolipases A_2 e fosfolipases A_2 homólogas e íons importantes....18
1.5 Proteínas utilizadas....20
1.5.1 Proteína PrTx-I....20
1.5.2 Proteína BthTX-II....20
2 OBJETIVOS....22
2.1 Objetivo geral....23
2.2 Objetivos específicos....23
3 MATERIAL E MÉTODOS....24
3.1 Proteínas utilizadas....26
3.2 Experimentos de cristalização....26
3.3 Coleta de dados de difração de raios X....30
3.4 Elucidação de estruturas tridimensionais....31
3.5 Análise e comparação das estruturas cristalográficas....32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO....33
4.1 Estudos estruturais com a PrTX-I em presença de Mn^{2+}....34
4.1.1 Cristais de PrTX-I/Mn^{2+}....34
4.1.2 Estudos estruturais PrTX-I em presença de cloreto de manganês....35
4.1.3 Estudos estruturais PrTX-I em presença de sulfato de manganês....39
4.2 Estudos estruturais de BthTX-II em presença de íons Ca^{2+}....41
4.2.1 Processamento de conjunto de dados da estrutura da BthTX-II em presença de íons Ca^{2+} presentes em nosso laboratório....42
4.2.2 Obtenção de novos cristais da BthTX-II com íons Ca2+e processamento de novos dados....43
4.2.3 Estudo estrutural da BthTX-II/Ca^{2+}....45
4.2.4 Análise do modelo da BthTX-II/Ca^{2+}....47
4.2.5 Comparação BthTX-II/Ca^{2+} e demais proteínas....50
5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS....56
6 REFERÊNCIAS....59
7 APÊNDICE....65

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Estudos de veneno de serpentes do gênero *Bothrops*

As serpentes são encontradas enraizadas na cultura do ser humano, sua abrangência alcançou diversas épocas através de relatos históricos e lendas, transformando-as principalmente em símbolo de traição, de bruxaria, de morte e de veneno. Apesar de no imaginário popular esses répteis possuírem uma imagem de temor, eles já contribuíram e ainda contribuem para o progresso da ciência e da medicina. O estudo dos componentes dos venenos das serpentes trouxe uma série de avanços no desenvolvimento de medicamentos e na compreensão de processos bioquímicos. Haja vista a produção do soro antiofídico e a elucidação de mecanismos farmacológicos, tais como neurotransmissão na junção neuromuscular, estrutura e função de receptores nicotínicos, processo inflamatório, “cascata de coagulação” dentre outros. Como exemplo pode-se citar o captopril, medicamento desenvolvido a partir do estudo de uma enzima isolada do veneno de *Bothrops jararaca*, que hoje é utilizado para tratamento de hipertensão arterial, insuficiência cardíaca congestiva e doença arterial coronária.

O veneno das serpentes é constituído por uma série de compostos, de carboidratos, lipídios, metais (conjugados a proteínas), aminas biogênicas, nucleotídeos, aminoácidos livres e, em sua maior parte, proteínas. Estas últimas apresentam variadas atividades, podem ser enzimas, receptores farmacológicos, toxinas não-enzimáticas e proteínas não-tóxicas. Diante do grande espectro de atividades farmacológicas e bioquímicas das diversas toxinas de veneno botrópico, o estudo aprofundado destes pode contribuir significativamente para auxiliar na compreensão dos processos que ocorrem nos seres vivos e no desenvolvimento de novos medicamentos.

Estimativas mundiais dos acidentes ofídicos alcançam a margem dos 5 milhões de casos por ano dos quais 50 mil evoluem para mortes, sendo a principal área de risco o meio rural de países tropicais (África, América do Sul e Ásia) (Warrell, 1996; Chippaux, 1998; Chippaux e Goyffon, 1998). Particularmente no Brasil, o estudo dos

componentes dos venenos de serpente do gênero *Bothrops* é mais relevante, já que tais répteis estão distribuídos por todo território nacional e são responsáveis por mais de 90% dos acidentes ofídicos. As serpentes deste gênero com maior importância para a saúde pública compreendem a urutu-cruzeiro ou cruzeira (*Bothrops alternatus*), jararaca ou jararaca-do-norte (*Bothrops atrox*), jararaca-da-seca (*Bothrops erythromelas*), jararaca ou jararaca-preguiçosa (*Bothrops jararaca*), jararacuçu (*Bothrops jararacussu*), jararaca (*Bothrops leucurus*) e caiçaca (*Bothrops moojeni*) (Cardoso, França *et al.*, 2002).

1.2 Fosfolipases A_2

O veneno botrópico é constituído por diversos componentes, dentre os quais cabe destacar as fosfolipases A_2 (PLA_2s – E.C. 3.1.1.4). Estas enzimas são pequenas, estáveis e cálcio-dependentes, com peso molecular aproximado de 14 kDa, que promovem a hidrólise da ligação éster *sn*-2 de fosfolipídios, liberando lisofosfolipídios e ácidos graxos (Figura 1) (Schaloske e Dennis, 2006). A liberação dos ácidos graxos pode funcionar como estoque de energia, segundo mensageiros (Berk e Stump, 1999; Gijon e Leslie, 1999) e como precursores de eicosanóides, que são potentes mediadores de inflamação (Austin e Funk, 1999; Bingham e Austen, 1999). O lisofosfolipídio, outro composto liberado pela atividade da fosfolipase A_2, está envolvido na sinalização celular e remodelagem do fosfolipídio, além de estar associado à perfuração de membrana (Moolenaar, Kranenburg *et al.*, 1997; Balsinde, Balboa *et al.*, 1999).

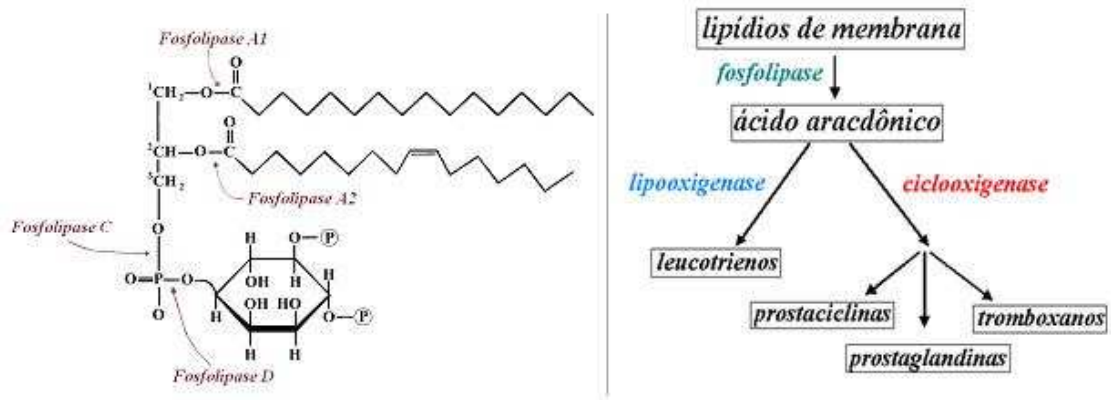


Figura 1. Local de hidrólise das fosfolipases e produtos desta reação.

Atualmente, são conhecidas duas regiões altamente conservadas e de suma importância para a atividade catalítica das PLA_2s. Uma delas, conhecida como rede catalítica, compreende os resíduos His48, Asp49, Tyr52 e Tyr99, e a outra, conhecida como loop de ligação de cálcio, compreende os resíduos Tyr28, Gly30 e Gly32. (Ward, De Azevedo Jr. *et al.*, 1998)

As PLA_2s, além da atividade catalítica, apresentam variada ação farmacológica, como neurotoxicidade, miotoxicidade, cardiotoxicidade, atividade hipotensiva, capacidade hemolítica e edematogênica, ação anticoagulante, efeitos na agregação plaquetária (Kini e Evans, 1989; Rosenberg, 1990; Gutiérrez e Lomonte, 1997; Andriao-Escarso, Soares *et al.*, 2000; Braud, Bon *et al.*, 2000; Valentin e Lambeau, 2000; Andriao-Escarso, Soares *et al.*, 2002; Soares, Sestito *et al.*, 2004; Kini, 2005).

Essas toxinas possuem alto grau de homologia sequencial e estrutural (Schaloske e Dennis, 2006), podendo ser divididas em quinze grupos de acordo com a localização de suas pontes de dissulfeto e de seus *loops* (Dennis, 1994). Nessa classificação, os componentes principais dos venenos de serpentes estão entre os grupos I e II, sendo este último predominante em serpentes da família Viperidae, que inclui o gênero *Bothrops*.

1.3 Fosfolipases A_2 e fosfolipases A_2 homólogas

Em 1984, um subgrupo das fosfolipases A_2 do gênero *Bothrops* foi identificado com base na substituição de um ácido aspártico (Asp) por uma lisina (Lys) no resíduo 49, sendo denominadas PLA_2s homólogas ou Lys49-PLA_2s (Maraganore, Merutka *et al.*, 1984; Liu, Yoshizumi *et al.*, 1990; Yoshizumi, Liu *et al.*, 1990; Francis, Gutierrez *et al.*, 1991). Apesar das Asp49-PLA_2s possuir alto grau de homologia com as Lys49-PLA_2s, as toxinas deste último subgrupo diferem das primeiras pela atividade biológica, já que são incapazes de exercer sua principal atividade, a catalítica, contudo apresentam acentuada atividade miotóxica.

Essa diferença de atividade foi primeiramente atribuída à mutação natural Asp49 → Lys (Francis, Gutierrez *et al.*, 1991; Scott, Achari *et al.*, 1992), já que a cadeia lateral da lisina ocuparia exatamente a posição do Ca^{2+}, íon importante para desencadeamento da catálise. No entanto, em 2001, foi sugerido que a reduzida ou inexistente atividade catalítica das Lys49-PLA_2s estaria relacionada à retenção do produto da catálise no sítio ativo e no canal hidrofóbico da proteína, uma vez que o resíduo Lys122 polariza a ligação peptídica entre os resíduos Gly29 e Cys30 (Lee, Da Silva Giotto *et al.*, 2001). Porém, em 2005, outro papel foi atribuído a Lys122, quando Ambrosio *et al.* sugeriram relação entre este resíduo e modificações conformacionais na região C-terminal como tendo importância para a miotoxicidade destas proteínas (Ambrosio, Nonato *et al.*, 2005).

Apesar de haver muito estudo nessa área e de várias estruturas de proteínas de ambos os subgrupos terem sido elucidadas nos últimos anos, poucas conclusões foram obtidas, principalmente que explicassem a acentuada diferença das funções farmacológicas. Uma forma de auxiliar essa compreensão pode ser a elucidação da estrutura das proteínas em estados ativos e inativos, sejam estes estados gerados por modificação química, por complexos com inibidores ou de outras maneiras.

1.4 Fosfolipases A_2 e fosfolipases A_2 homólogas e íons importantes

Atualmente, dentre as toxinas botrópicas, duas Asp49-PLA_2s miotóxicas (BthTX-II e PrTX-III) são bem estudadas (Homsi-Brandeburgo, Queiroz *et al.*, 1988; Mancuso, Correa *et al.*, 1995; Pereira, Novello *et al.*, 1998; Soares, Andriao-Escarso *et al.*, 2001; Rigden, Hwa *et al.*, 2003). Estas proteínas são intrigantes, já que, apesar de serem classificadas como Asp49-PLA_2s, apresentam elevada atividade miotóxica e reduzida atividade catalítica se comparadas as outras proteínas de mesma classe (Homsi-Brandeburgo, Queiroz *et al.*, 1988; Mancuso, Correa *et al.*, 1995; Pereira, Novello *et al.*, 1998; Soares, Andriao-Escarso *et al.*, 2001). Há pouco, observou-se que a conformação oligomérica destas duas proteínas é a mesma encontrada para as Lys49-PLA_2s (Correa, Marchi-Salvador *et al.*, 2008). O recente estudo estrutural comparativo entre as toxinas BthTX-II, PrTX-III e outras Asp49 PLA_2s não miotóxicas mostrou um grande desvio na região de ligação do cálcio nessas duas primeiras estruturas, já que a

Tyr28 está em conformação bastante distorcida quando comparada a proteínas catalíticas não-miotóxicas impossibilitando a ligação de íons Ca^{2+} (Correa, Marchi-Salvador *et al.*, 2008).

As Lys49-PLA_2s ou fosfolipases A_2 homólogas são caracterizadas pela sua notória incapacidade de induzir catálise, contudo estas moléculas apresentam um pronunciado efeito miotóxico tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Gutiérrez e Lomonte, 1997). A atividade miotóxica aparentemente não é dependente da ligação do íon Ca^{2+} ao sítio ativo, ao contrário do verificado no processo normal de catálise de lipídios (Diaz, Gutierrez *et al.*, 1992; Rufini, Cesaroni *et al.*, 1992). Foi proposto, como forma de explicar este fato, que a região C-terminal das Lys49-PLA_2s seria a responsável pelo dano à membrana, já que esta região apresenta uma grande quantidade de resíduos hidrofóbicos e básicos (Lomonte, Moreno *et al.*, 1994; Gutierrez e Lomonte, 1995). Aparentemente, tal região poderia se insinuar através de membranas celulares ou artificiais, promovendo a desestabilização das camadas fosfolipídicas, ou atuaria como "âncora", possibilitando o contato de sítios protéicos reativos desconhecidos com fosfolipídios de membrana (Lomonte, Angulo *et al.*, 2003; Ambrosio, Nonato *et al.*, 2005). Segundo dos Santos e co-autores, estudos estruturais com a PrTX-I (Lys49 - PLA_2) complexada com o inibidor α-tocoferol (vitamina E) sugerem os resíduos Lys20, Lys115, Arg118 como responsáveis pela interação de miotoxinas com a membrana muscular (Dos Santos, Soares *et al.*, 2009).

Estudos estruturais com fosfolipases A_2 complexadas com inibidores podem apontar as regiões de interação entre estas toxinas e os ligantes ou membranas biológicas, revelando, conseqüentemente, o sítio miotóxico e corroborando ou não com a hipótese levantada por dos Santos e colaboradores (Dos Santos, Soares *et al.*, 2009). As potenciais moléculas com propriedade inibitórias podem ser tanto substâncias naturais quanto outras de origem sintética (Soares, Ticli *et al.*, 2005), incluindo os íons. Os íons manganês (Mn^{2+}) também se mostraram promissores na neutralização da atividade miotóxica em estudos recentes (Soares, Oshima-Franco *et al.*, 2002), porém, o mecanismo através do qual esta inibição ocorre, ainda é desconhecido. Portanto, estudos estruturais destas toxinas na presença destes íons também podem nos trazer informações importantes a respeito do mecanismo de ação e de neutralização da atividade miotóxica.

Portanto, a reduzida atividade catalítica pode estar relacionada à alteração na região de ligação com o íon Ca^{2+} no caso das Asp49-PLA_2s miotóxicas assim como a reduzida atividade miotóxica das Lys49-PLA_2s em presença de Mn^{2+} deve ocorrer por alguma alteração na região com o qual este íon interage. Assim ressalta-se a importância dos estudos estruturais com estes íons para a melhor compreensão do mecanismo biológico das PLA_2s, bem como para entender o motivo da variação da capacidade catalítica e miotóxica destas, visto que suas estruturas terciárias são bastante conservadas.

1.5 Proteínas estudadas

1.5.1 A proteína PrTx-I

A PrTX-I é uma Lys49-PLA_2 miotóxica isolada do veneno de *Bothrops pirajai*. Esta proteína contém 121 aminoácidos, pI 8,3 e seu peso molecular é aproximadamente 13kDa (Mancuso, Correa *et al.*, 1995; Toyama, Soares *et al.*, 1998).

Esta enzima foi cristalizada na sua forma nativa e pertence ao grupo espacial $P3_121$, apresentando duas moléculas na unidade assimétrica. Os dados foram coletados a 1,87 Å de resolução (Dos Santos, Soares *et al.*, 2009), essa estrutura se encontra disponível no banco de dados de proteínas (PDB) (código de acesso 2Q2J).

1.5.2 Proteína BthTX-II

A BthTX-II é uma Asp49-PLA_2 miotóxica isolada do veneno de *Bothrops jararacussu*. Esta proteína é composta por 122 aminoácidos e possui peso molecular de aproximadamente 14kDa (Homsi-Brandeburgo, Queiroz *et al.*, 1988; Gutierrez, Nunez *et al.*, 1991; Pereira, Novello *et al.*, 1998). Além da atividade miotóxica, a toxina apresenta efeitos hemolíticos e indução de edema (Homsi-Brandeburgo, Queiroz *et al.*, 1988; Gutierrez, Nunez *et al.*, 1991). Esta enzima foi cristalizada na sua forma nativa, seus dados foram coletados a 2,19Å de resolução, apresentam duas moléculas na

unidade assimétrica e pertencem ao grupo espacial C2 (PDB id: 2OQD) (Correa, Marchi-Salvador *et al.*, 2008).

Apesar da BthTX-II ser uma Asp49-PLA_2, sua estrutura quaternária mostrou-se semelhante à estrutura das Lys49-PLA_2s (Correa, Marchi-Salvador *et al.*, 2008). Vale ressaltar que sua atividade é peculiar, já que apresenta elevada atividade miotóxica e reduzida catalítica quando comparada a outras enzimas da mesma classe.

Os estudos da conformação oligomérica dessa proteína comparada a outras Asp49-PLA_2s demonstram um desvio na região de ligação do Ca^{2+} colocando em questão a real necessidade da presença do cálcio para a atividade catalítica (Correa, Marchi-Salvador *et al.*, 2008).

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as diferenças conformacionais de fosfolipases A_2 miotóxicas (PrTX-I e BthTX-II) ao serem cristalizadas na presença de íons divalentes importantes para suas atividades.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Cristalização da BthTX-II em presença de íons Ca^{2+}.

b) Refinamento de conjunto de dados disponíveis da estrutura da BthTX-II em provável presença de íons Ca^{2+}.

c) Cristalização da PrTX-I em presença de íons Mn^{2+}.

d) Refinamento do complexo formado entre a PrTX-I e íons Mn^{2+}.

e) Comparação dos dados obtidos com os da literatura

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

As etapas esquematizadas e simplificadas para resolução de uma estrutura protéica por difração de raios X de PLA_2s de venenos de serpentes (Drenth, 1994 - adaptado) são mostradas no fluxograma a seguir:

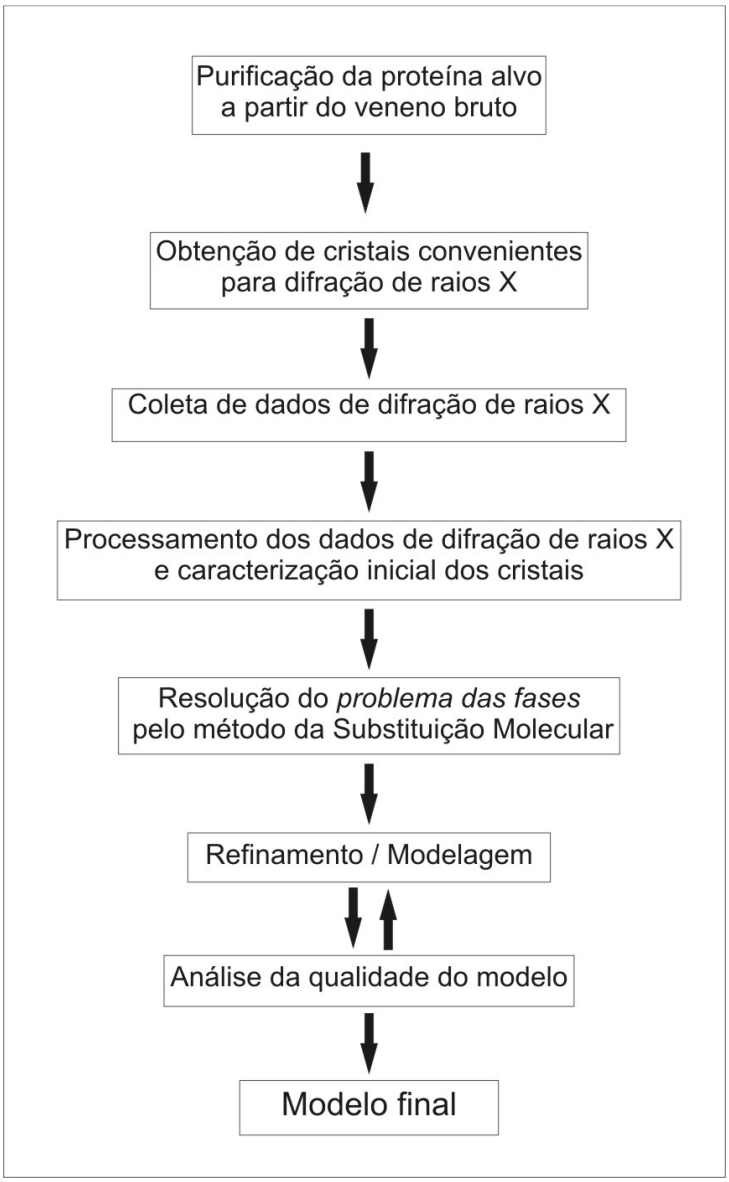


Figura 2. Etapas para resolução de uma estrutura protéica por difração de raios X a partir do veneno bruto.Fonte: adaptação de Drenth (1994).

3.1 Proteínas utilizadas

Foram utilizadas duas PLA_2s miotóxicas: PrTX-I e BthTX-II, extraídas do veneno de *Bothrops pirajai* (De Azevedo, Ward *et al.*, 1998) e *Bothrops jararacussu* (Mancuso, Correa *et al.*, 1995), respectivamente. As amostras foram obtidas a partir do veneno bruto, não sendo, portanto, recombinantes. Ambas as proteínas utilizadas nos experimentos de cristalização em presença de íons, foram fornecidas por nosso colaborador, prof. Dr. Andreimar Martins Soares (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP/Ribeirão Preto), na forma liofilizada.

3.2. Experimentos de cristalização

O princípio da cristalização de uma proteína consiste na elevação da concentração desta até o ponto de supersaturação. Neste ponto, a proteína deixa de ser solúvel e de estar no estado homogêneo, favorecendo agregação de parte das moléculas (estado sólido), podendo assim precipitar ou cristalizar (Asherie, 2004). O processo de cristalização é extremamente difícil, uma vez que é necessário haver alteração da solubilidade ao ponto em que forças externas provoquem o empacotamento ou agrupamento da proteína em uma forma menos energética e mais organizada, a cristalina. Para atingir tal forma, deve-se considerar uma série de fatores, como a concentração da proteína, concentração do agente precipitante, pH, força iônica, velocidade de troca gasosa, entre outros.

O processo utilizado nos experimentos de cristalização foi o *salting-out*, que se fundamenta no fato de, em solução, a alta concentração de um sal diminuir a solubilidade da proteína. Então, a proteína é adicionada a uma solução contendo o agente precipitante e, através do aumento gradativo da concentração do agente precipitante, haverá precipitação ou cristalização da proteína. Caso seja possível estabelecer os parâmetros ideais (temperatura, concentração do agente precipitante, concentração da proteína, tipo de agente precipitante, dentre outros) que propiciem a nucleação da proteína, haverá cristalização da mesma (Mcpherson, 2003).

Um método bastante eficiente para o aumento gradativo da concentração do agente precipitante é aquele baseado na difusão de vapor. Este método consiste em um ambiente fechado que proporciona troca gasosa entre duas soluções com diferentes concentrações.

O sistema utilizado nos experimentos de cristalização foi o *hanging drop* (gota suspensa) (Figura 3). Neste sistema, a gota suspensa é a solução que contém a proteína e o agente precipitante, enquanto a outra solução é a do poço ou do recipiente. Cabe ressaltar que o volume do agente precipitante no recipiente, no caso 0,5 ml, é muito maior que o da lamínula, no caso 1 µl, podendo-se, desta maneira, considerar o volume do recipiente como infinito em relação à gota. A solução do agente precipitante é adicionada no poço e na gota suspensa na mesma concentração, contudo a menor concentração do agente precipitante na gota suspensa deve-se ao fato de haver a adição da proteína, que está a uma concentração de aproximadamente 10mg/ml e diluída em água ultra-pura ou tampão, aumentando o volume e diluindo a concentração de cada um dos componentes do agente precipitante. Portanto, à medida que o sistema entra em equilíbrio, a gota suspensa perde água para a solução do poço, conseqüentemente aumenta gradativamente a concentração da proteína e do agente precipitante, favorecendo, então, a cristalização.

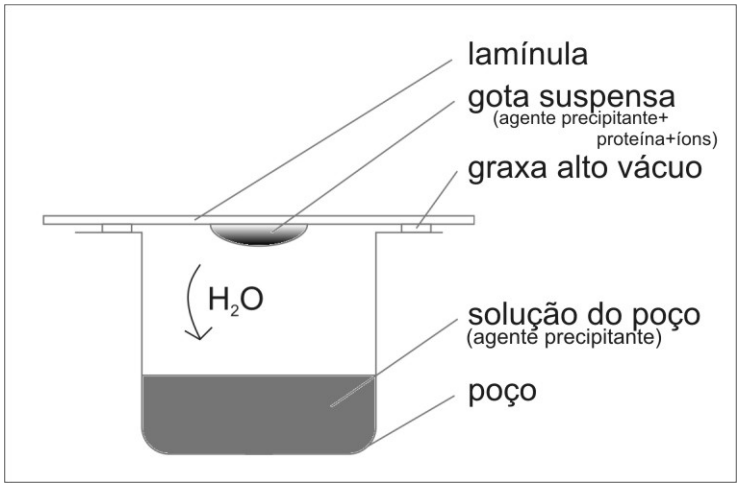


Figura 3. Esquema do *hanging drop* (gota suspensa).

Para que a cristalização de uma proteína ou complexo seja alcançada com sucesso, é necessário definir-se as melhores condições de crescimento dos cristais,

conforme já mencionado. Os cristalógrafos utilizam-se do diagrama de fases e da curva de solubilidade para guiar os experimentos de cristalização bem como otimização dos mesmos (Mikol, Hirsch *et al.*, 1990; Saridakis e Chayen, 2003). Com o diagrama de fases (Gráfico 1), é possível diferenciar três zonas além da insaturada: a de precipitação, onde as concentrações de proteína e agente precipitante são elevadíssimas havendo surgimento de solução amorfa ou repleta de agregados e/ou precipitados; a de nucleação, onde há alta concentração de proteína e de agente precipitante havendo surgimento dos pequenos e microscópicos aglomerados de proteínas, mais conhecidos como núcleos de proteína (Kashchiev, 2001), que são o início da formação do cristal; e a última, a região metaestável, é a que viabiliza que os cristais, desde que já nucleados, cresçam, ou seja, que as moléculas livres de proteína passem a se agrupar ordenadamente no núcleo e no cristal. Cabe lembrar que as diferentes zonas são qualitativas, já que se trata de um processo cinético, restando ao cristalógrafo analisar o estado em que a gota se encontra e se basear nisso para realizar alterações nas condições de cristalização (Mikol, Hirsch *et al.*, 1990; Saridakis e Chayen, 2003).

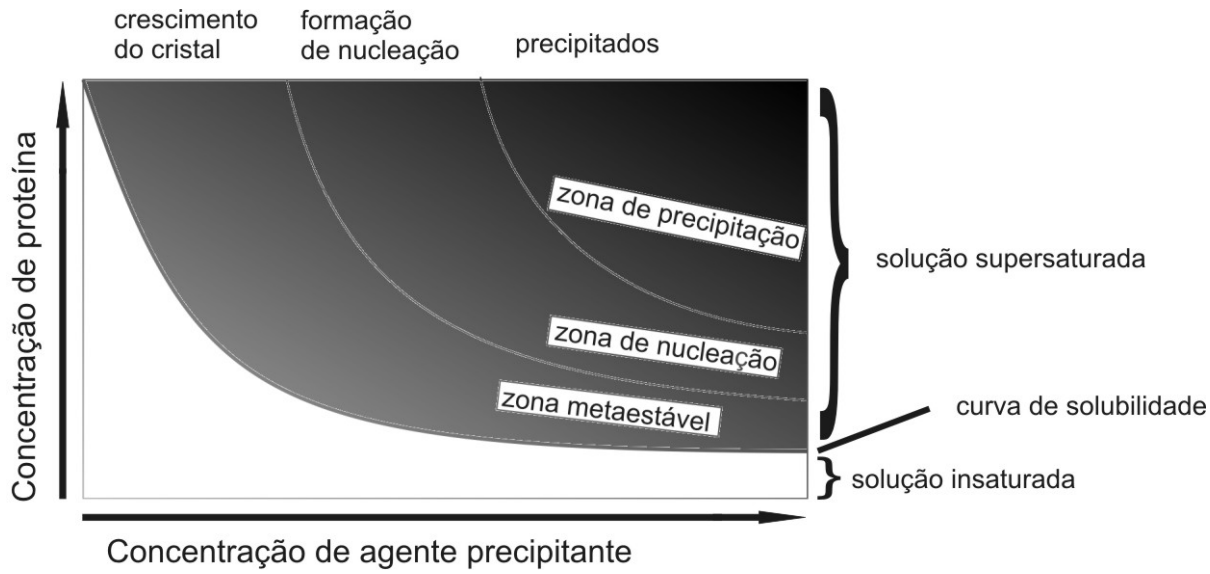


Gráfico 1. Diagrama de fases.

Para obter cristais com boa qualidade para a próxima etapa, a difração de raios X, é necessário que o processo seja lento, viabilizando o crescimento organizado do cristal. A nucleação ocorre a partir de momento em que as forças presentes na solução supersaturada ultrapassam a barreira enérgica para formação dos núcleos, ou seja, a energia livre da proteína diminui à medida que há aumento das interações favoráveis, favorecendo a interação entre as moléculas protéicas em solução. A presença de impurezas pode prejudicar o processo de cristalização, porque a nucleação pode ocorrer sobre essas partículas, provocando crescimento desorganizado.

A próxima etapa é, então, o crescimento do cristal. Esse processo ocorre através da incorporação de mais moléculas de proteínas no núcleo ou minúsculo cristal. A morfologia do cristal depende da velocidade do crescimento do mesmo, que é proporcional à supersaturação da solução, sendo que cristais maiores são resultados de crescimento mais lento. O crescimento do cristal pode diminuir ou parar à medida que a concentração protéica diminui, já que a mesma está sendo incorporada no cristal, uma vez que a solução entraria na fase solúvel do diagrama de fases. Outra razão para tal interrupção pode ser o acúmulo de defeitos nas faces do cristal.

Para ocorrer cristalização de forma lenta e organizada, há uma série de fatores e parâmetros que necessitam ser ajustados, pois estes influenciam no diagrama de fases. Tais fatores são estabelecidos através da combinação da concentração da proteína, da temperatura do ambiente e das características do solvente, que são: a concentração, o pH, a força iônica, o tipo de tampão e a presença de aditivos, como polietilenoglicol (PEG) e óleo. Para estabelecer tais parâmetros, pode-se utilizar o método da matriz esparsa [49] ou alguma variação desta metodologia, que consiste em utilizar várias condições de cristalização previamente estabelecidas abrangendo diferentes combinações de sais, precipitantes e pHs em menos de uma centena de soluções. Algumas empresas oferecem kits de cristalização com diversas soluções prontas, sendo estas formuladas com base em pesquisas das condições de experimentos de cristalização bem sucedidos. Após a utilização do método de matriz esparsa, é possível realizar a otimização da condição em que foram obtidos cristais através da variação de alguns parâmetros desta solução. Dessa forma é possível estabelecer os parâmetros corretos para viabilizar o surgimento e crescimento de cristais cuja forma e tamanho sejam adequados à difração de raios X.

3.3 Coleta de dados de difração de raios X

A coleta de dados de difração de raios X é a única forma pela qual podemos obter uma estrutura cristalográfica. Os dados são provenientes da difração provocada pela incidência do feixe de raios X sobre o cristal e podem ser obtidos através da utilização de uma fonte de raios X convencional, com um ânodo rotatório, ou raios X de um síncrotron (como o existente no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas - SP).

Para realizar a coleta dos dados nestes equipamentos, o cristal de proteína imerso na solução da gota suspensa é colocado em um *loop* com diâmetro adequado ao tamanho do cristal. O *loop* montado é alinhado ao feixe de raios X de tal maneira que, durante os movimentos oscilatórios que o mesmo sofrerá, o cristal fique exposto à radiação de maneira homogênea. Em alguns casos, é necessário adicionar crioprotetor (como, por exemplo, o glicerol) para evitar formação de cristais de gelo ou danos irreversíveis no cristal em estudo, fatores que prejudicarão ou inviabilizarão a coleta de dados. O cristal é, então, exposto ao feixe de raios X e também a um fluxo de nitrogênio gasoso, à temperatura controlada (normalmente 100 K). O uso do nitrogênio gasoso permite um aumento no tempo de coleta dos dados, pois promove aumento no tempo útil do cristal comparado com coletas sem o congelamento do cristal (cristal montado em capilar). Para que seja possível a obtenção de um bom conjunto de dados, os cristais devem apresentar um tamanho que pode variar entre 0,1 e 1,0 mm.

A coleta de dados é realizada por placas de imagens reutilizáveis com leitura a laser ligadas a uma estação gráfica. A placa de imagens é constituída por material semicondutor e a leitura ocorre com a excitação dos elétrons desse material provocado pela incidência dos fótons difratados, sendo assim, armazenado a localização dos fótons. A leitura ocorre quando o material semicondutor é levado a um estado intermediário de energia, produzindo luminescência proporcional ao número de fótons de raios X incidentes na placa; em seguida, estas informações vão para uma fotomultiplicadora, que mede o número de fótons fluorescentes emitidos. Esses dados são transmitidos a uma estação gráfica na qual as imagens de difração de raios X podem ser visualizadas (através da intensidade das difrações). As intensidades com seus respectivos desvios-padrão são os únicos dados disponíveis para a determinação da estrutura tridimensional.

Inicialmente, pode-se determinar a partir deste conjunto de dados informações como grupo espacial, parâmetros de rede do cristal, número de monômeros da proteína na unidade assimétrica e previsão da porcentagem de solvente no cristal. O processamento dos dados obtidos é feito utilizando-se o programa HKL2000 (Otwinowski e Minor, 1997), que é largamente utilizado pela comunidade cristalográfica.

3.4 Elucidação de estruturas tridimensionais

Após coleta e processamento do conjunto de dados, é necessário resolver o problema das fases. Para isso, pode-se utilizar o método indireto ou os diretos. Estes últimos são mais custosos, já que necessitam usar um metal pesado como guia de posições de átomos específicos da molécula em estudo. Dentre eles, há o MIR (*Multiple isomorphous replacement*) e o MAD (*Multiwavelength anomalous diffraction*), sendo que a diferença entre eles é a de que este último consiste na coleta de dados com diferentes comprimentos de ondas de acordo com o λ (comprimento de onda) em que há maior absorção de energia por um determinado metal pesado, facilitando a localização dos metais. Já o método indireto é compreendido pela substituição molecular, que consiste em utilizar as fases de uma proteína com alta homologia e com estrutura já resolvida, sendo portanto mais simples e rápida. A determinação de uma estrutura protéica pelo método de Substituição Molecular pode ser realizada utilizando o programa AMoRe – *Automated Package for Molecular Replacement* (Navaza, 1994). Porém, uma restrição para o uso deste método consiste na necessidade de uma alta homologia seqüencial entre a proteína em estudo e a proteína que servirá de modelo, cuja estrutura deve ser conhecida. O procedimento baseia-se no fato de proteínas com seqüência semelhante de aminoácidos possuírem enovelamentos similares (Mcree, 1993; Drenth, 1994)

Após o processamento dos dados provenientes da coleta de dados de difração de raios X, é gerado um mapa de densidade eletrônica e inicia-se o refinamento da estrutura. O modelo gerado pela substituição molecular é, então, refinado até a máxima concordância entre dados experimentais e a estereoquímica da molécula, o que pode ser feito utilizando-se os programas CCP4 e o CNS (ciclos de refinamento de posição dos

átomos e do fator de temperatura) (Brunger, 1992; Brunger, Adams *et al.*, 1998). Durante as etapas de refinamento, ajustes manuais do modelo à densidade eletrônica são também realizados, sendo comumente utilizados os programas gráficos "O" (Jones, Bergdoll *et al.*, 1990) e o recente Coot (Emsley e Cowtan, 2004).

3.5 Análise e comparação das estruturas cristalográficas

A comparação das estruturas cristalográficas da BthTX-II nativa (Correa, Marchi-Salvador *et al.*, 2008) e a mesma em presença de íons de cálcio foi realizada usando o programa "O" e o Coot (Jones, Bergdoll *et al.*, 1990; Emsley e Cowtan, 2004). Nas comparações da BthTX-II/Ca^{2+} e demais Asp49 e Lys49-PLA_2s com estrutura cristalográfica depositada no banco de dados de proteínas (PDB) foram consideradas apenas as coordenadas dos C^{α}. As análises das interfaces de contato e das estruturas quaternárias do modelo cristalográfico foram realizadas usando a ferramenta online PISA (Krissinel e Henrick, 2007) disponível no "European Bioinformatics Institute Server" (http://www.ebi.ac.uk). Todas as figuras foram confeccionadas no programa Pymol (Delano, 2002).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudos estruturais com a PrTX-I em presença de Mn^{2+}

4.1.1 Cristais de PrTX-I/Mn^{2+}

Os cristais obtidos da PrTX-I na presença de íons manganês foram obtidos através do métodos de *salting-out* (Figura 4). Para garantir a presença dos íons de manganês no cristal, foi adiconado à solução da gota suspensa cloreto de manganês numa proporção de cinco Mn^{2+} para cada molécula de proteína. A proteína em estudo foi diluída em água ultra-pura à concentração de 12 mg/ml. Os cristais foram obtidos na mesma condição de cristalização que possibilitou a cristalização da proteína nativa (Dos Santos, Soares *et al.*, 2009). Os novos cristais (Figura 4) foram submetidos à difração de raios X no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS) na linha MX-II, no entanto os resultados do processamento preliminar dos dados provenientes destes cristais não foram utilizados, já a resolução obtida foi inferior a 1,9 Å, dados estes obtidos pela doutoranda Juliana Izabel dos Santos em cristais semelhantes.

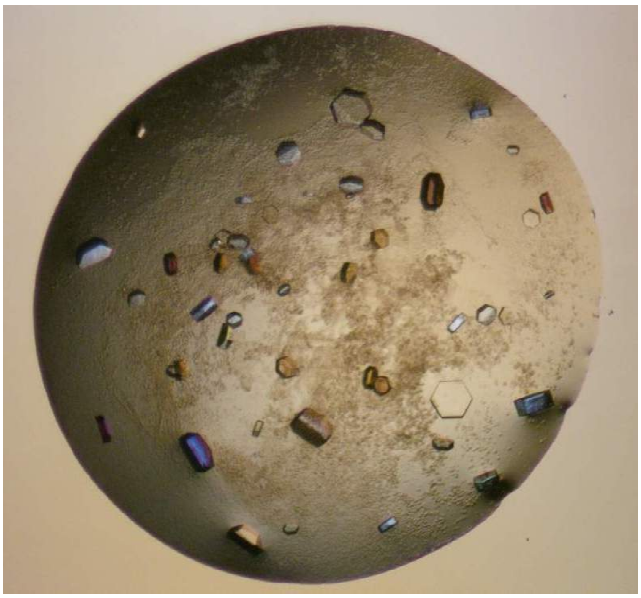


Figura 4. Cristais de PrTX-I em presença de manganês obtidos no mês de setembro de 2008.

4.1.2 Estudos estruturais PrTX-I em presença de cloreto de manganês

A doutoranda Juliana Izabel dos Santos obteve dois bons conjuntos de dados da PrTX-I/Mn^{2+}, um deles à resolução de 2,1 Å e outro à 1,9 Å. A diferença entre estes dois conjuntos de dados coletados está nas diferentes proporções de Mn^{2+} na solução de cristalização, sendo que o conjunto de dados de maior resolução apresentava menor proporção de íons para cada molécula de toxina. Assim, optou-se por trabalhar com os dois conjuntos de dados. Os dados foram processados com o programa HKL2000 (Otwinowski e Minor, 1997) e a substituição molecular foi feita com o programa AMoRe (Navaza, 1994), utilizando-se as coordenadas da PrTX-I na forma nativa (PDB id: 2Q2J) (Dos Santos, Soares *et al.*, 2009) como modelo. O refinamento foi realizado auxílio dos programas REFMAC (Murshudov, Vagin *et al.*, 1997) e CNS (Brunger, 1992) e para a modelagem, os programas Coot (Emsley e Cowtan, 2004) e o "O" (Jones, Bergdoll *et al.*, 1990).

O refinamento dos dados obtido a 2,1 Å foram iniciados com estatísticas R=0.2474 e R_{free}=0.32018. Após uma sucessão de ciclos de refinamento, adição de moléculas de água e modelagem manual, sendo esta mais cuidadosa para a região do C-terminal do monômero B que se apresentou mais instável que as demais regiões, o modelo foi melhorado, convergindo para as estatísticas de R=0.2217 e R_{free}=0.2672. A verificação deste modelo através do programa PROCHECK (Laskowski, Macarthur *et al.*, 1993) nesta etapa ofereceu segurança de que o mesmo apresentava boa qualidade estereoquímica.

Após esse refinamento, foi feita uma busca por outros solventes e/ou ligantes em densidades eletrônicas não preenchidas. Foram encontrados três regiões (Figura 5) e os possíveis candidatos para preencher essas regiões eram os íons cloro, manganês, lítio e a própria água, conforme indicava a condição de cristalização. Para analisar a possibilidade de qual dos compostos estava presente naquela densidade foram realizado individualmente ciclos de minimização de energia, de fator temperatura e refinamento da ocupação dos íons candidatos. Os resultados indicaram que tanto o manganês como a água e o cloro se adaptaram bem àquelas regiões

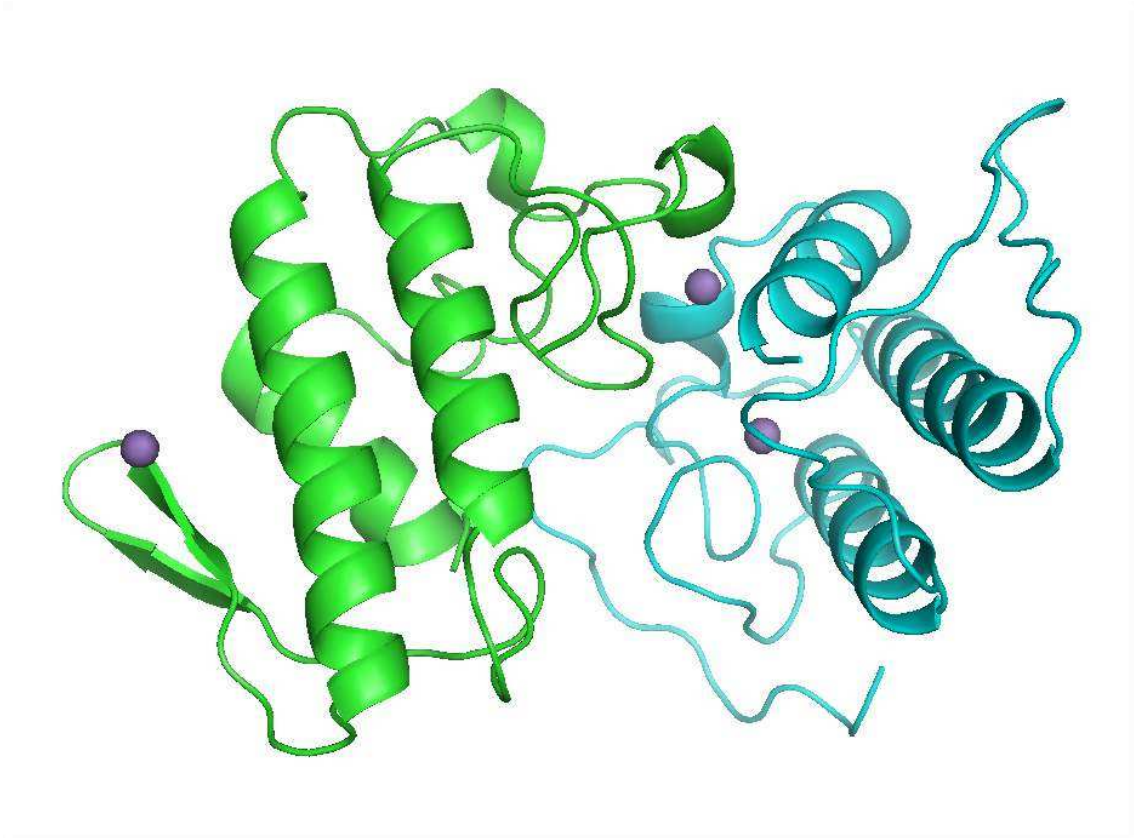


Figura 5. Modelo preliminar da PrTX-I (2,1Å) em *cartoon*, com 3 regiões candidatas ao manganês (em roxo).

Diante desses resultados, concluímos que seria melhor iniciar o refinamento com outro conjunto de dados disponível em nosso laboratório com dados a mais alta resolução (1.9Å) para melhor visualização dos detalhes da interação entre os íons e a proteína (Tabela 1).

A partir deste momento, o programa Coot (Emsley e Cowtan, 2004) foi utilizado para modelagem. Algumas mutações foram realizadas a fim de aproximar o modelo utilizado à sequência primária da PrTX-I e de preencher as densidades eletrônicas vazias pelas cadeias laterais dos respectivos aminoácidos. Após ciclos de refinamento do programa REFMAC (Murshudov, Vagin *et al.*, 1997), foi realizado, uma busca por ligantes e águas. Foram encontradas regiões onde as densidades eletrônicas eram compatíveis com as de íons sulfato e Tris; no entanto o fator temperatura do sulfato ficou incoerente ao fator temperatura médio apresentado pela proteína e a ocupação foi baixa, portanto este foi retirado. Além destes, foram

encontradas dez regiões de densidades eletrônicas maiores em tamanho quando comparadas a densidades de moléculas de água (Figura 6). Utilizando a mesma metodologia empregada no modelo anterior de resolução inferior para verificação da possibilidade da presença do manganês nessas regiões, foram refinados o manganês, lítio, cloro e a água nessas regiões.

Tabela 1. Estatísticas de coleta de dados de difração de raios-X da PrTX-I em resolução de 1,9Å.

Cela unitária (Å)	a=b=56,8 c=130,4
Grupo Espacial	$P3_121$
Resolução (Å)	40-1,9 (1,97-1,90)[a]
Reflexões únicas	16872 (1647)[a]
% de dados coletados	92,3 (91,8)[a]
R_{merge}[b] (%)	10,1 (56,7)[a]
I/σ (I)	13,8 (2,3)[a]

[a] Números em parênteses são para a faixa de mais alta resolução. [b] $R_{merge} = \Sigma_{hkl}(\Sigma_i(|I_{hkl,i}-\langle I_{hkl}\rangle|))/\Sigma_{hkl,i}\langle I_{hkl}\rangle$, onde $I_{hkl,i}$ é a intensidade de uma medida individual de uma reflexão com índices de Miller h, k e l, e $\langle I_{hkl}\rangle$ é a intensidade média daquela reflexão. Calculado para $I > -3\sigma$ (I).

Os resultados obtidos foram semelhantes ao anterior, já que os dados de fator temperatura e ocupação do manganês, da água e cloro estão muito próximos. Na tentativa de esclarecer mais essa dúvida, foi feita uma revisão bibliográfica de estruturas contendo íons de manganês. Conforme Goyal e co-autores, tais íons apresentam geralmente 5 ou 6 pontes de hidrogênio sendo a maioria provenientes de átomos da água ou do ácido glutâmico e histidina, contudo pode ser observado desde 1 a 8 interações, e além disso, essa distância pode variar entre 2.38 e 2.90 Å (Goyal e Mande, 2008).

Após ciclos de refinamento e adição de moléculas de água no CCP4, modelagem e checagem manual de águas no Coot (Emsley e Cowtan, 2004), o modelo da proteína foi concluído com as estatísticas R=0.1971 R_{free}=0.2304.

A verificação do modelo foi feita com o programa PROCHECK (Laskowski, Macarthur *et al.*, 1993) (Gráfico 2). Apenas um aminoácido encontra-se na região razoavelmente permitida e nenhum na não permitida, o que indica alta confiabilidade da modelo.

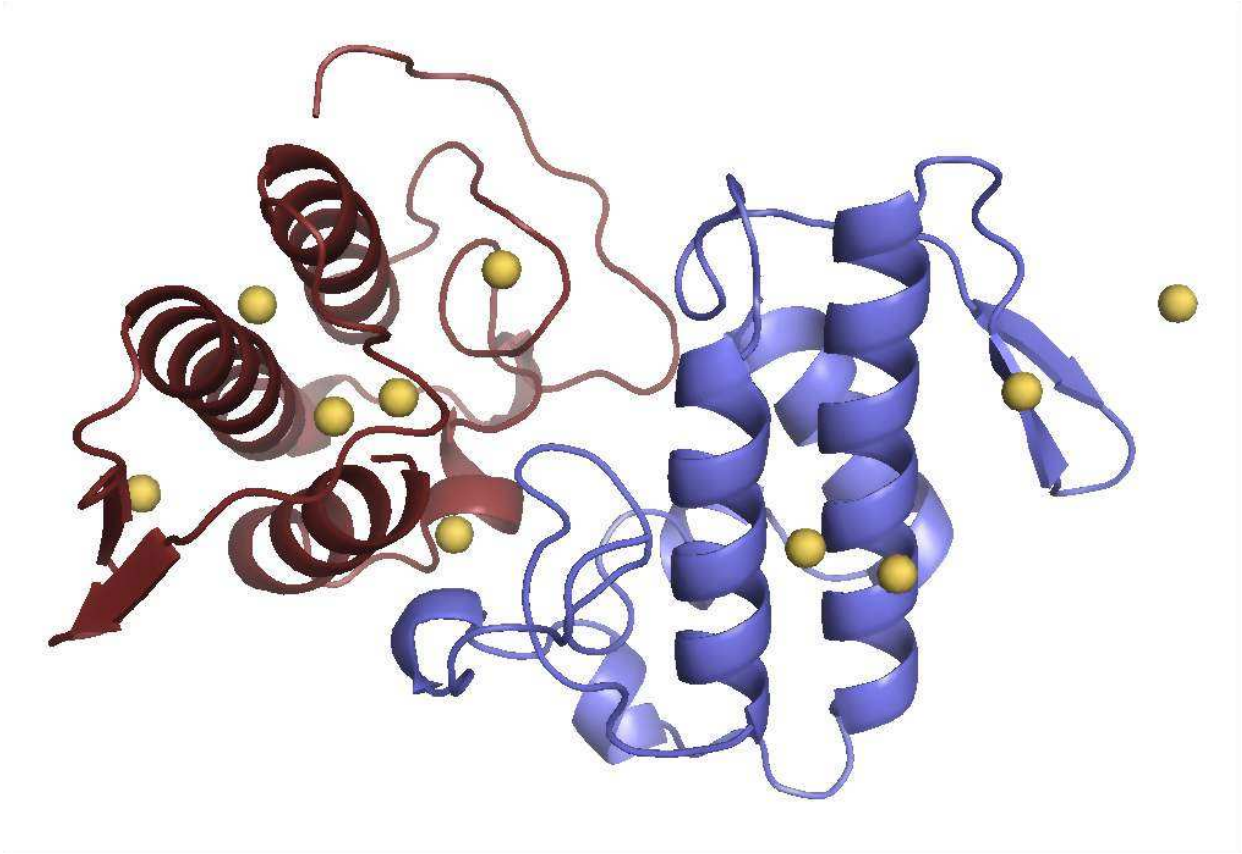
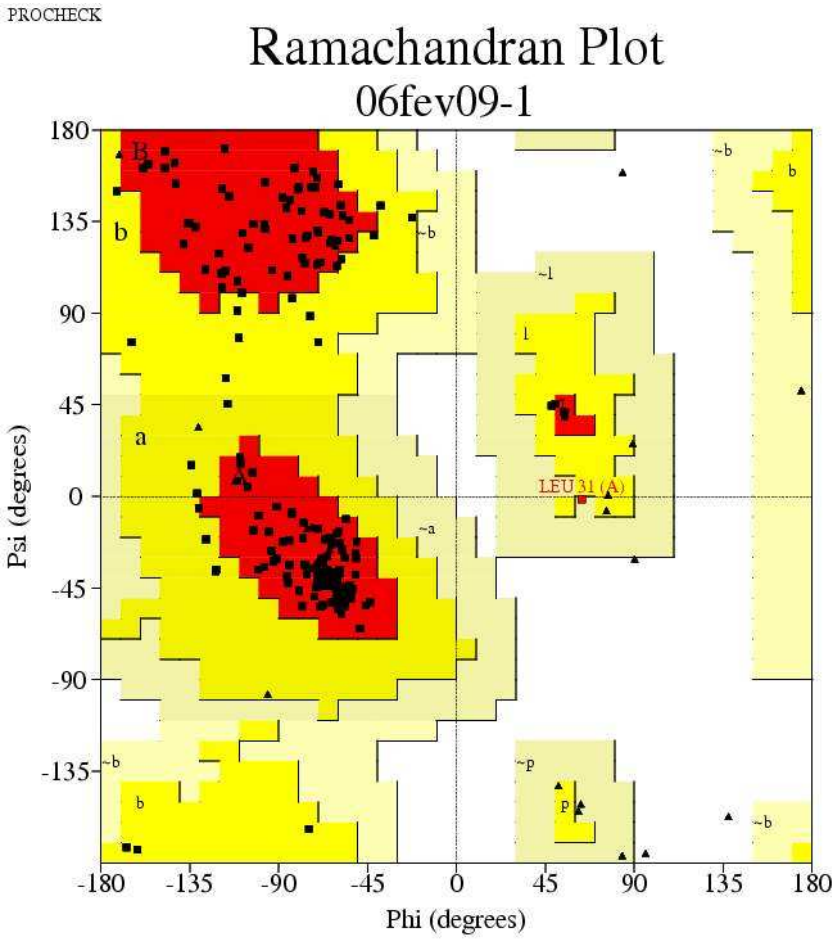


Figura 6. Modelo preliminar da PrTX-I (1,9Å) em *cartoon*, com 10 regiões candidatas aos íons (em amarelo).

Para comprovar a presença de íons manganês em cada uma dessas regiões, foi realizado nova coleta explorando o espalhamento anômalo deste íon na linha MX-2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). Foram feitas três coletas com diferentes comprimentos de onda próximos da absorção deste íon. Neste caso, o sensor de fluorescência foi colocado na cabana, calculado os três comprimentos de onda correspondentes ao manganês através do programa “Blue Ice” e realizado as três coletas diferentes; cabe ressaltar que houve auxílio da equipe técnica do LNLS.



. Gráfico 2. Gráfico Ramachandran da PrTX-I/Mn^{2+}.

4.1.3 Estudos estruturais da PrTX-I em presença de sulfato de manganês

Em conjunto com o refinamento dessa estrutura e análise dos íons, novos experimentos de cristalização foram realizados para obter dados à mais alta resolução. Além de repetir os experimentos anteriores, houve a troca do $MnCl_2$ pelo $MnSO_4$ com o intuito de retirar o cloro da condição de cristalização, já que este íon também poderia ocupar a região candidatas ao manganês. Novos cristais (Figura 7) foram obtidos e submetidos a experimentos de difração de raios X na linha MX-2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). Após processamento dos dados, esses cristais difrataram a uma resolução de 1,54 Å e um grupo espacial diferente dos anteriores, $P2_1$ (Tabela 2).

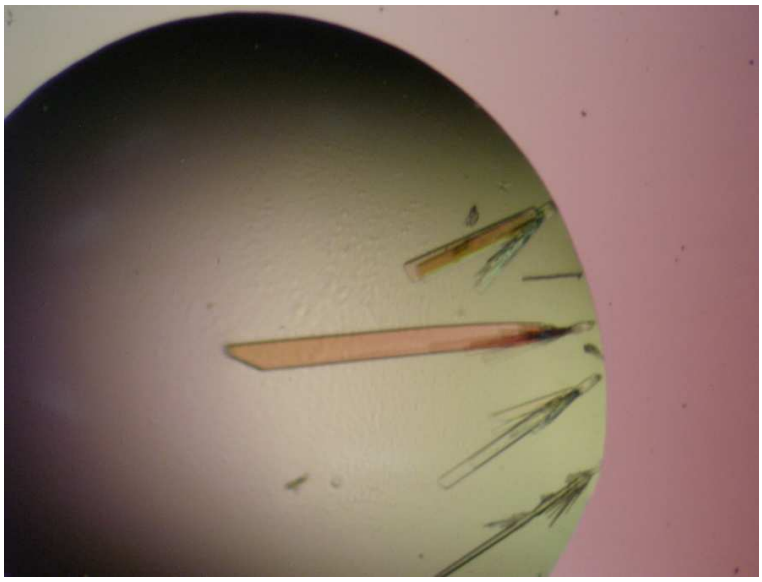


Figura 7. Cristais de PrTX-I em presença de sulfato de manganês obtidos no mês de março de 2009.

Tabela 2. Estatísticas de coleta de dados de difração de raios-X da PrTX-I em resolução de 1,54Å

Cela unitária (Å)	a=39,5 b=72,2 c=44,9
Grupo Espacial	$P2_1$
Resolução (Å)	40-1,54 (1,60-1,54)[a]
Reflexões únicas	34200 (3403)[a]
% de dados coletados	93,7 (93,6)[a]
R_{merge}[b] (%)	5,9 (44,3)[a]
I/σ (I)	26,39 (1,97)[a]
Redundância média	2,7 (2,5)[a]

[a] Números em parênteses são para a faixa de mais alta resolução. [b] $R_{merge} = \Sigma_{hkl}(\Sigma_i(|I_{hkl,i}-\langle I_{hkl}\rangle|))/\Sigma_{hkl,i}\langle I_{hkl}\rangle$, onde $I_{hkl,i}$ é a intensidade de uma medida individual de uma reflexão com índices de Miller h, k e l, e $\langle I_{hkl}\rangle$ é a intensidade média daquela reflexão. Calculado para $I > -3\sigma$ (I).

A substituição molecular foi realizada através do programa AMoRe (Navaza, 1994) com o modelo da PrTX-I complexada com vitamina E (PDB id: 3CYL) (Dos Santos, Soares *et al.*, 2009) que apresenta mesmo grupo espacial que esse conjunto de dados.

Esses dados foram refinados com o REFMAC (Murshudov, Vagin *et al.*, 1997) e para modelagem o Coot (Emsley e Cowtan, 2004). O processo de refinamento se iniciou com um R=0,2932 R_{free}=0,3154, ou seja, dados já com boas estatísticas. Após alguns ciclos de refinamento, foi realizada uma busca por ligantes e adicionado PEG4000 (polietilenoglicol 4000), íons de sulfato e moléculas de água.

Atualmente, a estrutura encontra-se com R=0,1905 e Rfree=0,2505. Em breve, realizaremos estudos comparativos com especial atenção para as regiões anteriormente descritas como possíveis candidatas aos íons manganês (seção 4.1.2). Os dados a melhor resolução (1,54 Å) certamente auxiliarão nas próximas etapas e os de MAD coletados também serão processados e servirão para confirmação das regiões candidatas.

Além disso, há a intenção de realizar um estudo comparativo entre essas três estruturas que têm grupos espaciais diferentes ($P3_121$ e $P2_1$), com o intuito de entender o motivo do empacotamento diferente na cristalização e analisar possíveis diferenças conformacionais entre os modelos cristalográficos.

4.2 Estudos estruturais de BthTX-II em presença de íons Ca^{2+}

4.2.1 Processamento de conjunto de dados da estrutura da BthTX-II em presença de íons Ca^{2+}

O processamento de um conjunto de dados obtido na linha MX-1 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) da BthTX-II/Ca^{2+} e disponível no laboratório foram retomados. Houve grande dificuldade no processamento dos mesmos, tanto na etapa de indexar os pontos das imagens como ao estabelecer o seu grupo espacial e ao obter boas estatísticas. Os programas utilizados para tal fim foram MOSFLM e Scala, ambos do pacote de programas do CCP4 (Potterton, Briggs *et al.*, 2003), e HKL2000 (Otwinowski e Minor, 1997). Uma possível explicação para tal problemática é a alta mosaicidade dos dados (Figura 8), o que dificulta a indexação dos pontos em algumas imagens e processamento dos mesmos. Após inúmeras tentativas,

foi possível processar as imagens disponíveis através do programa HKL2000 (Otwinowski e Minor, 1997) (Tabela 3).

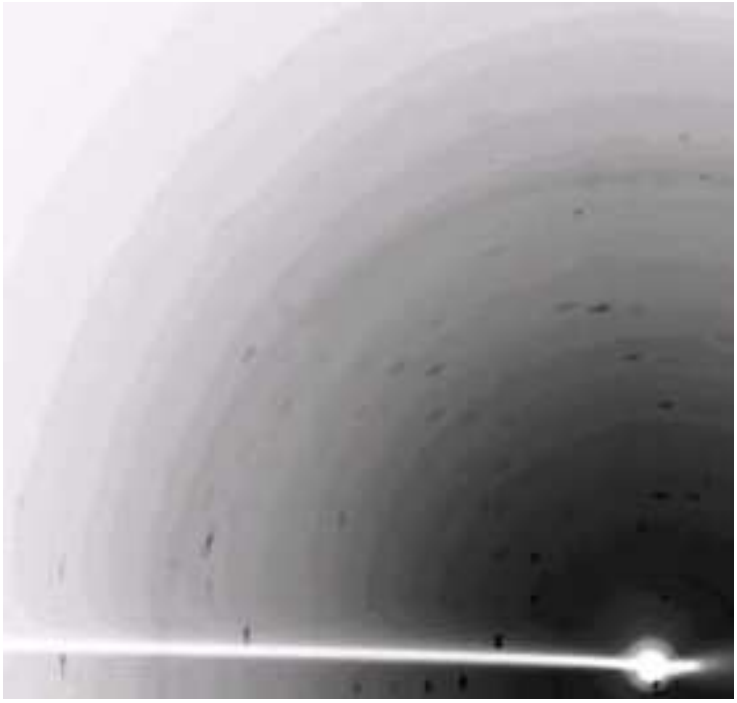


Figura 8. Padrão de difração de raios X de BthTX-II (região com pontos de difração apresentando alta mosaicidade).

Para resolver o problema das fases, a substituição molecular foi realizada através da proteína BthTX-II nativa (PDB id: 2OQD) através do programa AMoRe (Navaza, 1994). Esses dados foram refinados com REFMAC (Murshudov, Vagin *et al.*, 1997) e CNS (Brunger, 1992) e para modelagem foram utilizados os programas Coot (Emsley e Cowtan, 2004) e "O" (Jones, Bergdoll *et al.*, 1990).

As estatísticas iniciais foram R=0,30 R_{free}=0,32. Com o CNS, após realizar ciclos de minimização, foi obtido retrocesso nas estatísticas para R=0,34 e R_{free}=0,36. No "Coot" (Emsley e Cowtan, 2004), foram testados a adição de água, mutações de aminoácidos contendo cadeia lateral sem densidade eletrônica, modelagem minuciosa de aminoácidos com ângulos desfavoráveis no gráfico de Ramachadran, entre outros. No REFMAC (Murshudov, Vagin *et al.*, 1997), os parâmetros foram alterados várias vezes com a tentativa de se conseguir melhores estatísticas. No entanto, após diversos

ciclos e diferentes tentativas, as estatísticas não melhoraram (R=0,21 e R_{free}=0,38). Diante da disparidade entre esses dois valores e do alto valor de R_{free}, a seleção aleatória dos 5% das reflexões poderia ser o motivo dessa discordância, uma vez que essa porcentagem é utilizada para o cálculo do R_{free}. Então, foram separadas 10% das reflexões e realizados novos ciclos de refinamento, que propiciou queda parcial do R_{free} e posterior estabilidade em 0,31. Portanto, é possível concluir que a qualidade ruim dos dados impossibilitou a conclusão do refinamento.

Tabela 3. Estatísticas de coleta de dados de difração de raios-X da BthTX-II em resolução de 2,65Å

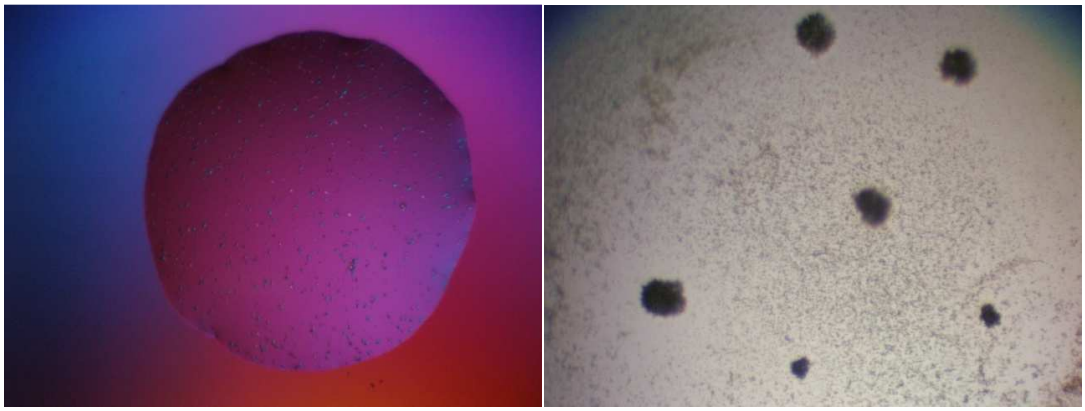
Cela unitária (Å)	a=58,6 b=97,8 c=46,5
Grupo Espacial	C2
Resolução (Å)	40-2,65 (2,74-2,65)[a]
Reflexões únicas	5491 (532)[a]
% de dados coletados	87,3 (83,8)[a]
R_{merge} [b] (%)	10,4 (24,6)[a]
I/σ (I)	11,53 (2,34)[a]
Redundância média	2,6 (2,5) [a]

[a] Números em parênteses são para a faixa de mais alta resolução. [b] $R_{merge} = \Sigma_{hkl}(\Sigma_i(|I_{hkl,i}-\langle I_{hkl}\rangle|))/\Sigma_{hkl,i}\langle I_{hkl}\rangle$, onde $I_{hkl,i}$ é a intensidade de uma medida individual de uma reflexão com índices de Miller h, k e l, e $\langle I_{hkl}\rangle$ é a intensidade média daquela reflexão. Calculado para $I > -3\sigma(I)$.

4.2.2 Obtenção de novos cristais da BthTX-II com íons Ca^{2+} e processamento de novos dados

Diante da dificuldade na otimização dos cristais de BthTX-II em presença de íons Ca^{2+}, foram iniciados novos experimentos de cristalização com kit I de 50 soluções prontas da *Hampton Research*.

Após 2 semanas, houve a formação de cristais em dois poços (Figura 9), no entanto com tamanho insuficiente para os experimentos de difração de raios X.



Fígura 9: Cristais obtidos com o kit de 50 soluções da empresa *Hampton Research.*

Não foi possível melhorar significativamente os cristais da BthTX-II com cálcio, no entanto foi possível repetir as condições obtidas anteriormente e obter cristais semelhantes (Correa, Marchi-Salvador *et al.*, 2008). A proteína foi diluída em água ultra-pura à concentração de 12mg/ml e os Ca^{2+} foram adicionados na gota suspensa em uma proporção de 30 íons de cálcio para cada molécula de proteína. Desta vez foi possível coletar os dados da difração de raios X desses novos cristais na linha MX-2 (linha com maior energia que a MX-1). O HKL2000 (Otwinowski e Minor, 1997) foi utilizado para o processamento dos dados (Tabela 4) e as estatísticas geradas foram melhores que as apresentadas pelo outro cristal (Seção 4.2.1). A utilização de um novo cristal bem como a coleta em uma linha de maior energia podem ter sido as razões da melhora dos dados.

Tabela 4. Estatísticas de coleta de novos dados de difração de raios-X da BthTX-II em resolução de 2,05Å.

Cela unitária (Å)	a=59,2 b=100,9 c=47,2
Grupo Espacial	C2
Resolução (Å)	50,44-2,08 (2,15-2,05)[a]
Reflexões únicas	14060 (1377)[a]
% de dados coletados	97,9 (98,5)[a]
R_{merge} [b] (%)	9,0 (62,5)[a]
I/σ (I)	23,14 (2,03)[a]
Redundância média	3,6 (3,3) [a]

[a] Números em parênteses são para a faixa de mais alta resolução. [b] $R_{merge} = \Sigma_{hkl}(\Sigma_i(|I_{hkl,i}-\langle I_{hkl}\rangle|))/\Sigma_{hkl,i}\langle I_{hkl}\rangle$, onde $I_{hkl,i}$ é a intensidade de uma medida individual de uma reflexão com índices de Miller h, k e l, e $\langle I_{hkl}\rangle$ é a intensidade média daquela reflexão. Calculado para $I > -3\sigma$ (I).

4.2.3 Estudo estrutural da BthTX-II/Ca^{2+}

A substituição molecular foi feita da mesma maneira que a abordada na seção 4.2.1 e demonstrou possuir duas possíveis configurações diméricas na cela unitária, como já descrito por Côrrea e colaboradores (Correa, Marchi-Salvador *et al.*, 2008). A configuração dimérica adotada foi a mesma usada para a forma apo da BthTX-II (Correa, Marchi-Salvador *et al.*, 2008). Então, foi realizado um ciclo de refinamento de corpo-rígido no programa REFMAC (Murshudov, Vagin *et al.*, 1997) e as estatísticas já apresentaram bons resultados R=0,25227 R_{free}=0,32643, uma vez que a mesma proteína (BthTX-II nativa, PDB id: 2OQD) foi utilizada na substituição molecular.

O próximo passo foi realizar a modelagem molecular através do programa "Coot". No modelo inicial, os aminoácidos já se apresentavam bem localizados na densidade eletrônica, com exceção de algumas cadeias laterais de poucos aminoácidos. A ausência da densidade eletrônica em algumas regiões possivelmente foi provocada

pela alta vibração desses átomos bem como por possíveis irregularidades no cristal e variações na posição das cadeias laterais das moléculas de proteína no cristal. Em vista disso, as cadeias laterais dos seguintes resíduos foram excluídas: Arg43, Lys54, Lys69, Glu78, Ile82, Glu86, Lys114, Lys115, Asp122, Lys128 e Lys132 do monômero A, e Arg111 e Lys115 do monômero B. Portanto é possível predizer maior estabilidade deste último monômero, já que houve apenas dois resíduos cujas cadeias laterais foram excluídas, sendo ambos da região do C terminal. Cabe ressaltar que a região do C terminal normalmente apresenta maior fator temperatura quando comparado ao geral da proteína, portanto estes são aceitáveis.

No processo de adição de moléculas de água, foram encontradas 10 regiões com densidades eletrônicas maiores do que as correspondentes a moléculas de água fortemente ligadas. Então os íons Ca^{2+} e Na^{+} foram adicionados nessa região, já que esses íons estão presentes na condição de cristalização e apresentam maior número de elétrons do que a molécula de água, portanto maior densidade eletrônica.

A inclusão do Ca^{2+} foi minuciosamente analisada e refinada. Para que os mesmo fossem considerados parte do modelo cristalográfico, os seguintes pré-requisitos foram utilizados: I) valor de ocupação maior do que 0,7 após refinamento (CNS program (Brunger, 1992)); II) corte do mapa de densidade eletrônica (relação sinal ruído, i.e., I/sigma) maior do que 3; III) parâmetros de coordenação de acordo com as restrições e regras do cálcio. Tais parâmetros são a natureza da interação com átomos ao redor do cálcio (geralmente interação com oxigênio dos resíduos ou das águas), distância não maior que 3 Å e preferência por interação com ácido aspártico, ácido glutâmico e asparagina (Goyal e Mande, 2008).

Com o recurso “Find ligands” foi encontrada outra região suspeita de conter ligantes, sendo que a mesma estava sendo ocupada por três moléculas de águas anteriormente adicionadas pelo próprio programa “Coot”. Avaliando a densidade eletrônica, utilizamos o citrato e o isopropanol para preencher tal região, ambos encontrados na condição de cristalização. No entanto, o fator temperatura dos ligantes estava com valores muito altos se comparados ao da proteína. Já as moléculas de água apresentaram fator temperatura com valor coerente, portanto houve manutenção das águas.

O refinamento foi concluído com as estatísticas finais de R=22,65% e R_{free}=27,12%. O modelo foi submetido ao PROCHECK (Laskowski, Macarthur *et al.*, 1993) (Gráfico 3) e não apresentou nenhum resíduo na região generosamente permitida ou na não permitida. Além disso, o modelo apresentou melhor qualidade estequiométrica do que o esperado pelas estruturas com essa mesma resolução (Overall G-factor) (Laskowski, Macarthur *et al.*, 1993).

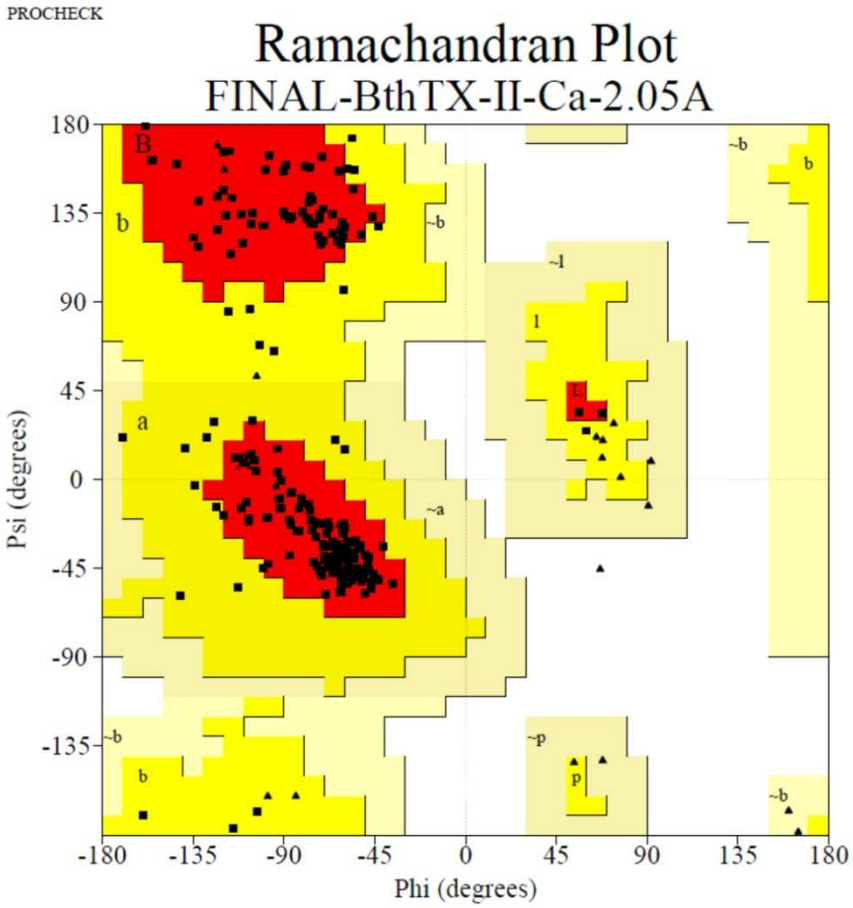


Gráfico 3. Gráfico Ramachandran do modelo final da BthTX-II/Ca^{2+}.

4.2.4 Análise do modelo da BthTX-II/Ca^{2+}

A configuração dimérica da proteína BthTX-II em presença de íons cálcio assemelha-se ao chamado “dímero convencional” adotado pelas Lys49-PLA_2s (Figura 10) (Arni e Ward, 1996; Correa, Marchi-Salvador *et al.*, 2008; Dos Santos, Fernandes *et al.*, 2009)

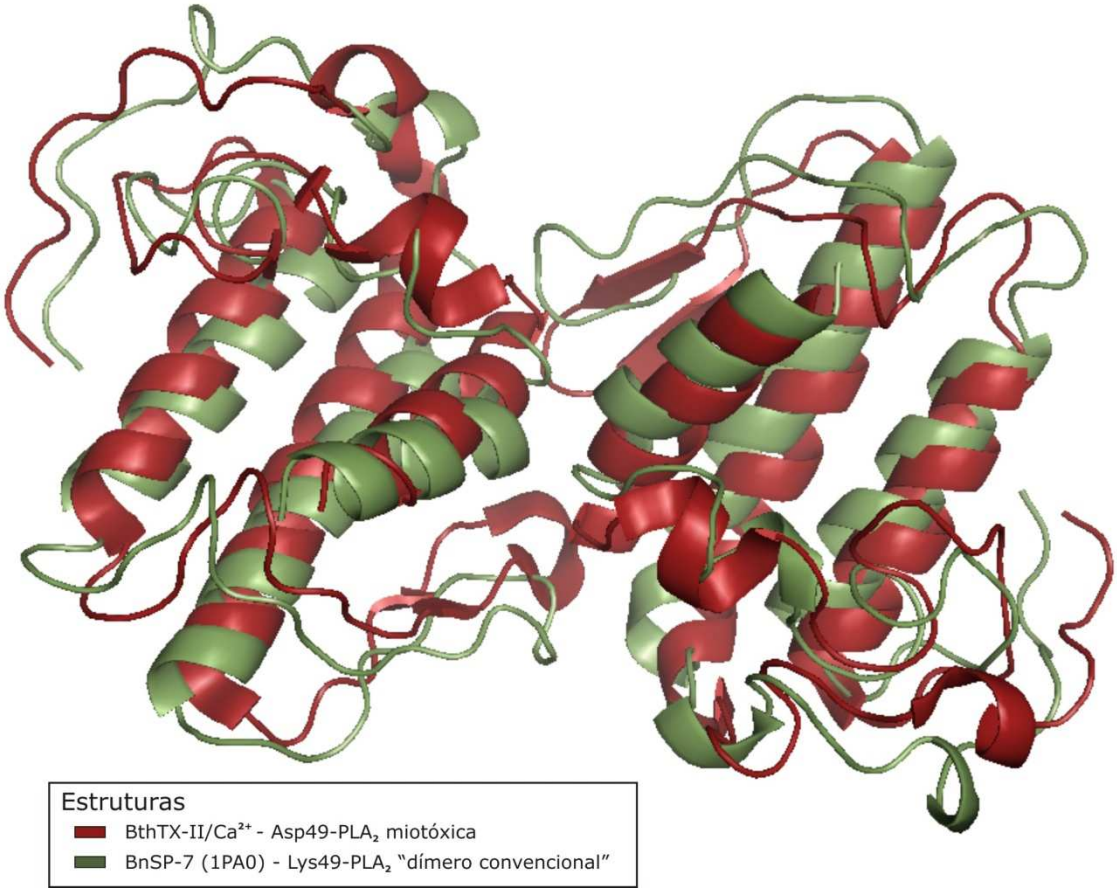


Figura 10. Semelhança em *cartoon* da estrutura quaternária da BthTX-II (Asp49-PLA_2 miotóxica) e o "dímero convencional" de uma Lys49-PLA_2, BnSP-7.

Os monômeros da estrutura da BthTX-II/Ca^{2+} conservaram características estruturais importantes das Asp49-PLA_2s, como as 7 pontes dissulfeto e os aminoácidos do sítio catalítico His48, Tyr52, Tyr73 e Asp99 e os envolvidos na coordenação do cálcio (Dennis, 1994; Schaloske e Dennis, 2006). Apesar dessa manutenção de características, íons de cálcio foram encontrados em três regiões diferentes (Figura 11), sendo duas delas correspondentes. Somente interações com distâncias inferiores a 3Å foram consideradas, valor acima do proposto por Goyal e co-autores (Goyal e Mande, 2008).

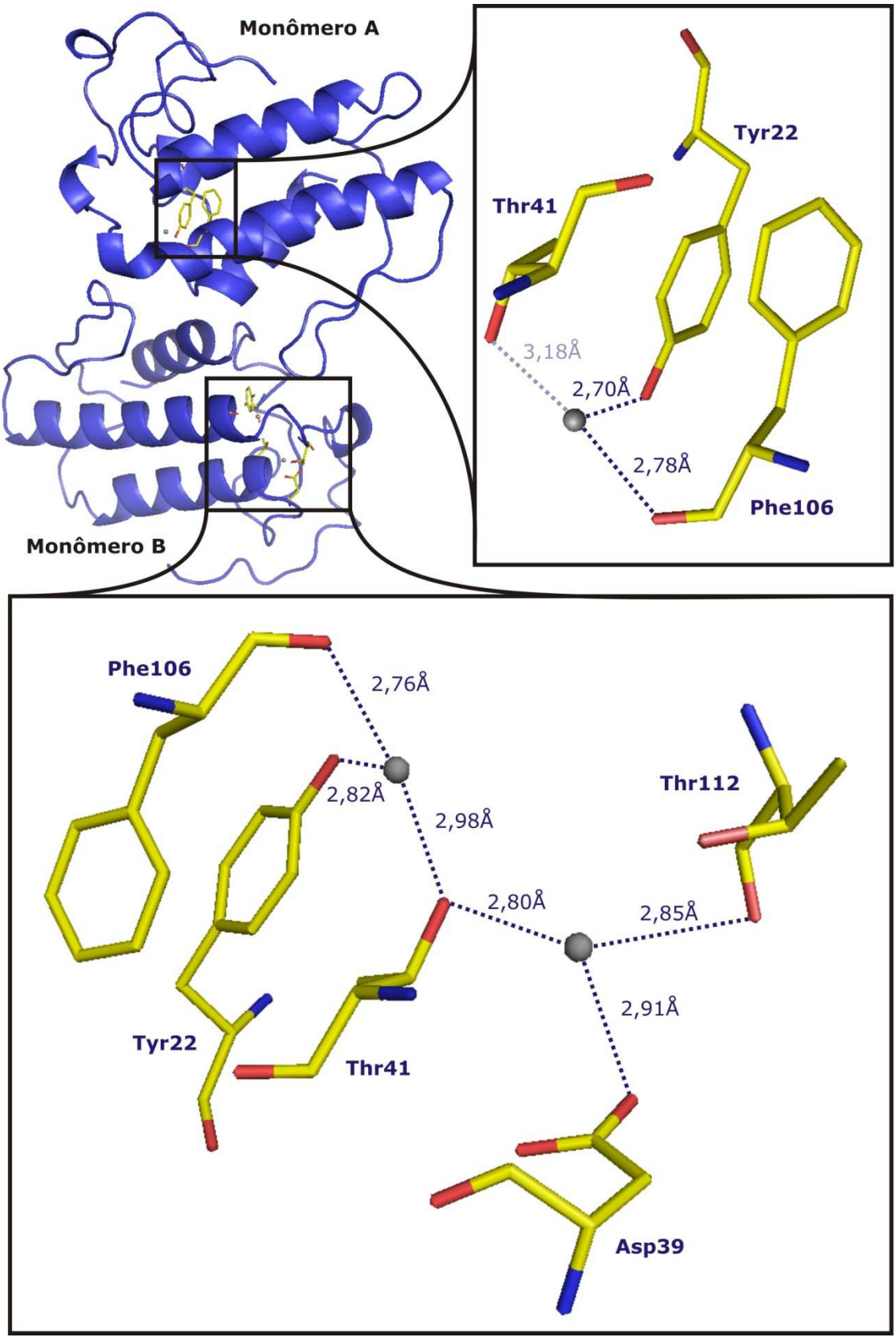


Figura11. BthTX-II/Ca^{2+} em *cartoon*. Em ampliação, interação dos íons cálcio com átomos dos resíduos da proteína e suas respectivas distâncias. .

4.2.5 Comparação da BthTX-II/Ca^{2+}e demais proteínas

A sobreposição dos C^{α} das estruturas da BthTX-II nativa e da com cálcio, ambas diméricas, resultou em um desvio (r.m.s.d.) de 0,381Å e 0,825Å para os monômeros A e B, respectivamente (Tabela 5), sendo que o maior desvio foi observado na região correspondente aos resíduos 77 a 81 do monômero B. Foi realizada a sobreposição dessas duas estruturas e confirmado a distorção na região que houve maior valor de desvio (Figura 12).

Tabela 5. Valores de r.m.s.d. em Å para sobreposição de Cα de monômeros da BthTX-II/Ca^{2+} e da BthTX-II

	BthTX-II Monômero A	BthTX-II Monômero B	BthTX-II/Ca^{2+} Monômero B
BthTX-II/Ca^{2+} Monômero A	0,381	0,825	0,796
BthTX-II/Ca^{2+} Monômero B	0,831	0,557	-
BthTX-II Monômero B	0,735	-	0,557

Foi realizada análise minuciosa nessa região para compreender o motivo da distorção (Figura 13). Com base na distância observada entre o íon cálcio e os oxigênios das cadeias principais do ácido glutâmico 78 do monômero B de ambas as estruturas, é improvável que a distorção ressaltada tenha sido ocasionada pela presença deste íon em região adjacente (Figura 12). Foi perceptível que o Glu78/B, resíduo com maior distorção, não apresenta cadeia lateral na proteína nativa e que a região correspondente a esta cadeia na BthTX-II/Ca^{2+} está ocupado por uma rede de águas, sendo uma dessas moléculas interage com o oxigênio da Lys115/A. Por outro lado, este resíduo na BthTX-II/Ca^{2+} encontra-se sem cadeia lateral e a cadeia lateral preservada do Glu78/B interage apenas com uma molécula de água (Figura 13). Diante dessas observações, é possível inferir que a presença da cadeia lateral estável do Glu78/B provoca vibração da Lys115/A e vice-versa, sendo então responsável pela distorção observada.

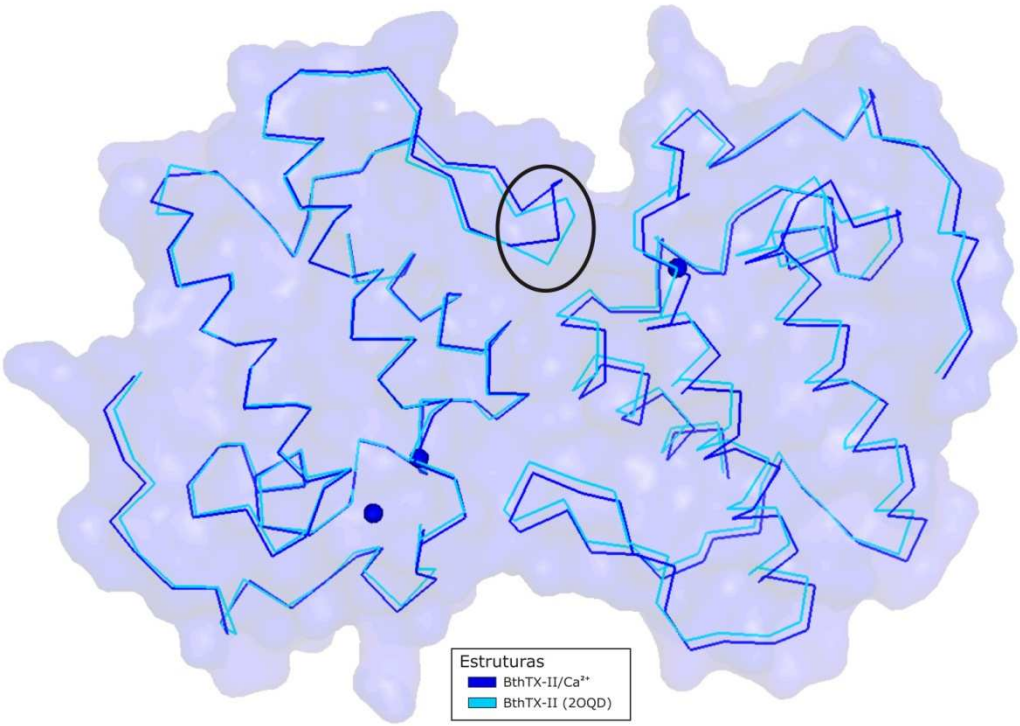


Figura 12. Sobreposição de C^{α} da BthTX-II nativa e com cálcio. Em destaque, região com maior r.m.s.d.

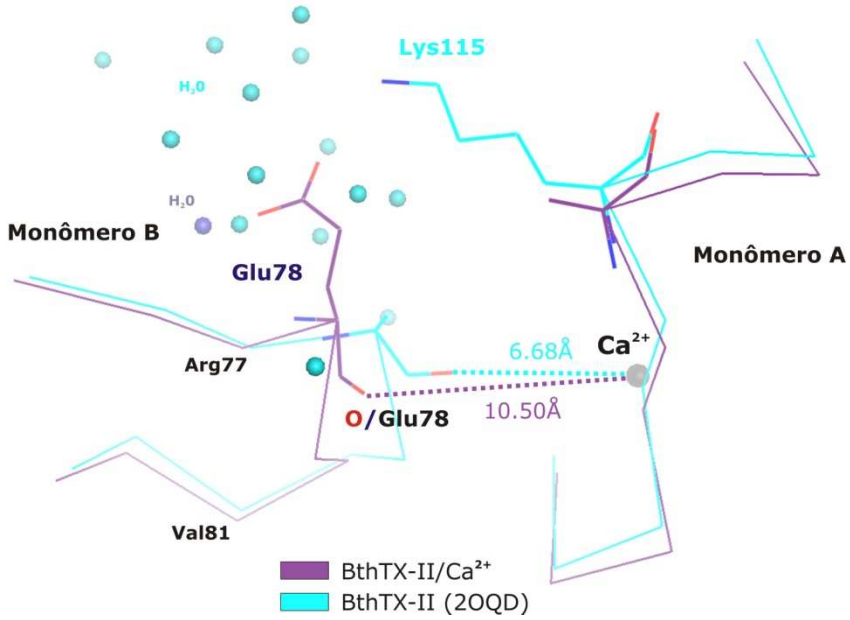


Figura 13. Presença e/ou ausência de cadeia lateral dos resíduos Glu78/B e Lys115/A nas formas complexada (em roxo) e apo (2OQD) (em ciano) da proteína BthTX-II. As esferas (em ciano e em roxo) representam moléculas de água presentes em ambas as formas. Em linhas pontilhadas são apresentadas as distâncias entre o íon cálcio presente na BthTX-II/Ca^{2+} e o átomo O/Glu78/B de ambas as formas.

O sítio de coordenação do cálcio permaneceu semelhante na presença do íon, o que indica, conforme sugerido por Côrrea e co-autores, que a conformação distorcida de alguns resíduos inviabiliza a coordenação do cálcio na região onde este deveria estar presente para que a Asp49-PLA_2 desempenhasse sua função catalítica (Correa, Marchi-Salvador *et al.*, 2008).

A comparação da proteína nativa e na presença de cálcio ressalta algumas diferenças conformacionais. As cadeias laterais de alguns resíduos estão direcionadas para diferentes posições e outras foram excluídas, além da região compreendida pelos resíduos 77 a 81 descrita anteriormente. Uma outra possível explicação para a distorção é a existência de densidade eletrônica ruim nessa região, já que nenhuma alteração conformacional induzida pela presença de íons cálcio foi observada.

Segundo dos Santos e colaboradores, após realizar alinhamento de PLA_2s da família Viperidae, os resíduos envolvidos na rede catalítica são conservados tanto nas Asp e Lys49-PLA_2s, como pode ser observado na manutenção da Gly30 da região de coordenação do cálcio, no entanto, a Tyr28 é exclusiva de Asp-PLA_2s e a Gly32 altamente conservada nestas (Dos Santos, Fernandes *et al.*, 2009; Dos Santos, Soares *et al.*, 2009). Em vista disso, era de se esperar certa homogeneidade na atividade das fosfolipases A_2.

Visto que nenhuma conclusão foi obtida somente pela análise de seqüências primárias de PLA_2s, partimos para análise da estrutura terciária e quaternária destas. Análise tridimensional minuciosa do loop de ligação do cálcio demonstrou que o resíduo triptofano na posição 31 de Asp49-PLA_2s miotóxicas (BthTX-II e PrTX-III) encontra-se distorcido quando comparado ao de outras Asp49-PLA_2s (Correa, Marchi-Salvador *et al.*, 2008) (Figura 14). Correa e co-autores (Correa, Marchi-Salvador *et al.*, 2008) propuseram que o desvio observado era devido à presença do Trp31 da seqüência primária. Porém, a análise de seqüências de Asp49-PLA_2s depositadas no banco de dados NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) e cujas estruturas cristalográficas encontram-se disponíveis no banco de dados PDB mostrou que há Asp49-PLA2s não miotóxicas, como as proteínas DacuTX de *Deinagkistrodon acutus* (PDB id: 1IJL) (Gu, Zhang *et al.*, 2002) e a AhalTX de *Agkistrodon halys* (PDB id: 1PSJ) (Wang, Yang *et al.*, 1996), que também apresentam o resíduo Trp31, e cujos *loops* de coordenação de

cálcio não se apresentam distorcidos (Figura 14). Além disso, observou-se que, embora estas duas toxinas apresentassem Trp31, tal fato não impedia a coordenação de íons cálcio (Figura 14).

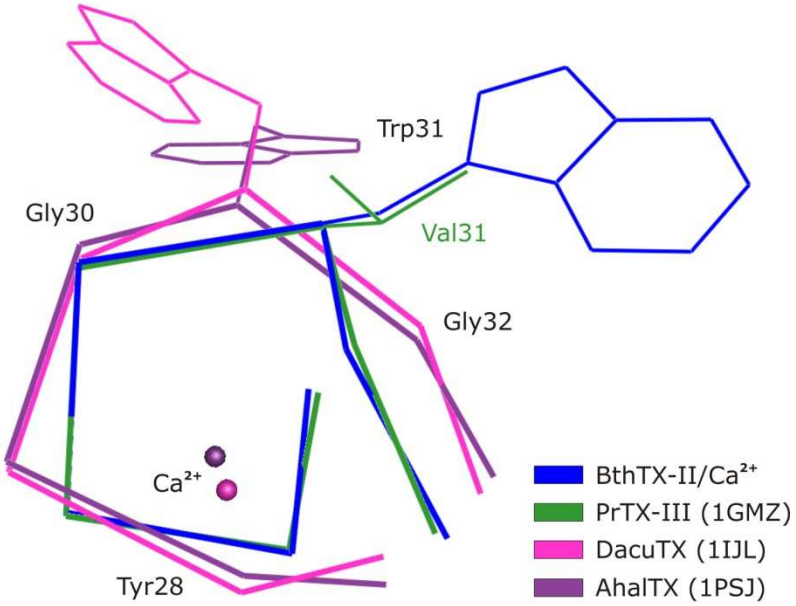


Figura 14. Resíduos responsáveis pela coordenação do cálcio na catálise em C^{α} de quatro Asp49-PLA_2s, sendo BthTX-II/Ca^{2+} e PrTX-III, miotóxicas e DacuTX de *Deinagkistrodon acutus* e a AhalTX de *Agkistrodon halys*, clássicas com o cálcio coordenado.

A submissão das estruturas de BthTX-II, PrTX-III e DacuTX no PISA (Tabela 6) indicam que a possível causa para tal distorção pode estar relacionado com a conformação oligomérica adotada pelas PLA_2s miotóxicas, já que as mesmas apresentam diferentes estruturas quaternárias como possível dímero biológico para as toxinas em estudo.

A literatura mostra que a miotoxicidade de Lys49-PLA_2s, toxinas da mesma subfamília das Asp49-PLA_2s miotóxicas descritas anteriormente, é dada por resíduos da região C-terminal (Chioato, De Oliveira *et al.*, 2002; Chioato, Aragao *et al.*, 2007; Cintra-Francischinelli, Pizzo *et al.*, 2009). Dos Santos et al., 2009 mostraram que o provável dímero biológico das Lys49-PLA2s também apresenta seus C-terminais orientados lado a lado (Dos Santos, Soares *et al.*, 2009). Assim, é possível concluir que a oligomerização das PLA_2s miotóxicas conferiu vantagem para a manutenção da

atividade miotóxica, visto que estas geralmente são diméricas e apresentam seus C-terminais orientados lado a lado. Ainda, a distorção do *loop* de cálcio em Asp49-PLA_2s miotóxicas parece ser importante para a manutenção da oligomerização destas, visto que o mesmo se encontra na interface da proteína (Figura 15), favorecendo a atividade miotóxica em detrimento da atividade catalítica. O fato de essa região estar distorcida e localizada na interface da proteína pode explicar também a não coordenação do cálcio observada na estrutura da BthTX-II/Ca^{2+}, sugerindo um mecanismo alternativo da catálise de menor intensidade das Asp49-PLA_2s miotóxicas (Homsi-Brandeburgo, Queiroz *et al.*, 1988; Pereira, Novello *et al.*, 1998; Soares, Andriao-Escarso *et al.*, 2001) ou sugerindo mesmo a inexistência dessa atividade. Esta última hipótese pode ser levantada caso a baixa atividade catalítica observada nos estudos acima abordados tenham sido decorrentes de contaminação da proteína testada com Asp49-PLA_2s clássicas, uma vez que a purificação dessas proteínas encontradas nos venenos de serpentes é bastante difícil e necessita de vários passos (Schaloske e Dennis, 2006).

Tabela 6. Análise de área de interface e energia livre de solvatação das Asp49 miotóxicas e uma Asp49-PLA_2 complexada com cálcio, DacuTX de *Deinagkistrodon acutus*.

Proteínas/Dímero	Operação de simetria	Aréa interface ($Å^2$)	$\Delta^i G$ (kcal/mol)
BthTX-II/Ca^{2+}			
Dímero cristalográfico	(x, y, z)	419,3	-1,3
Dímero biológico	(-x, y, -z)	632,5	-14,5
PrTX-III (1GMZ)			
Dímero cristalográfico	(x, y, z)	522,3	0,3
Dímero biológico	(-x+2,y,-z+2)	639,9	-10,4
DacuTX (1IJL)			
Dímero biológico e cristalográfico	(x, y, z)	992,7	-15,6

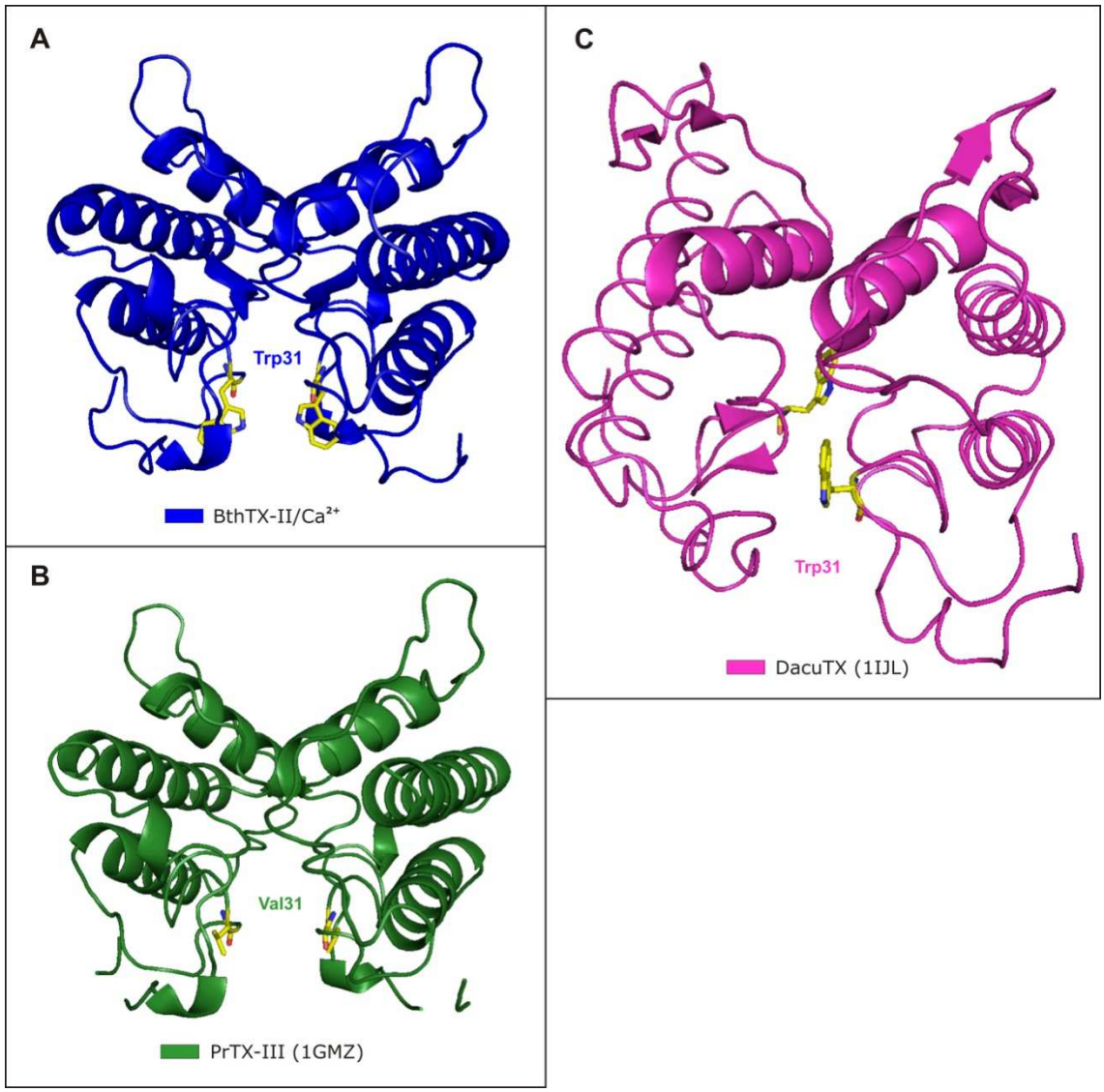


Figura 15. Em *cartoon*, dímero biológico da BthTX-II/Ca^{2+}, da PrTX-III e da DacuTX (Asp49-PLA_2 ácida de *Deinagkistrodon acutus*) e em *lines* o resíduo da posição 31.

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Os venenos das serpentes da família Viperidae são conhecidos por apresentar vasta atividade farmacológica, sendo as fosfolipases A_2, os seus principais constituintes. Apesar dessas toxinas serem objetivo de muitos estudos, ainda há controvérsias quanto as atividades farmacológicas das Asp49-PLA_2s miotóxicas (BthTX-II e PrTX-III), uma vez que consistem numa exceção em comparação as demais Asp49-PLA_2s, que apresentam alta atividade catalítica. É ainda carente o número de proteínas Asp49 miotóxicas conhecidas e cujas estruturas nativas ou complexadas foram elucidadas, sendo a BthTX-II/Ca^{2+} de grande contribuição para compreensão da baixa ou inexistente atividade catalítica.

Foi possível concluir que a BthTX-II cristalizada em presença dos íons cálcio não apresentou este íon no sítio de coordenação do cálcio (*loop* de cálcio), ao contrário do observado nas PLA_2s clássicas. Não foram perceptíveis diferenças substanciais entre as estruturas cristalográficas da apo e BthTX-II/Ca^{2+}, sendo que apenas uma região demonstrou-se distorcida e sem relação aparente com os resíduos responsáveis pela atividade catalítica. A oligomerização apresentada a partir da submissão ao PISA foi diferente da cristalográfica, havendo naquela exposição de resíduos do *loop* de cálcio de forma diferente das demais Asp49-PLA_2s, o que pode ser o motivo da baixa atividade catalítica. A estrutura da PrTX-I em presença de íons manganês conta com 10 regiões candidatas a possuir tais íons que deverão ser confirmadas por outros experimentos. Possivelmente essas regiões são importantes para a atividade miotóxica, incluindo a região do C-terminal. Assim, a conclusão deste estudo pode contribuir para a compreensão do mecanismo ação das Lys49-PLA_2s.

Diante das dúvidas e hipóteses levantadas, algumas perspectivas podem ser traçadas para que mais informações sejam geradas com o objetivo de esclarecê-las e auxiliar a compreenção do mecanismo de ação da miotoxicidade e das diferenças entre as PLA_2s, uma vez que são toxinas semelhantes e apresentam atividades diferentes.

- A co-cristalização da BthTX-II com inibidores pode apresentar as diferenças conformacionais responsáveis pela redução de sua atividade.

- A co-cristalização da BthTX-II com composto que provoque mudança no grupo espacial e na sua oligomerização, podendo se aproximar ao dímero biológico apontado pelo programa PISA e podendo gerar novos dados para comparação com a forma nativa.
- *Virtual screening* e *Docking* de possíveis ligantes nas regiões apontadas pela presença dos íons de cálcio na BthTX-II e dos íons de manganês na PrTX-I, podendo assim gerar informações sobre moléculas com potencial farmacológico.
- Dinâmicas moleculares do dímero encontrado na BthTX-II/Ca^{2+} e do dímero sugerido pelo programa PISA, comparação dos resultados gerados e inferência do dímero mais adequado.

As serpentes, animais temidos e surpreendes, podem contribuir ainda mais para a compreensão de fenômenos farmacológicos. Embora seja necessário produzir mais informação para chegar a conclusões efetivas sobre o mecanismo de ação das PLA_2s, grandes avanços já foram alcançados. As novas perspectivas descritas bem como novos experimentos realizados por outros grupos apresentam grande potencial para compreenção do mecanismo de ação de fosfolipases e podem oferecer informações úteis para elaboração de novos fármacos envolvidos com os processos farmacológicos dessas proteínas e com os males provocados pelos acidentes ofídicos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Ambrosio, A. L. B., M. C. Nonato, *et al.* A molecular mechanism for Lys(49)-phospholipase A(2) activity based on ligand-induced conformational change. Journal of Biological Chemistry, v.280, n.8, p.7326-7335. 2005.

Andriao-Escarso, S. H., A. M. Soares, *et al.* Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A(2) from Bothrops jararacussu snake venom. Biochem Pharmacol, v.64, n.4, Aug 15, p.723-32. 2002.

Andriao-Escarso, S. H. *et al*. Myotoxic phospholipases A(2) in bothrops snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from Bothrops jararacussu. Biochimie, v.82, n.8, Aug, p.755-63. 2000.

Arni, R. K. e R. J. Ward. Phospholipase A(2) - A structural review. Toxicon, v.34, n.8, p.827-841. 1996.

Asherie, N. Protein crystallization and phase diagrams. Methods, v.34, n.3, Nov, p.266-72. 2004.

Austin, S. C. e C. D. Funk. Insight into prostaglandin, leukotriene, and other eicosanoid functions using mice with targeted gene disruptions. Prostaglandins Other Lipid Mediat, v.58, n.5-6, Nov, p.231-52. 1999.

Balsinde, J., M. A. Balboa, *et al.* Regulation and inhibition of phospholipase A2. Annu Rev Pharmacol Toxicol, v.39, p.175-89. 1999.

Berk, P. D. e D. D. Stump. Mechanisms of cellular uptake of long chain free fatty acids. Mol Cell Biochem, v.192, n.1-2, Feb, p.17-31. 1999.

Bingham, C. O., 3rd e K. F. Austen. Phospholipase A2 enzymes in eicosanoid generation. Proc Assoc Am Physicians, v.111, n.6, Nov-Dec, p.516-24. 1999.

Braud, S., C. Bon, *et al.* Snake venom proteins acting on hemostasis. Biochimie, v.82, n.9-10, Sep-Oct, p.851-9. 2000.

Brunger, A. T. Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. Nature, v.355, n.6359, Jan 30, p.472-5. 1992.

Brunger, A. T., P. D. Adams, *et al.* Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography, v.54, Sep 1, p.905-921. 1998.

Cardoso, J. L. C., F. O. S. França, *et al.* Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e teratêutica dos acidentes: Sarvier. 2002. 46-50 p.

Chioato, L., E. A. Aragao, *et al.* Mapping of the structural determinants of artificial and biological membrane damaging activities of a Lys49 phospholipase A(2) by scanning alanine mutagenesis. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, v.1768, n.5, p.1247-1257. 2007.

Chioato, L., A. H. C. De Oliveira, *et al.* Distinct sites for myotoxic and membrane-damaging activities in the C-terminal region of a Lys(49)-phospholipase A(2). Biochemical Journal, v.366, p.971-976. 2002.

Chippaux, J. P. Snake-bites: appraisal of the global situation. Bull World Health Organ, v.76, n.5, p.515-24. 1998.

Chippaux, J. P. e M. Goyffon. Venoms, antivenoms and immunotherapy. Toxicon, v.36, n.6, Jun, p.823-46. 1998.

Cintra-Francischinelli, M., P. Pizzo, *et al.* The C-terminal region of a Lys49 myotoxin mediates Ca(2+) influx in C2C12 myotubes. Toxicon, Oct 14. 2009.

Correa, L. C., D. P. Marchi-Salvador, *et al.* Crystal structure of a myotoxic Asp49-phospholipase A2 with low catalytic activity: Insights into Ca2+-independent catalytic mechanism. Biochim Biophys Acta, v.1784, n.4, Apr, p.591-9. 2008.

De Azevedo, W. F., Jr., R. J. Ward, *et al.* Crystal structure of piratoxin-I: a calcium-independent, myotoxic phospholipase A2-homologue from Bothrops pirajai venom. Toxicon, v.36, n.10, Oct, p.1395-406. 1998.

Delano, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System. San Carlos, CA: DeLano Scientific LLC. 2002

Dennis, E. A. J. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. J Biol Chem., v.269, n.18, p.13057-13060. 1994.

Diaz, C., J. M. Gutierrez, *et al.* Isolation and characterization of basic myotoxic phospholipases A2 from Bothrops godmani (Godman's pit viper) snake venom. Arch Biochem Biophys, v.298, n.1, Oct, p.135-42. 1992.

Dos Santos, J. I., C. A. Fernandes, *et al.* The intriguing phospholipases A2 homologues: relevant structural features on myotoxicity and catalytic inactivity. Protein Pept Lett, v.16, n.8, p.887-93. 2009.

Dos Santos, J. I., A. M. Soares, *et al.* Comparative structural studies on Lys49-phospholipases A(2) from Bothrops genus reveal their myotoxic site. J Struct Biol, v.167, n.2, Aug, p.106-16. 2009.

Drenth, J. Principles of Protein X-ray crystallography. New York: Springer-Verlag. 1994

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

Francis, B., J. M. Gutierrez, *et al.* Myotoxin II from Bothrops asper (Terciopelo) venom is a lysine-49 phospholipase A2. Arch Biochem Biophys, v.284, n.2, Feb 1, p.352-9. 1991.

Gijon, M. A. e C. C. Leslie. Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A2 activation. J Leukoc Biol, v.65, n.3, Mar, p.330-6. 1999.

Goyal, K. e S. C. Mande. Exploiting 3D structural templates for detection of metal-binding sites in protein structures. Proteins, v.70, n.4, Mar, p.1206-18. 2008.

Gu, L., H. Zhang, *et al.* Structure of an acidic phospholipase A2 from the venom of Deinagkistrodon acutus. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, v.58, n.Pt 1, Jan, p.104-10. 2002.

Gutierrez, J. M. e B. Lomonte. Phospholipase A2 myotoxins from Bothrops snake venoms. Toxicon, v.33, n.11, Nov, p.1405-24. 1995.

Gutiérrez, J. M. e B. Lomonte. Venom phospholipase A2 enzymes: structure, function and mechanism. R. M. Kini. Chichester: Wiley**:** 321-352 p. 1997.

Gutierrez, J. M., J. Nunez, *et al.* Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin-II, a phospholipase A2 isolated from the venom of the snake Bothrops jararacussu. Exp Mol Pathol, v.55, n.3, Dec, p.217-29. 1991.

Homsi-Brandeburgo, M. I., L. S. Queiroz, *et al.* Fractionation of Bothrops jararacussu snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. Toxicon, v.26, n.7, p.615-27. 1988.

Jones, T. A., M. Bergdoll, *et al.* O: a macromolecule modeling environment. New York: Springer-Verlag. C. E. Bugg e S. E. Ealick**:** 189-95 p. 1990.

Kashchiev, D. Nucleation Theory: Basic Theory and Applications. Chemical Engineering Journal, v.83, n.1, 2001/04/15, p.66. 2001.

Kini, R. M. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A2 enzymes from snake venoms. Toxicon, v.45, n.8, Jun 15, p.1147-61. 2005.

Kini, R. M. e H. J. Evans. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A2. Toxicon, v.27, n.6, p.613-35. 1989.

Krissinel, E. e K. Henrick. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. Journal of Molecular Biology, v.372, n.3, Sep 21, p.774-797. 2007.

Laskowski, R. A., M. W. Macarthur, *et al.* Procheck - a Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. Journal of Applied Crystallography, v.26, Apr 1, p.283-291. 1993.

Lee, W. H., M. T. Da Silva Giotto, *et al.* Structural basis for low catalytic activity in Lys49 phospholipases A2--a hypothesis: the crystal structure of piratoxin II complexed to fatty acid. Biochemistry, v.40, n.1, Jan 9, p.28-36. 2001.

Liu, S. Y., K. Yoshizumi, *et al.* Purification and amino acid sequence of basic protein II, a lysine-49-phospholipase A2 with low activity, from Trimeresurus flavoviridis venom. J Biochem, v.107, n.3, Mar, p.400-8. 1990.

Lomonte, B., Y. Angulo, *et al.* Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115-129 in Lys49 myotoxic phospholipases A2 from snake venoms. Toxicon, v.42, n.3, Sep, p.307-12. 2003.

Lomonte, B., E. Moreno, *et al.* Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a lysine 49 phospholipase A2 from Bothrops asper snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. J Biol Chem, v.269, n.47, Nov 25, p.29867-73. 1994.

Mancuso, L. C., M. M. Correa, *et al.* Fractionation of Bothrops pirajai snake venom: isolation and characterization of piratoxin-I, a new myotoxic protein. Toxicon, v.33, n.5, May, p.615-26. 1995.

Maraganore, J. M., G. Merutka, *et al.* A new class of phospholipases A2 with lysine in place of aspartate 49. Functional consequences for calcium and substrate binding. J Biol Chem, v.259, n.22, Nov 25, p.13839-43. 1984.

Mcpherson, A. Introduction to Macromolecular Cristallography. Hoboken: Wiley-Liss. 2003

Mcree, D. E. **Practical Protein Crystallography**. San Diego: Academic Press. 1993. 386p p.

Mikol, V., E. Hirsch, *et al.* Diagnostic of precipitant for biomacromolecule crystallization by quasi-elastic light-scattering. J Mol Biol, v.213, n.1, May 5, p.187-95. 1990.

Moolenaar, W. H., O. Kranenburg, *et al.* Lysophosphatidic acid: G-protein signalling and cellular responses. Curr Opin Cell Biol, v.9, n.2, Apr, p.168-73. 1997.

Murshudov, G. N., A. A. Vagin, *et al.* Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, v.53, n.Pt 3, May 1, p.240-55. 1997.

Navaza, J. Amore - an Automated Package for Molecular Replacement. Acta Crystallographica Section A, v.50, Mar 1, p.157-163. 1994.

Otwinowski, Z. e W. Minor. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. Macromolecular Crystallography, Pt A, v.276, p.307-326. 1997.

Pereira, M. F., J. C. Novello, *et al.* The amino acid sequence of bothropstoxin-II, an Asp-49 myotoxin from Bothrops jararacussu (Jararacucu) venom with low phospholipase A2 activity. J Protein Chem, v.17, n.4, May, p.381-6. 1998.

Potterton, E., P. Briggs, *et al.* A graphical user interface to the CCP4 program suite. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, v.59, n.Pt 7, Jul, p.1131-7. 2003.

Rigden, D. J., L. W. Hwa, *et al.* The structure of the D49 phospholipase A2 piratoxin III from Bothrops pirajai reveals unprecedented structural displacement of the calcium-binding loop: possiblerelationship to cooperative substrate binding. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, v.59, n.Pt 2, Feb, p.255-62. 2003.

Rosenberg, P. Handbook of toxinology. W. T. Shyer e D. Mebs. New York: Dekker 1990.

Rufini, S., P. Cesaroni, *et al.* Calcium ion independent membrane leakage induced by phospholipase-like myotoxins. Biochemistry, v.31, n.49, Dec 15, p.12424-30. 1992.

Saridakis, E. e N. E. Chayen. Systematic improvement of protein crystals by determining the supersolubility curves of phase diagrams. Biophys J, v.84, n.2 Pt 1, Feb, p.1218-22. 2003.

Schaloske, R. H. e E. A. Dennis. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. Biochim Biophys Acta, v.1761, n.11, Nov, p.1246-59. 2006.

Scott, D. L., A. Achari, *et al.* Crystallographic and biochemical studies of the (inactive) Lys-49 phospholipase A2 from the venom of Agkistridon piscivorus piscivorus. J Biol Chem, v.267, n.31, Nov 5, p.22645-57. 1992.

Soares, A. M., S. H. Andriao-Escarso, *et al.* Dissociation of enzymatic and pharmacological properties of piratoxins-I and -III, two myotoxic phospholipases A2 from Bothrops pirajai snake venom. Arch Biochem Biophys, v.387, n.2, Mar 15, p.188-96. 2001.

Soares, A. M., Y. Oshima-Franco, *et al.* Mn2+ ions reduce the enzymatic and pharmacological activities of bothropstoxin-I, a myotoxic Lys49 phospholipase A(2) homologue from Bothrops jararacussu snake venom. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v.34, n.6, p.668-677. 2002.

Soares, A. M., W. P. Sestito, *et al.* Alkylation of myotoxic phospholipases A2 in Bothrops moojeni venom: a promising approach to an enhanced antivenom production. Int J Biochem Cell Biol, v.36, n.2, Feb, p.258-70. 2004.

Soares, A. M., F. K. Ticli, *et al.* Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. Curr Med Chem, v.12, n.22, p.2625-41. 2005.

Toyama, M. H., A. M. Soares, *et al.* Amino acid sequence of piratoxin-I, a myotoxin from Bothrops pirajai snake venom, and its biological activity after alkylation with p-bromophenacyl bromide. J Protein Chem, v.17, n.7, Oct, p.713-8. 1998.

Valentin, E. e G. Lambeau. What can venom phospholipases A(2) tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A(2)? Biochimie, v.82, n.9-10, Sep-Oct, p.815-31. 2000.

Wang, X. Q., J. Yang, *et al.* Crystal structure of an acidic phospholipase A2 from the venom of Agkistrodon halys pallas at 2.0 A resolution. J Mol Biol, v.255, n.5, Feb 9, p.669-76. 1996.

Ward, R. J., W. F. De Azevedo Jr., *et al.* At the interface: crystal structures of phospholipases A2. Toxicon, v.36, n.11, p.1623-33. 1998.

Warrell, D. A. Clinical features of envenoming ROM snake bites, in Envenomings and their treatments. Lyon. 1996 (Ed. Fondation Marcel Mérieux)

Yoshizumi, K., S. Y. Liu, *et al*. Purification and amino acid sequence of basic protein I, a lysine-49-phospholipase A2 with low activity, from the venom of Trimeresurus flavoviridis (Habu snake). Toxicon, v.28, n.1, p.43-54. 1990.

APÊNDICE

APÊNDICE

Segue abaixo resumo publicado no Livro Anais do 11º Encontro Regional de Biomedicina:

1.6.2 ESTUDOS ESTRUTURAIS PRELIMINARES SOBRE A PrTX-I EM PRESENÇA DE ÍONS MANGANÊS.

BORGES, R. J.[1]; SANTOS, J. I.[1]; SOARES, A. M.[2]; FONTES, M. R. M.[1];

[1] UNESP - Campus Botucatu. [2] Universidade de São Paulo - Campus Ribeirão Preto.

Serpentes do gênero *Bothrops* representam um assunto de grande interesse científico, médico e social no Brasil, pois são responsáveis mais de 90% do total de acidentes ofídicos que ocorrem no país. Venenos botrópicos contêm diversas toxinas, sendo um de seus principais componentes as fosfolipases A2. Fosfolipases A2 (PLA2s) são enzimas pequenas, estáveis e cálcio-dependentes que hidrolisam a ligação éster sn-2 de fosfolipídios, liberando lisofosfolipídios e ácidos graxos. Estas toxinas induzem diversos efeitos farmacológicos, como atividade hipontensora, cardiotóxica, neurotóxica e miotóxica, sendo esta última objetivo de diversos estudos, já que a lesão muscular não é eficazmente neutralizada pela soroterapia. Recentes estudos demonstraram redução da atividade miotóxica da bothropstoxina-I (BthTX-I, uma Lys49-PLA2) na presença de íons divalentes quando injetados em ratos, sendo que a maior redução foi observada com íons manganês quando pré-incubados com a toxina antes da injeção. Nesse trabalho, relatamos a co-cristalização da piratoxina-I (PrTX-I), uma PLA2 dimérica e básica de *Bothrops pirajai*, com íons manganês, bem como estatísticas dos dados de difração de raios-X. A estrutura cristalográfica foi determinada utilizando técnicas de substituição molecular através do programa AMoRe. Os dados da difração de raios-X foram coletados a 1,9 Å (LNLS, Campinas) com dados 92,3% completos e R_{merge} =10.1%. O cristal pertence ao grupo espacial $P3_121$ com célula unitária de a = b = 55,17, c = 126.28 Å. Resultados preliminares indicam duas densidades eletrônicas que podem corresponder ao manganês. A proteína está sendo refinada através do programa CNS e estudos comparativos serão realizados com o intuíto de compreender a redução da atividade miotóxica quando o mangânes interage com a toxina.

Agradecimentos: FAPESP, FUNDUNESP, LNLS and CNPq

Segue abaixo resumo publicado na revista The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases decorrente da participação do 11º Encontro Regional de Biomedicina:

J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.
V.14, n.4, p.797, 2008.
11th Regional Meeting of Biomedicine - ISSN 1678-9199.

PRELIMINARY STRUCTURAL STUDIES WITH THE PrTX-I IN THE PRESENCE OF MANGANESE IONS

AUTHORS: BORGES R. J. (1), SANTOS J. I. (1), SOARES A. M. (2), FONTES M. R. M. (1)

AFFILIATIONS: (1) São Paulo State University - Campus Botucatu. (2) University of São Paulo - Campus Riberão Preto, São Paulo, Brazil.

ABSTRACT: Snakes from *Bothrops* genus are of great scientific, medical and social importance in Brazil since they are responsible for more than 90% of all snake accidents that happens in our country. Bothropic venom contains many toxins, being phospholipases A2 (PLA2s) one of their main components. These proteins are small, stable and calcium-dependent enzymes that hydrolyze the *sn*-2 acyl groups of phospholipids to liberate fatty acids and lysophospholipids. They induce many pharmacological effects like hypotensive, cardiotoxicity, neurotoxicity and myotoxicity. Muscle damage induced by Lys49-PLA2s has been the focus of many studies since this effect is not efficiently neutralized by serum therapy. Recent studies showed a reduction on the myotoxic activity of bothropstoxin-I (BthTX-I, a basic Lys49-PLA2) in the presence of divalent ions when injected in mice and the most effective reduction was observed with manganese ions when pre-incubated with the toxin before injection. In this work we report the co-crystallization of piratoxin-I (PrTX-I), a dimeric and basic Lys49-PLA2 from *Bothrops pirajai*, with manganese ions, and X-ray diffraction data statistics. The crystal structure was determined using molecular replacement techniques implemented by AMoRe program. X-ray diffraction data were collected at 1.9Å resolution (LNLS, Campinas) and data set are 92.3% complete with R_{merge}=10.1%. The crystals belong to the space group P3121 with unit cell a = b = 55.17, c = 126.38 Å. Preliminary results indicate two electronic densities that may correspond to the manganese ions. The protein is currently being refined using the program CNS and comparative studies will be realized aiming to comprehend the decrease in the myotoxic activity when manganese interacts with the toxin.

KEY WORDS: hospholipases A2, PLA2, bothropic venom, PrTX-I.

CONFLICTS OF INTERESTS: There is no conflict.

FINANCIAL SUPPORT: FAPESP, FUNDUNESP, LNLS and CNPq.

CORRESPONDENCE TO: RAFAEL J. BORGES, Physics and Biophysics Department, Biosciences Institute, São Paulo State University, Botucatu, São Paulo. Phone: +55 14 3811 6254. E-mail: rafaeljborges@hotmail.com

Segue abaixo resumo publicado no livro Anais da XXXVIII Reunião Anual da SBBq:

Structural Studies with a Phospholipase A_2 Homologue Complexed to Mn^{2+} Ions – Possible Role for Myotoxicity Inhibition

BORGES, R.J.[1]; dos SANTOS, J.I.[1]; SOARES, A.M.[2]; FONTES, M.R.M.[1]
[1] Departamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo, Brazil. [2] Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Snakes from *Bothrops* genus are responsible for the great majority of the ophidian accidents that happen in Brazil. Their venom contains many toxins, being of relevance the phospholipases A_2 (PLA_2s). PLA_2s are small, stable and calcium-dependent enzymes that hydrolyze the ester sn-2 bond of phospholipids, liberating lysophospholipids and fatty acids. Otherwise, PLA_2s homologues are non-catalytic but present a wide range of pharmacological activities, such as hypotension, cardiotoxicity, neurotoxicity and myotoxicity. Myotoxic activity has been the focus of many studies, since the serum therapy is not efficient against the muscular injury induced by these PLA_2s. Recent studies show a reduction in myotoxic activity of bothropstoxin-I (BthTX-I, a PLA_2 homologue) in the presence of divalent ions when injected in rats. In order to understand the reason of this reduction and trying to get insights into the mechanisms of phospholipases A_2 homologues action, the co-crystallization of the basic PLA_2 homologue piratoxin-I (PrTX-I) from *Bothrops pirajai* with manganese ions were performed. The crystallographic structure of this complex was determined at 1.9Å and present 92.3% of completeness and R_{merge}=10.1%. Preliminary results indicate electronic densities that may correspond to the manganese ions, deserving to be highlighted the presence of one ion in the hydrophobic channel. This region is known to be the local of interaction of many inhibitors of PLA_2s homologues. Comparative studies are being realized to comprehend the reduction of the myotoxic activity when the manganese ions interact with the toxin.

Key-words: phospholipases A_2, bothropic venom, piratoxin
Supported by: FAPESP and CNPq